



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Efecto de los neuropéptidos codificados en los genes
Tac1 y Calca sobre la cicatrización de lesiones
experimentales del epitelio corneal

TESIS DOCTORAL

Adolfo Aracil Marco

Directora: Profa. Dra. Juana Gallar Martínez
Codirector: Prof. Dr. Carlos Belmonte Martínez



Programa de Doctorado en Neurociencias

D. ADOLFO ARACIL MARCO, autor de la presente Tesis Doctoral, DECLARA:

1. Que la presente Tesis Doctoral se presenta en **formato convencional**.
2. Que la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Neurociencias ha reconocido las siguientes aportaciones como indicios suficientes de calidad para la misma:
 - Gallar, J., Luna, C., Alonso, E., Revert, R., Quirce, S., Aracil, A., ... Acosta, M. C. (2015). Corneal surface temperature and tear secretion in young and adult aqueous tear deficient guinea pigs. *Acta Ophthalmologica*, 93, n/a-n/a. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-3768.2015.0617> *Acta Ophthalmologica*, IF 2015: 3.032; 11/56 (Q1, Ophthalmology)
 - Acosta, M. C., Luna, C., Quirce, S., Aracil, A., Belmonte, C., & Gallar, J. (2016). Corneal surface temperature, and tearing and blinking rates during allergic conjunctivitis in the guinea pig. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(12), 401–401. Retrieved from <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2559262&resultClick=1> *Invest Ophthalmol Vis Sci*, IF 2016: 3.303; 11/59 (Q1, Ophthalmology).
 - Gallar, J., Rincón-Frutos, L., Luna, C., Velasco, E., Aracil, A., Diaz-Tahoces, A., & Acosta, M. C. (2017). Interference of TRPA1 function affects background activity of corneal cold thermoreceptors in ageing mice. *Acta Ophthalmologica*, 95. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1755-3768.2017.05013> *Acta Ophthalmologica*, IF 2017: 3.324; 12/59 (Q1, Ophthalmology)
3. Que hasta donde él ha podido averiguar, ninguna de estas aportaciones ha sido utilizada en Tesis anteriores, ni existe intención de que se usen en otras futuras.

Fdo: ADOLFO ARACIL MARCO

Sant Joan d'Alacant, a dieciséis de mayo de 2019.



El Profesor Dr. Miguel A. Valdeolmillos López, Director del Programa de Doctorado en Neurociencias impartido por el Instituto de Neurociencias, Centro Mixto de la Universidad Miguel Hernández y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

I N F O R M A

Que la Tesis Doctoral "*Efecto de los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 y Calca sobre la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal*" ha sido realizada por D. Adolfo Aracil Marco, Licenciado en Medicina y Cirugía, bajo la dirección de la Dra. Juana Gallar Martínez y el Dr. Carlos Belmonte Martínez, y da su conformidad para que sea leída y defendida como Tesis Doctoral ante el correspondiente tribunal en la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firma el presente en San Juan de Alicante, a 18 de julio de 2019.

Fdo.: Prof. Dr. Miguel A. Valdeolmillos López



Los Dres. JUANA GALLAR MARTÍNEZ, Catedrática de Universidad del Departamento de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández e investigadora del Instituto de Neurociencias, Centro Mixto de la Universidad Miguel Hernández y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y CARLOS BELMONTE MARTÍNEZ, Catedrático de Universidad emérito de la Universidad Miguel Hernández,

I N F O R M A N

Que D. ADOLFO ARACIL MARCO, Licenciado en Medicina y Cirugía y estudiante del Programa de Doctorado en Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge en su Tesis Doctoral "*Efecto de los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 y Calca sobre la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal*", que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo, y que dan su conformidad para su presentación y defensa pública.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firman el presente en Sant Joan d'Alacant, a doce de julio de 2019.

Fdo.: Dra. Juana Gallar Martínez Fdo: Dr. Carlos Belmonte Martínez



A mis padres,
a los que todo debo.

«The person who influenced me most during my doctorate was my supervisor. Curtis took me on not knowing much about me, suggested the project and then left it to me to work out the details. This meant that my progress was slow and sometimes painful, but also that I learned for myself how to set about things and master new techniques. Fortunately, other students and staff in the department were encouraging and supportive [...] Nowadays, PhDs are much more structured. Students are not given as free a rein as I was, nor are they allowed to make as many mistakes.»

Cheryll Tickle

Seven ages of PhD (Nature 2011;472:283-6)



«Sin seguir ningún plan preestablecido, sino dejándome guiar de vez en cuando por mis inclinaciones o por el azar, he tratado [...] de reconciliar dos aspiraciones que, según el gran poeta Yeats, serían irreconciliables: "*perfection of the life, or of the work*". De este modo, y confirmando su vaticinio, he realizado lo que podría definirse como "*imperfection of the life and of the work*". El hecho de que la actividad que he desarrollado de un modo tan imperfecto haya sido y siga siendo todavía para mí una fuente inagotable de placer, me induce a pensar que la imperfección en el cumplimiento de la tarea que nos hemos fijado o nos ha sido asignada quizá sea más acorde con la naturaleza humana, imperfecta como es, que la perfección.»

Rita Levy Montalcini

Elogio de la imperfección (1988)

«Todo en él era viejo, salvo sus ojos,
que tenían el mismo color que el mar,
y eran alegres
e invictos.»

Ernest Hemingway
El viejo y el mar (1952)



Mi peregrinatio academica

«La *peregrinatio academica* cruzaba Europa en la Edad Media paralelamente a las rutas de los peregrinos que viajaban hacia los santos lugares. Estudiantes y profesores compartían los caminos junto con los fieles y creyentes que partían hacia Jerusalén, Roma o Santiago de Compostela. Tanto los peregrinos como los universitarios eran un paisaje familiar en los caminos europeos. Aunque la *peregrinatio academica* no tenía una finalidad religiosa, guardaba muchos paralelismos con la experiencia de los peregrinos religiosos. Todos ellos, estudiantes, profesores y peregrinos, viajaban con la pretensión de acceder a un conocimiento intelectual o religioso que diera un nuevo impulso a su vida, pero también con la esperanza de disfrutar de la experiencia cosmopolita que suponía la visita de los santos lugares y las ciudades universitarias. Esta experiencia marcaba las vidas de quienes realizaban el viaje y les ponía en contacto con nuevas lenguas, nuevas relaciones personales y, en definitiva, con otras perspectivas de la realidad.»¹

En los primeros pasos de la actividad universitaria medieval los universitarios viajaban durante su formación de Universidad en Universidad, a lo largo de toda Europa. Durante esta *peregrinatio academica* no sólo buscaban entrar en contacto con grandes maestros en determinados campos del saber, sino también descubrir nuevas realidades, nuevas visiones del mundo y de la vida. En pleno movimiento renacentista y humanista, se pretendía que los universitarios no sólo ampliasen su formación, sino que quedasen impregnados del espíritu de ser auténticos *homo universalis*. Al concluir esta *peregrinatio*, cuya duración era variable e impredecible, se consideraba que el postulante había alcanzado no sólo los conocimientos, sino también la madurez personal y la amplitud de miras necesarias como para ser tenido por docto, y, por tanto, ser digno de obtener el grado académico al que optaba.

Hace mucho tiempo -quizá demasiado- que comenzó mi particular *peregrinatio*. El camino ha estado repleto de bifurcaciones, de idas y venidas, de experiencias y vivencias. En múltiples ocasiones las tormentas me obligaron a guarecerme, y a aplazar la marcha hasta que el barro hubiese vuelto a secarse, y las sendas volviesen a ser practicables. Pero tras cada tormenta se volvieron a abrir claros, aparecieron arcoíris, reverdecieron los campos y volvieron a llenarse de flores, amenizando el camino. No negaré que me costó subir cada repecho y cada colina. Pero descubrí que desde lo alto de cada uno de ellos las vistas y los paisajes son mejores, y que allí el aire está más limpio y más fresco: se respira mejor. Busqué, y, en algunas ocasiones, encontré. No evité errar: más bien, me prodigué en ello.²

En el camino me he cruzado con multitud de peregrinos, que son legión, y he tenido la inmensa fortuna de que siempre hubo una mano amiga que me dio algo de pan o de agua

¹ Montiel Roig, G., Martínez García, E., Montiel, G., Martínez, E., & Piqueras, N. (2004). Viajar para saber: movilidad y comunicación entre universidades europeas. Valencia: Universitat de València.

² «Errar, verbo simbólico que significa al mismo tiempo vagar y equivocarse: los dos grandes maestros de la vida.» Gregorio Marañón, Raíz y decoro de España (1933).

cuando tuve hambre o sed, o que me acogió bajo su techo durante unas noches, o en sus aldeas y pueblos por periodos más prolongados, sin afectarle de dónde venía ni a donde me dirigía. Con todos ellos me esforcé en intentar entenderme, para lo cual tuve que dedicar tiempo a comprender primero sus lenguas y costumbres, que a menudo se me antojaban extrañas. Salir de la aldea, sin duda, me mejoró.³

Al «echar la vista atrás y ver la senda que no se ha de volver a pisar» me viene a la mente la primigenia descripción de Universidad de Las Siete Partidas de Alfonso X «El Sabio»: «*el ayuntamiento de maestros et de escolares que es fecho en algunt lugar con voluntad et con entendimiento a aprender los saberes*»⁴ Al pensar sobre ellas me hago más consciente aún de que, en escasas ocasiones como maestros, y en infinidad como escolares, ese breve lapso durante el que nos es dado transitar el tiempo como el conjunto altamente organizado de materia y energía que somos, y al que llamamos vida, no es sino un continuo «hacer Universidad».⁵

Muchas gracias a todos aquellos con quienes en algún momento de mi *peregrinatio* se cruzaron mis pasos: de todos ellos aprendí, aun cuando en ocasiones pudiera parecer que les enseñaba.⁶

³ «La aldea, cuando se cría uno en ella y no sale de ella jamás, envilece, empobrece y embrutece.» Emilia Pardo Bazán, Los Pazos de Ulloa (1886).

⁴ Benito y Durán, A. (1985). El estudiante en las Siete Partidas de Alfonso X el Sabio. *Helmántica: Revista de Filología Clásica y Hebrea*, 36(110), 183–193.

⁵ «La vida de todo hombre es un camino hacia sí mismo, el intento de un camino, el esbozo de un sendero.» Herman Hesse, *Demian* (1919)

⁶ **AGRADECIMIENTOS:** Son tantas las personas con las que me siento agradecido por el afecto y el apoyo que me han brindado a lo largo de todo este tiempo, que, con toda seguridad, al intentar citar a todas ellas olvidaré inadvertidamente a alguna, con el consecuente agravio. Para evitarlo, destacaré tan solo a aquellas más directamente relacionadas con el presente trabajo de investigación: los Profesores **Juana Gallar** y **Carlos Belmonte**, co-directores del trabajo de investigación, por su constante apoyo y estímulo; la Profa. **María del Carmen Acosta Boj**, **Carolina Luna** y **Susana Quirce**, quienes fueron mis más directas compañeras de laboratorio en este tiempo y me ayudaron a realizar algunos experimentos que necesitaban de más de un experimentador; por extensión, a todas las personas que en algún momento han formado parte de los grupos de investigación dirigidos por la Profa. Gallar o el Prof. Belmonte, quienes también contribuyeron a facilitarme el proceso y de quienes tanto aprendí; los Profesores **Jean Pierre Changeux** (Institut Pasteur), **Andreas Zimmer** (Universität Bonn), **Stephen Hunt** (University College London) y **Carmen de Felipe** (Instituto de Neurociencias de Alicante), quienes cedieron las cepas de animales mutantes usadas en los experimentos, y las Profesoras **Ana Sánchez**, y **Margarita Calonge** y **Yolanda Diebold** (todas ellas de la Universidad de Valladolid), quienes me enseñaron a trabajar con células en cultivo y cedieron la línea celular inmortalizada humana, respectivamente; los Dres. **Albrecht May** (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) y **Nicolás Cuenca** (Universidad de Alicante), y las Dras. **Kamilla Mizerska** y **Sonia Bonilla** (esta última, del grupo de investigación dirigido por el Prof. **Salvador Martínez**), quienes colaboraron en los estudios histológicos; el Prof. **Karl Messlinger** (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg), y la Profa. **Darlene Dartt** (Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School), quienes me acogieron para realizar estancias de investigación en sus laboratorios; el personal del **Servicio de Experimentación Animal** de la Universidad Miguel Hernández y el **personal técnico y de administración** de las diferentes unidades organizativas del Instituto de Neurociencias; y las entidades financiadoras del trabajo experimental. A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	- 1 -
LISTADO DE ABREVIATURAS	- 5 -
LISTADO DE FIGURAS.....	- 7 -
RESUMEN	- 11 -
RESUM.....	- 13 -
ABSTRACT	- 15 -
1. INTRODUCCION.....	- 17 -
1.1 Contextualización.	- 19 -
1.1.1 La «nocifensión»: una «función eferente» de los nociceptores.....	- 19 -
1.1.2 Influencia de las neuronas sensoriales primarias sobre el mantenimiento de la homeostasis del epitelio corneal: la «queratitis neurotrófica».....	- 24 -
1.2 La córnea.	- 25 -
1.2.1 Desarrollo embriológico.....	- 26 -
1.2.2 Estructura general de la córnea adulta.....	- 27 -
1.2.2.1 Epitelio corneal.....	- 27 -
1.2.2.2 Estroma corneal.	- 30 -
1.2.2.3 Endotelio corneal.	- 31 -
1.2.3 Inervación de la córnea.....	- 31 -
1.2.3.1 Vía nerviosa sensorial de la córnea.....	- 31 -
1.2.3.1.1 Distribución periférica	- 31 -
1.2.3.1.2 Vías centrales.....	- 35 -
1.2.3.1.2.1 Tronco del encéfalo.	- 35 -
1.2.3.1.2.2 Tálamo.	- 36 -
1.2.3.1.2.3 Corteza cerebral.....	- 36 -
1.2.3.1.2.4 Hipotálamo.	- 36 -
1.2.3.2 Neurofisiología de las neuronas sensoriales primarias corneales	- 36 -
1.2.3.2.1 Mecanorreceptores de alto umbral, o nociceptores mecánicos.....	- 37 -
1.2.3.2.2 Nociceptores polimodales.	- 38 -
1.2.3.2.3 Receptores «de frío» (« <i>cold thermoreceptors</i> »).	- 39 -
1.2.3.3 Contenido en neuropéptidos de las neuronas sensoriales corneales.	- 40 -
1.2.3.3.1 Péptidos codificados en el gen Tac1: sustancia P y neuroquinina A. ...	- 41 -
1.2.3.3.2 El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (α CGRP).....	- 42 -
1.2.3.3.3 Expresión de SP, NKA y α CGRP en las neuronas sensoriales de la córnea. ...	- 44 -
1.3 Respuesta del epitelio corneal a su lesión: cicatrización epitelial de la córnea.	- 46 -
1.3.1.1 Moléculas de señalización extracelular	- 47 -
1.3.1.2 Vías intracelulares	- 47 -
1.3.1.3 Efectos de la SP sobre la cicatrización epitelial de la córnea.....	- 48 -
1.3.1.4 Efectos del CGRP sobre la cicatrización epitelial de la córnea.....	- 49 -
1.4 El ojo del ratón (<i>Mus musculus</i>) como modelo experimental.	- 50 -
1.4.1 La córnea del ratón.	- 51 -
1.4.2 Inervación corneal del ratón.....	- 51 -
1.4.3 Expresión de neuropéptidos en las neuronas sensoriales de la córnea del ratón. .	- 53 -
1.4.4 Cicatrización de las lesiones epiteliales de la córnea del ratón.....	- 54 -
1.4.5 Efectos de los neuropéptidos sobre la cicatrización del epitelio corneal del ratón.	- 55 -
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	- 57 -
3. MATERIAL Y MÉTODOS	- 61 -
3.1 Animales	- 63 -
3.1.1 Manipulación general.	- 63 -

3.1.2	Características de las cepas de ratones utilizadas.....	64 -
3.1.2.1	Ratones en los que se eliminó la expresión de los neuropéptidos codificados en el gen Tac1 (sustancia P y neuroquinina A).....	64 -
3.1.2.2	Ratones en los que se eliminó la expresión del receptor NK1.....	65 -
3.1.2.3	Ratones en los que se eliminó la expresión del α CGRP.....	66 -
3.2	Procedimientos anestésicos.....	68 -
3.3	Estudios histológicos.....	68 -
3.3.1	Histología general.....	68 -
3.3.1.1	Estudio de la proliferación celular.....	69 -
3.3.2	Marcaje del citoesqueleto.....	69 -
3.3.3	Marcaje de núcleos.....	70 -
3.3.4	Estudio de la inervación corneal.....	70 -
3.4	Evaluación de la nocicepción corneal.....	70 -
3.4.1	Desarrollo del test conductual.....	71 -
3.4.1.1	Determinación del rango de concentraciones de capsaicina al que es sensible el ojo del ratón.....	71 -
3.4.1.2	Efecto sobre la respuesta conductual de la administración repetida de capsaicina y de fármacos anestésicos y antiinflamatorios, tanto esteroideos como no esteroideos.....	72 -
3.4.1.3	Efecto de bagaje genético sobre la respuesta conductual a la administración ocular tópica de capsaicina.....	73 -
3.4.2	Evaluación de la respuesta conductual a la administración ocular tópica de capsaicina en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.....	74 -
3.5	Medición de la secreción lacrimal.....	78 -
3.5.1	Preparación de los hilos impregnados en fluoresceína.....	78 -
3.5.2	Determinación de las variables a medir y del tiempo a tener el hilo en el saco conjuntival.....	79 -
3.5.3	Evaluación de la producción lacrimal en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.....	81 -
3.6	Estudio de la liberación de neuropéptidos desde las terminales periféricas de las neuronas sensoriales de la córnea.....	82 -
3.6.1	Modelo <i>in vitro</i> para el estudio de la liberación de neuropéptidos desde las terminales sensoriales corneales.....	82 -
3.6.2	Métodos de cuantificación de neuropéptidos.....	83 -
3.6.2.1	ELISA para la NKA.....	83 -
3.6.2.2	ELISA para el α CGRP.....	84 -
3.7	Modelo <i>in vitro</i> de cicatrización del epitelio corneal.....	85 -
3.7.1	Línea de células epiteliales corneales humanas inmortalizadas (HCEC).....	85 -
3.7.2	Estandarización de las desepitelizaciones <i>in vitro</i>	86 -
3.7.3	Modelo de co-cultivo de HCEC y células disociadas del ganglio trigémino.....	89 -
3.7.4	Efecto del α CGRP sobre la cicatrización epitelial <i>in vitro</i>	91 -
3.8	Estudio de la cicatrización de lesiones epiteliales corneales <i>in vivo</i>.....	91 -
3.8.1	Cicatrización epitelial de la córnea en ratones Tac1-KO, NK1-KO y α CGRP-KO.....	92 -
3.8.2	Efecto del α CGRP sobre la cicatrización epitelial de la córnea en ratones α CGRP-KO... -	95 -
3.8.3	Medición de la cinética de la cicatrización epitelial.....	95 -
3.9	Métodos estadísticos.....	96 -
4.	RESULTADOS.....	97 -
4.1	Fenotipo ocular en los ratones Tac1-KO y αCGRP-KO.....	99 -
4.2	Respuestas conductuales a la administración ocular tópica de capsaicina.....	102 -
4.2.1	Respuestas en la cepa Tac1-KO.....	102 -
4.2.2	Respuestas en la cepa α CGRP-KO.....	106 -

4.3	Producción basal de lágrima en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.....	- 111 -
4.4	Liberación de neuropéptidos desde las terminales nociceptivas de la córnea, estimulada por capsaicina.	- 114 -
4.4.1	Liberación de NKA desde la córnea de ratones Tac1-KO.....	- 114 -
4.4.2	Liberación de CGRP desde la córnea de ratones α CGRP-KO.	- 114 -
4.5	Efecto del co-cultivo de células del trigémino sobre la cicatrización <i>in vitro</i> de HCEC.....	- 117 -
4.6	Efecto del CGRP sobre la cicatrización <i>in vitro</i> de HCEC.	- 123 -
4.7	Cicatrización de lesiones del epitelio corneal <i>in vivo</i> en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.	125
4.8	Cicatrización epitelial de la córnea en ratones NK1-KO.	133
4.9	Efecto del CGRP sobre la cicatrización de lesiones epiteliales de la córnea en ratones α CGRP-KO.	138
5.	DISCUSIÓN.....	- 143 -
5.2	Ausencia de fenotipo espontáneo en los animales Tac1-KO y α CGRP-KO.	- 145 -
5.3	Ausencia de alteraciones sobre la percepción de estímulos dolorosos.	- 146 -
5.4	Ausencia de alteraciones en la producción lacrimal en los animales Tac1-KO y α CGRP-KO.	- 148 -
5.5	Liberación de neuropéptidos desde las terminaciones periféricas.....	- 151 -
5.6	Efectos sobre la cicatrización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	- 152 -
5.7	Propuestas de futuro.	- 154 -
6.	CONCLUSIONES	- 159 -
	REFERENCIAS.....	- 163 -





LISTADO DE ABREVIATURAS

AMPC: adenosin monofosfato cíclico
ANOVA: análisis de la varianza
ATP: adenosin trifosfato
BDNF: *brain derived neurotrophic factor*
BrdU: Bromo-deoxi-uridina
BSS: *balance salt solution*
CREB: *cAMP response element-binding*
CRL: *calcitonin receptor like*
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO: dimetilsulfóxido
EGF: *epidermal growth factor*
ELISA: enzimo-inmuno-ensayo
FBS: *fetal bovine serum*
FGF: *fibroblast growth factor*
GDNF: *glial-derived growth factor*
HCEC: *human corneal epithelial cell*
HGF: *hepatocyte growth factor*
IGF-1: *insulin-like growth factor 1*
IL-8: *interleukin 8*
KGF: *keratocyte growth factor*
KO: *knockout*
LASIK: *laser-assited in situ keratomileusis*
MAPK: *mitogen-activated protein kinase*
NGF: *nerve growth factor*
NK1: *neurokinin 1 receptor*
NK1-KO: *knockout del receptor NK1*
NK2: *neurokinin 2 receptor*
NK3: *neurokinin 3 receptor*
NKA: neuroquinina A
PDGF: *platelet derived growth factor*
RAMP1: *receptor activity modifying protein 1*
RCP: *receptor complex protein*
SNC: sistema nervioso central
SP: sustancia P
Tac1: gen de las taquiquinas 1
Tac1-KO: *knockout del gen Tac1*
TGF β 1: *transforming growth factor beta 1*
TRITC: tetrametilrodamina
TRPM8: *Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8*
TRPV1: *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*
WT: *wild type*
 α CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina, tipo alfa
 α CGRP-KO: *knockout del α CGRP*



LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. EL CONCEPTO DE «REFLEXO AXÓNICO».....	- 23 -
FIGURA 2. HOMEOSTASIS DE LA CELULARIDAD DEL EPITELIO CORNEAL.....	- 29 -
FIGURA 3. INERVACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS OCULARES.	- 32 -
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS NERVIOSAS A LO LARGO DEL POLO ANTERIOR DEL OJO.	- 34 -
FIGURA 5. TIPOS FUNCIONALES DE NEURONAS SENSORIALES DE LA CÓRNEA.....	- 38 -
FIGURA 6. TAQUIQUININAS CODIFICADAS EN EL GEN TAC1.	- 42 -
FIGURA 7. EXPRESIÓN DEL ACGRP, Y MECANISMO DE ACCIÓN DE ESTE.	- 44 -
FIGURA 8. RESPUESTA CONDUCTUAL DE HEMBRAS ADULTAS DE RATÓN OF-1 A LA ADMINISTRACIÓN OCULAR TÓPICA DE CAPSAICINA.....	- 75 -
FIGURA 9. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DOSIS REPETIDAS DE CAPSAICINA Y DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS Y ANESTÉSICOS SOBRE LOS RESULTADOS DEL TEST CONDUCTUAL.	- 76 -
FIGURA 10. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO DE LA SUPERFICIE OCULAR CON DIFERENTES FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS O ANESTÉSICOS ANTES DE LA ADMINISTRACIÓN DE CAPSAICINA.....	- 77 -
FIGURA 11. RESPUESTA A LA ADMINISTRACIÓN TÓPICA OCULAR DE CAPSAICINA EN DIFERENTES CEPAS DE RATONES.	- 78 -
FIGURA 12. RELACIÓN ENTRE EL VOLUMEN INICIAL DE LA GOTTA, EL TIEMPO DE CONTACTO CON LA MISMA Y LA LONGITUD HUMEDECIDA DE UN FILAMENTO DE ALGODÓN.....	- 81 -
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL MODELO DE LIBERACIÓN DE NEUROPEPTIDOS DESDE LAS TERMINACIONES SENSORIALES NOCICEPTIVAS CORNEALES EN RESPUESTA A LA CAPSAICINA.	- 83 -
FIGURA 14. MODELO DE DESEPITELIZACIONES EN MONOCAPAS DE HCEC.	- 88 -
FIGURA 15. MODELO DE CO-CULTIVO DE HCEC CON CÉLULAS DEL TRIGÉMINO.	- 90 -
FIGURA 16. MODELO DE DESEPITELIZACIONES <i>IN VIVO</i>	- 94 -
FIGURA 17. COMPARACIÓN DEL ASPECTO HISTOLÓGICO DE LA CÓRNEA DE LAS CEPAS UTILIZADAS.	- 100 -
FIGURA 18. INERVACIÓN DE LA CÓRNEA DE LAS CEPAS UTILIZADAS.	- 101 -
FIGURA 19. CORRELACIÓN INTEROCULAR EN LA RESPUESTA CONDUCTUAL A LA APLICACIÓN DE CAPSAICINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN LOS ANIMALES TAC1-KO Y SUS CORRESPONDIENTES CONTROLES.	- 104 -
FIGURA 20. AJUSTE DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA EN LOS ANIMALES TAC1-KO Y SUS CONTROLES.	- 105 -
FIGURA 21. AJUSTE DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA EN LOS ANIMALES TAC1-KO Y SUS CONTROLES: COMPARACIÓN POR SEXOS.	- 106 -
FIGURA 22. CORRELACIÓN INTEROCULAR EN LA RESPUESTA CONDUCTUAL A LA APLICACIÓN DE CAPSAICINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN LOS ANIMALES ACGRP-KO Y SUS CONTROLES.	- 107 -
FIGURA 23. AJUSTE DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA EN LOS ANIMALES CGRP-KO Y SUS CONTROLES.....	- 109 -

FIGURA 24. AJUSTE DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA EN LOS ANIMALES ACGRP-KO Y SUS CONTROLES: COMPARACIÓN POR SEXOS.....	- 110 -
FIGURA 25. PRODUCCIÓN LACRIMAL BASAL EN RATONES TAC1-KO Y ACGRP-KO.....	- 111 -
FIGURA 26. CORRELACIÓN INTEROCULAR DE LA PRODUCCIÓN LACRIMAL BASAL EN LAS DISTINTAS CEPAS ESTUDIADAS: COMPARACIÓN POR SEXOS.....	- 112 -
FIGURA 27. PRODUCCIÓN LACRIMAL BASAL Y EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN MECÁNICA DE LA CórNEA EN RATONES TAC1-KO Y ACGRP-KO.....	- 113 -
FIGURA 28. LIBERACION DE NKA INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN DE LA CórNEA A LA CAPSAICINA.....	- 115 -
FIGURA 29. LIBERACIÓN DE ACGRP INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN DE LA CórNEA A LA CAPSAICINA.....	- 116 -
FIGURA 30. EFECTO DEL CO-CULTIVO DE HCEC CON CÉLULAS DEL TRIGÉMINO EN EL MODELO DE CICATRIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	- 119 -
FIGURA 31. CINÉTICA DE LA CICATRIZACIÓN EN CADA UNA DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i> .-	120 -
FIGURA 32. DETERMINACIÓN DE V_{MAX} Y T_{MAX} EN CADA UNA DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i> . -	121
-	
FIGURA 33. VELOCIDAD DE REDUCCIÓN DEL ÁREA DE LAS LESIONES DURANTE LA FASE LINEAL DE LA CICATRIZACIÓN, Y TIEMPO ESTIMADO DE CICATRIZACIÓN.....	- 122 -
FIGURA 34. EFECTO DE LA ADICIÓN DE CGRP HUMANO AL MEDIO DE CULTIVO DE HCEC EN EL MODELO DE CICATRIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	- 124 -
FIGURA 35. CICATRIZACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i>	126
FIGURA 36. EVOLUCIÓN DEL ÁREA DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> EN ANIMALES TAC1-KO, ACGRP-KO Y SUS CONTROLES.....	128
FIGURA 37. AJUSTE INDIVIDUAL DE LA CINÉTICA DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> AL MODELO PROPUESTO, EN FUNCIÓN DEL SEXO DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS.....	129
FIGURA 38. AJUSTE GLOBAL DE LA CINÉTICA DEL PROCESO DE CICATRIZACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> AL MODELO PROPUESTO, EN FUNCIÓN DEL SEXO DE LOS ANIMALES ESTUDIADOS.	130
FIGURA 39. DETERMINACIÓN DE V_{MAX} Y T_{MAX} DURANTE LA CICATRIZACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> , EN LAS DISTINTAS CEPAS.....	131
FIGURA 40. VELOCIDAD DE REDUCCIÓN DEL ÁREA Y TIEMPO ESTIMADO DE CICATRIZACIÓN DURANTE LA FASE LINEAL DE LA CURACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> EN LOS ANIMALES TAC1-KO, ACGRP-KO Y SUS CONTROLES.....	132
FIGURA 41. CINÉTICA DE LA CICATRIZACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> EN HEMBRAS NK1-KO Y SUS CONTROLES.....	134

FIGURA 42. DETERMINACIÓN DE V_{MAX} Y T_{MAX} DURANTE LA CICATRIZACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> , EN LOS ANIMALES NK1-KO Y SUS CONTROLES.....	135
FIGURA 43. VELOCIDAD DE REDUCCIÓN DEL ÁREA Y TIEMPO ESTIMADO DE CICATRIZACIÓN DURANTE LA FASE LINEAL DE LA CURACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> EN LOS ANIMALES NK1-KO Y SUS CONTROLES.	136
FIGURA 44. COMPARACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN DE LESIONES EXPERIMENTALES DEL EPITELIO CORNEAL <i>IN VIVO</i> , EN HEMBRAS TAC1-KO Y NK1-KO.	137
FIGURA 45.- EFECTO DEL ACGRP SOBRE LA CICATRIZACIÓN EPITELIAL: COMPARACIÓN INTRA-GRUPO.	139
FIGURA 46.- EFECTO DEL ACGRP SOBRE LA CICATRIZACIÓN EPITELIAL: COMPARACIÓN ENTRE CEPAS.	140
FIGURA 47.- EFECTO DEL ACGRP SOBRE LA APARICIÓN DE OPACIDAD CORNEAL: COMPARACIÓN INTRA-GRUPO.	141
FIGURA 48.- .- EFECTO DEL ACGRP SOBRE LA OPACIFICACIÓN CORNEAL: COMPARACIÓN ENTRE CEPAS.	142





RESUMEN

Desde hace aproximadamente dos siglos se conoce que la lesión de la división oftálmica del ganglio trigémino causa una disminución de la sensibilidad corneal, que, en ocasiones, se acompaña de alteraciones crónicas del epitelio de la córnea. Por ello, se ha especulado con que las neuronas sensoriales corneales puedan liberar sobre el epitelio factores moleculares que contribuyan al mantenimiento trófico basal del epitelio corneal o que estén implicados en la reparación de este, cuya identidad es desconocida. Por ello, este cuadro clínico, denominado «queratitis neurotrófica», está considerado actualmente una «enfermedad huérfana», para la cual sólo existen tratamientos paliativos. De modo indirecto se ha estimado que la queratitis neurotrófica tiene una prevalencia aproximada de 1.6 casos por cada 10000 habitantes en Europa, y en Italia supone unos costes sanitarios anuales de entre 5000 y 11000 € por paciente, según el grado de la patología. Extrapolando estos datos a nuestro contexto y considerando la población española en 2018, deben existir aproximadamente 7500 personas afectadas por esta patología en España, el coste de cuya atención sanitaria superaría los 37.5 millones de € anuales.

Con la finalidad de contribuir a identificar si los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 (sustancia P y neuroquinina A) y Calca (α CGRP) del ratón podrían ser moléculas candidatas a explicar el efecto trófico de las neuronas sensoriales sobre el epitelio corneal, en la presente Tesis Doctoral se han utilizado ratones *knockout* para la expresión de estas moléculas, en los que se ha estudiado el fenotipo ocular macro y microscópico, el funcionamiento de la vía nociceptiva corneal, la producción lacrimal y la cicatrización epitelial de la córnea tanto *in vivo*, como en un modelo *in vitro* desarrollado *ex profeso*.

Ni el desarrollo ocular general, ni, más concretamente, el de la córnea y su epitelio, parecieron alterados en las cepas *knockout* respecto a sus controles. Tampoco se observaron alteraciones en la respuesta aversiva evocada por la aplicación ocular tópica de capsaicina, ni en la lagrimación basal, aunque esta última no pareció guardar correlación interocular en ambas cepas de animales *knockout*, en contraste con lo que sucede en sus correspondientes controles. *In vivo*, los animales Tac1-KO, especialmente las hembras, mostraron una importante alteración de la cicatrización del epitelio corneal, en comparación con las otras dos cepas. Del mismo modo, la administración ocular tópica de α CGRP exógeno sobre lesiones epiteliales corneales realizadas tanto en animales α CGRP-KO, como en sus controles, retrasó la cicatrización y produjo una importante opacificación corneal. Análogamente, la adición de α CGRP al medio en el que se cultivaban células epiteliales corneales humanas causó el despegamiento de estas del fondo de los correspondientes pocillos.

Por ello, se puede concluir que la eliminación experimental de los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 y Calca del ratón no parece causar grandes cambios fenotípicos estructurales o funcionales sobre el desarrollo del ojo del ratón. Ello excluiría la participación de estas moléculas sobre el mantenimiento basal del epitelio corneal. Del mismo modo, la ausencia en estos animales de alteraciones de la lacrimación o de la sensibilidad nociceptiva corneal permite excluir en nuestro modelo experimental dos de los grandes sesgos de los modelos previos. Sin embargo, los neuropéptidos codificados en el gen Tac1 (presumiblemente la sustancia P), parecen necesarios para el adecuado desarrollo de la cicatrización de las lesiones del epitelio corneal. Este efecto no parece directo sobre las células epiteliales, sino que necesita de otras estructuras oculares, puesto que solo se observa *in vivo*, pero no *in vitro*. Del mismo modo, el α CGRP parece alterar la cicatrización epitelial, tanto *in vivo* como *in vitro*. Puesto que se ha documentado previamente que la sustancia P puede contribuir a limitar la actividad biológica del α CGRP, se propone que la ausencia de aquella en los animales Tac1-KO podría estar causando elevaciones de este, lo que podría explicar la alteración de la cicatrización epitelial de la córnea que estos animales presentan.



RESUM

Des de fa aproximadament dos segles es coneix que la lesió de la divisió oftàlmica del gangli trigemin causa una disminució de la sensibilitat corneal, que, de vegades, s'acompanya d'alteracions cròniques de l'epiteli de la còrnia. Per això, s'ha especulat amb que les neurones sensorials corneals puguen alliberar sobre l'epiteli factors moleculars que contribueixen al manteniment tròfic basal de l'epiteli corneal o que estiguen implicats en la reparació d'aquest, la identitat dels quals és desconeguda. Aquest quadre clínic, denominat «queratitis neurotròfica», està considerat actualment una «malaltia òrfena», per a la qual només existeixen tractaments pal·liatius. De manera indirecta s'ha estimat que la queratitis neurotròfica té una prevalença aproximada de 1.6 casos per cada 10000 habitants a Europa, i a Itàlia suposa uns costos sanitaris anuals d'entre 5000 i 11000 € per pacient, segons el grau de la patologia. Extrapolant aquestes dades al nostre context i considerant la població espanyola en 2018, ha d'haver-hi aproximadament 7500 persones afectades per aquesta patologia a Espanya, el cost de l'atenció sanitària de les quals superaria els 37.5 milions d'€ anuals.

Amb la finalitat de contribuir a identificar si els neuropèptids codificats en els gens Tac1 (substància P i neuroquinina A) i Calca (α CGRP) del ratolí podrien ser molècules candidates a explicar l'efecte tròfic de les neurones sensorials sobre l'epiteli corneal, en la present Tesi Doctoral s'han utilitzat ratolins *knockout* per a l'expressió d'aquestes molècules, en els quals s'ha estudiat el fenotip ocular macro i microscòpic, el funcionament de la via nociceptiva corneal, la producció lacrimal i la cicatrització epitelial de la còrnia tant *in vivo*, com en un model *in vitro* desenvolupat expressament.

Ni el desenvolupament ocular general, ni, més concretament, el de la còrnia i el seu epiteli, van presentar alteracions en els animals *knockout* respecte als seus controls. Tampoc es van observar alteracions en la resposta aversiva evocada per l'aplicació ocular tòpica de capsaïcina ni en la lacrimació basal, encara que en aquesta última variable no es va observar una correlació interocular en els dos ceps d'animals *knockout*, en contrast amb lo que passa en els seus corresponents controls. *In vivo*, els animals Tac1-KO, especialment les femelles, van mostrar una important alteració de la cicatrització de l'epiteli corneal, en comparació amb els altres dos ceps. De la mateixa manera, l'administració ocular tòpica de α CGRP exogen sobre lesions epitelials corneals realitzades tant en animals α CGRP-KO, com en els seus controls, va retardar la cicatrització i va produir una important opacificació corneal. Anàlogament, l'addició d' α CGRP al medi en el qual es cultivaven cèl·lules epitelials corneals humanes va causar el desenganxament d'aquestes del fons dels corresponents pouets.

Per lo tant, es pot concloure que l'eliminació experimental dels neuropèptids codificats en els gens Tac1 i Calca del ratolí no sembla causar grans canvis fenotípics estructurals o funcionals sobre el desenvolupament de l'ull d'aquesta espècie animal. Això exclouria la participació d'aquestes molècules sobre el manteniment basal de l'epiteli corneal en el ratolí. De la mateixa manera, l'absència en aquests animals d'alteracions de la lacrimació o de la sensibilitat nociceptiva corneal permet excloure en el nostre model experimental dues de les grans limitacions dels models previs. No obstant això, els neuropèptids codificats en el gen Tac1 (presumiblement la substància P), semblen necessaris per a l'adequat desenvolupament de la cicatrització de les lesions de l'epiteli corneal. Aquest efecte no sembla directe sobre les cèl·lules epitelials, sinó que necessita d'altres estructures oculars, ja que només s'observa *in vivo*, però no *in vitro*. De la mateixa manera, el α CGRP sembla alterar la cicatrització epitelial, tant *in vivo* com *in vitro*. Atès que s'ha documentat prèviament que la substància P pot contribuir a limitar l'activitat biològica del α CGRP, es proposa que l'absència d'aquella en els animals Tac1-KO podria estar causant elevacions d'aquest, lo que podria explicar l'alteració de la cicatrització epitelial de la còrnia que aquests animals presenten.



ABSTRACT

During the last two centuries it has been well established that injury to the ophthalmic division of the trigeminal ganglion causes a decrease in corneal sensitivity, which is sometimes accompanied by chronic alterations of the corneal epithelium. Therefore, it has been suggested that corneal sensory neurons could release molecular mediators onto the epithelium that may contribute to its basal trophic maintenance or wound healing. However, the precise molecules responsible of these actions are unknown.

In clinical ophthalmology, this disease is called "neurotrophic keratitis". Given its unknown molecular nature, neurotrophic keratitis is currently considered an "orphan disease". Indirectly, it has been estimated that its prevalence is around 1.6 cases per 10000 inhabitants in Europe. The estimated annual health costs of its treatment in Italy range between € 5000 and € 11000 per patient, depending on the degree of the disease. Extrapolating these data to Spain and considering the Spanish population in 2018, there should be approximately 7500 people affected by this pathology in Spain, whose health care cost would exceed € 37.5 million per year.

In order to help identify whether the neuropeptides encoded in the genes Tac1 (substance P and neurokinin A) and Calca (α CGRP) of the mouse could be candidate molecules to explain the trophic effect of sensory neurons on the corneal epithelium, in the present Doctoral Thesis knockout mice for the expression of these molecules have been used. In these strains the macro and microscopic ocular phenotype, the ocular nociception, the tear production, and the corneal epithelium wound healing –using both *in vivo* and *in vitro* models developed *ex profeso*- were studied.

Neither the general ocular development, nor, more specifically, that of the cornea and its epithelium, appeared altered in the knockout strains compared with control animals. Similarly, there were no alterations in the aversive response evoked by the topical ocular application of capsaicin. Also, although the basal tear rate was unaffected in both strains of knockout animals, no interocular correlation was found in contrast to what happened in their corresponding controls. *In vivo*, the Tac1-KO animals, especially females, showed an important impairment of corneal epithelium wound healing, not observed in the other two strains. Likewise, topical ocular administration of exogenous α CGRP delayed significantly corneal epithelial wound healing and produced significant corneal opacification in both α CGRP-KO and control mice. Analogously, the addition of α CGRP to the medium caused the detachment of cultured human corneal epithelial cells.

Therefore, it can be concluded that the experimental elimination of the neuropeptides encoded in the mouse Tac1 and Calca genes does not seem to cause major structural or functional phenotypic changes in the development of the mouse eye. This would exclude the participation of these molecules on the basal maintenance of the corneal epithelium. Additionally, the two major biases of previous models, namely, alterations of the tear production and of the corneal sensory pathway, were absent in these animals. In contrast, the neuropeptides encoded in the Tac1 gene (presumably substance P), seem necessary for the proper healing of corneal epithelial lesions. This seems to be an indirect effect on corneal epithelial cells, because it is only observed *in vivo*, but not *in vitro*. In contrast, α CGRP appears to impair corneal epithelial wound healing, both *in vivo* and *in vitro*. Therefore, these results may support the idea that the absence of SP could be increasing the biological activity of α CGRP, as previously documented, which could explain the alteration of epithelial healing of the cornea seen in these animals.



1. INTRODUCCION

*MH Miguel
Hernández*



1.1 Contextualización.

1.1.1 La «nocifensión»: una «función eferente» de los nociceptores.

Una de las propiedades fundamentales que definen a la materia viva es la de su capacidad de relación con el medio en el que se encuentra. Desde los elementos unicelulares más sencillos a los más complejos vertebrados, todos los organismos vivos comparten la capacidad de poder detectar las variaciones fisicoquímicas tanto de su medio ambiente externo como, en el caso de los seres pluricelulares, de su medio interno. En Fisiología se denomina a dichas variaciones, *estímulos*.

En los animales, la detección de los diferentes tipos de estímulos, procedentes tanto del medio ambiente como del medio interno, recae en un tipo heterogéneo de neuronas, denominadas, en su conjunto, *neuronas sensoriales primarias*. Las neuronas sensoriales primarias son células especializadas en la detección de diferentes energías fisicoquímicas, su transducción -mediante cambios en las propiedades eléctricas de su membrana celular-, codificación y transmisión hacia el Sistema Nervioso Central (en adelante, SNC) en forma de potenciales de acción. La integración de estos potenciales de acción en el SNC permite que se puedan desencadenar toda una serie de respuestas cuya finalidad es mantener la homeostasis de las condiciones necesarias para que dicho organismo pueda seguir manifestando sus propiedades vitales. En los vertebrados, al menos, en el caso de que dicha información llegue hasta la corteza cerebral sensorial primaria, se produce la percepción consciente de dichos estímulos.

Los estímulos que, por su intensidad, pudieran potencialmente alterar la unidad estructural que representa el organismo vivo, reciben el nombre de *estímulos nocivos*. Por extensión, se denomina *nocicepción* (del latín, *noxious*, perjudicial, y *perceptio*, acción de percibir) a la capacidad de los organismos vivos para poder detectar los estímulos nocivos, y *respuestas nociceptivas* a las desencadenadas por el organismo vivo tras la detección de dichos estímulos nocivos. Las respuestas nociceptivas –como, por ejemplo, las respuestas motoras reflejas de retirada o la inmovilización de zonas lesionadas en posiciones antiálgicas- tienen un carácter eminentemente adaptativo, cuyo fin primordial es mantener la integridad del organismo y garantizar su supervivencia, bien limitando la magnitud del daño, o bien favoreciendo la reparación de los tejidos lesionados.

Tanto la nocicepción como el conjunto de respuestas adaptativas que desencadena, han alcanzado un grado de refinamiento y complejidad máximos en las especies englobadas en el

Reino Animal. Así, en los seres vivos se han desarrollado sistemas de detección, transducción, codificación y amplificación de los estímulos que filogenéticamente oscilan desde especializaciones de la membrana celular directamente acopladas a los mecanismos intracelulares que median las correspondientes respuestas -en organismos unicelulares, como los protozoos-, hasta complejas vías nerviosas en los primates, que, en el caso de nuestra especie, generan respuestas de tipo motor, autonómico, emocional y cognitivo (E. Smith & Lewin, 2009).

En la especie humana, a la experiencia sensorial desencadenada por los estímulos nocivos, que se caracteriza por presentar un marcado carácter emocional desagradable y por asociarse a un daño tisular, real o potencial, o que se describe como si se estuviera produciendo dicho daño, se la denomina *dolor* (IASP, 2011). El estudio de la fisiología de las sensaciones dolorosas ha estado limitado durante mucho tiempo por la divergencia existente en el pensamiento científico en cuanto a la consideración de la nocicepción como modalidad somato-sensorial independiente (Perl, 2007). La aceptación del dolor como una más entre ellas implica que, al igual que para las restantes, las vías nerviosas nociceptivas deberían seguir el principio de la especificidad, propuesto por Johannes Müller en 1840 (Perl, 2007). Esto es, las sensaciones dolorosas deben de producirse como consecuencia de la activación de unas vías nerviosas determinadas por unos estímulos concretos, para los que son específicas.

Las neuronas sensoriales primarias son pseudomonopolares, esto es, presentan un soma -localizado, bien en uno de los ganglios raquídeos (en el territorio somático), o bien en el ganglio trigémino, o de Gasser (en el territorio cefálico)- del cual surge un axón que se bifurca en dos ramas, funcional y morfológicamente diferenciadas. Una de las ramas axónicas: a) se dirige hacia la periferia del organismo, o hacia el tejido somático o visceral al que la neurona dota de sensibilidad; b) está especializada, esto es, posee los mecanismos necesarios para la detección de los estímulos, su transducción y codificación; y c) puede asociarse a terminaciones sensoriales con una morfología particular, o bien acabar sin especialización morfológica alguna, es decir, en forma de *terminaciones libres* imbricadas entre las células del tejido al que dotan de sensibilidad. Por su parte, la otra rama: a) se dirige hacia el SNC; b) termina en sinapsis excitadoras, en la correspondiente lámina del asta posterior de la médula espinal o en el troncoencéfalo; y c) está modulada en su función por otras neuronas descendentes o por interneuronas (Purves, 2003). Las neuronas sensoriales primarias se clasifican en función de las energías fisicoquímicas para las que son más sensibles, esto es, para las cuales su umbral de detección es menor. Así, se distinguen neuronas mecanorreceptoras, termorreceptoras y quimiorreceptoras. Además, se consideran para su clasificación otros aspectos, como el grado de mielinización de sus prolongaciones axónicas -íntimamente relacionado con algunas de sus propiedades eléctricas, como su velocidad

de conducción-, o la especialización morfológica de sus terminaciones periféricas, que se asocia a la especificidad de detección de diferentes tipos de estímulos. Desde la médula espinal, la información sensorial asciende mediante vías específicas hacia porciones de mayor complejidad funcional del SNC. Recientemente, mediante el análisis del transcriptoma individual de neuronas sensoriales primarias sin conocer *a priori* sus características funcionales, se ha propuesto que en el ratón podrían llegar a existir hasta once tipos funcionales distintos de neuronas sensoriales primarias (Usoskin et al., 2014).

Desde un punto de vista funcional, existe una subpoblación de neuronas sensoriales primarias que se activa característicamente ante estímulos fisicoquímicos cuya intensidad es potencialmente lesiva para el organismo, a las que se denomina *neuronas nociceptivas primarias*, o, simplemente, *nociceptores* (E. Smith & Lewin, 2009). Las neuronas nociceptoras primarias se caracterizan por poseer umbrales de activación altos (es decir, por activarse cuando la intensidad de los estímulos está en el rango nocivo o potencialmente lesivo para el correspondiente organismo), no estar mielinizadas o estarlo débilmente y, consecuentemente, conducir los impulsos nerviosos en el rango de las neuronas A δ (2-20 m·s⁻¹) o C (<2 m·s⁻¹), según la clasificación de Erlanger y Gasser (Erlanger, Bishop, & Gasser, 1926). Además, los nociceptores se subclasifican en función del tipo de energía para el que son más sensibles. Así, se distinguen: *a) mecanonociceptores*: aquellos que responden exclusivamente a estímulos mecánicos; *b) termonociceptores*: aquellos que son activados preferentemente por estímulos de naturaleza térmica; y *c) nociceptores polimodales*: aquellos que son excitados por estímulos de diferentes modalidades (mecánica, térmica o química). Del mismo modo, para identificarlas se han utilizado otras características morfológicas (como el tamaño y el grado de tinción del soma) y bioquímicas, como la presencia de neurofilamentos RT97 o su contenido en diferentes *neuropéptidos*.

La rama periférica de las neuronas nociceptivas primarias termina imbricada entre las células del tejido al que dota de sensibilidad, sin especialización morfológica aparente, esto es, en forma de terminaciones libres. Por su parte, la rama central termina en las láminas I y II de Rexed del asta posterior de la sustancia gris de la médula espinal, estableciendo una sinapsis excitadora sobre una *neurona sensorial de segundo orden*, cuya eficiencia puede estar modulada por interneuronas locales, o por sinapsis de vías descendentes, fundamentalmente de tipo inhibitorio. La información nociceptiva codificada en este nivel asciende a niveles superiores del SNC a través de la vía espinotalámica lateral, llegando finalmente a la corteza somatosensorial contralateral. Tras su procesamiento cortical, los estímulos que causan la activación de los nociceptores primarios evocan sensaciones conscientes de dolor en los seres humanos, además de una serie de respuestas vegetativas o conductuales aversivas, que pueden reproducirse en animales de

experimentación expuestos a los mismos. Por todo ello, en estos momentos se considera la nocicepción como una modalidad sensorial específica (Perl, 2007). Recientemente se ha identificado una región en la amígdala basolateral cuya activación puede explicar el carácter desagradable de las sensaciones dolorosas (Corder et al., 2019).

Desde la hipótesis de la «polarización dinámica» neuronal de Santiago Ramón y Cajal en 1891, se acepta que la función neuronal implica la detección de estímulos en una zona aislada y concreta de la neurona (el árbol dendrítico), su codificación en forma de potenciales de acción, y su transmisión a través del axón hacia otra región de la misma célula (la terminación presináptica), donde a través de un mecanismo de comunicación paracrina (la sinapsis química) dicha información es transferida hasta el árbol dendrítico de la siguiente neurona. Por lo tanto, se considera que, en las neuronas sensoriales primarias, incluyendo los nociceptores, el flujo ortodrómico de información sensorial, en forma de potenciales de acción, es aferente, es decir, se dirige desde la periferia hacia el SNC (figura 1, A). Sin embargo, en 1913 Ninian Bruce (Bruce, 1913) observó que la respuesta inflamatoria desencadenada por la aplicación de mostaza nitrogenada sobre la superficie ocular desaparecía cuando el ojo estaba anestesiado o se había causado la degeneración de su inervación sensorial. Para explicar sus observaciones propuso que los cambios eléctricos que se generaban en una de las ramas de los nervios sensoriales, además de conducirse centrípetamente hacia el SNC, podrían conducirse también antidrómicamente invadiendo ramas colaterales del mismo nervio, en lo que denominó un «reflejo axónico» (*axon reflex*, figura 1, B). Unos años después sería Lewis -a quien se debe también la descripción de los componentes de la reacción inflamatoria a la lesión (edema, eritema e hiperalgesia de las zonas adyacentes) (Sousa-Valente & Brain, 2018)-, quien propondría el término «nocifensión» (T. Lewis, 1937b, 1937a) para referirse a este tipo de respuestas defensivas locales, mediadas por la inervación sensorial nociceptiva, en respuesta a estímulos lesivos. A partir de los años 60 del pasado siglo XX, los estudios de Gabor Jancsó encaminados a descubrir las moléculas mediadoras de estos efectos, usando inicialmente la mostaza nitrogenada como agente inflamatorio, y, posteriormente, la capsaicina (Sousa-Valente & Brain, 2018), abrieron una nueva época en la investigación sobre estos fenómenos (genéricamente denominados «inflamación neurogénica»), que se prolonga hasta nuestros días.

En la actualidad se asume que la inflamación neurogénica está mediada por la liberación local desde las terminaciones periféricas de las neuronas nociceptivas de un complejo y heterogéneo conjunto de moléculas, y por la expresión dinámica de sus receptores, para las cuales se proponen otras funciones auto o paracrinas (Carlton, 2014). La liberación de estas moléculas desde las terminaciones periféricas de los nociceptores no se realiza por sinapsis

clásicas, sino por lo que se denomina «transmisión por volumen», es decir, una vez liberadas al medio extracelular estas sustancias difunden en un volumen tridimensional contribuyendo, por tanto, a crear un microambiente molecular alrededor de las células del tejido que inervan (Carlton, 2014), tanto en condiciones basales, como en respuesta a la lesión tisular. A estas funciones se las ha denominado también «funciones eferentes» de los nociceptores (Lynn, 1996).

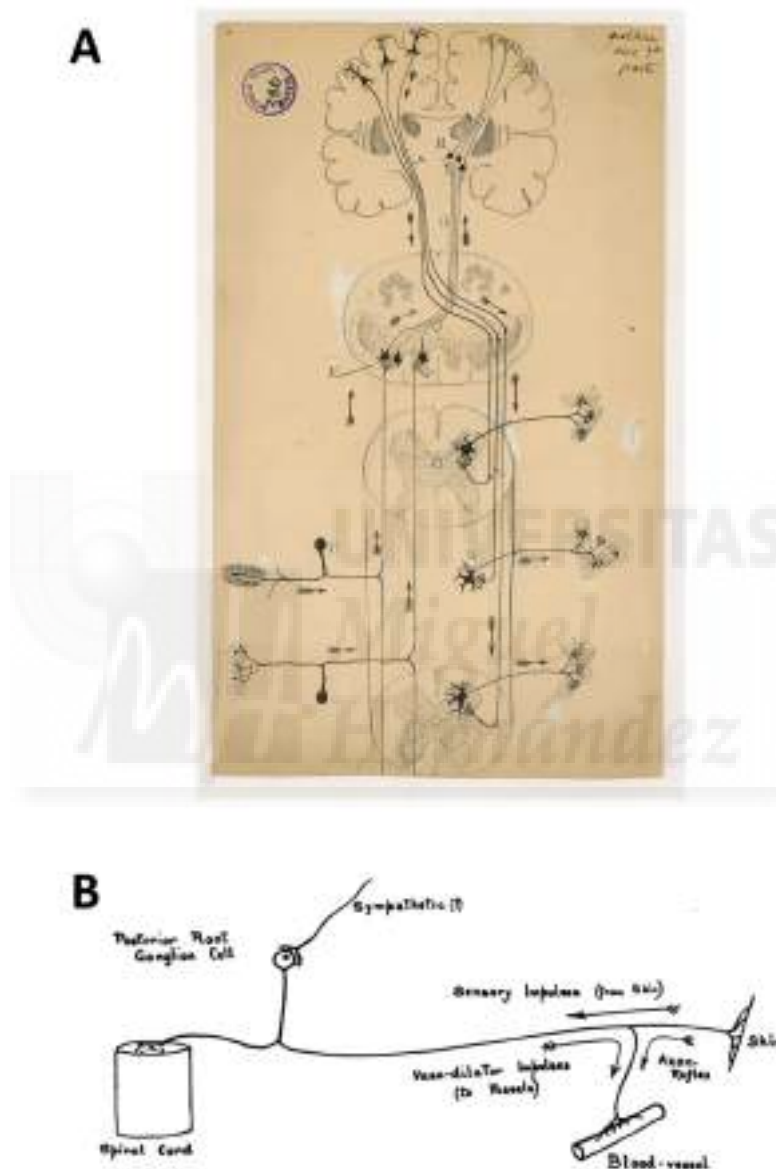


Figura 1. El concepto de «reflexo axónico».

A: Dibujo original de Santiago Ramón y Cajal ilustrando los flujos de información en el sistema nervioso: las neuronas sensoriales primarias, periféricas, envían información aferente hacia el sistema nervioso central (cortesía del Instituto Cajal, Legado Cajal, CSIC, Madrid; reproducida con autorización). B: Dibujo original del concepto de «reflejo axónico» de Ninian Bruce (Bruce, 1913). La activación del soma de las neuronas sensoriales podría invadir de manera antidrómica sus ramificaciones axónicas periféricas. Estas mismas ramificaciones podrían ser invadidas por los potenciales de acción generados en ramas colaterales durante su conducción ortodrómica (Reproducido con permiso de John Wiley and Sons).

1.1.2 Influencia de las neuronas sensoriales primarias sobre el mantenimiento de la homeostasis del epitelio corneal: la «queratitis neurotrófica».

En clínica humana se conocen diferentes situaciones en las que la pérdida de la inervación sensorial se asocia a la aparición de lesiones crónicas de los tejidos denervados. Por ejemplo, en la evolución de la diabetes puede producirse una neuropatía, sensorial, motora o mixta, que se asocia al desarrollo de lesiones cutáneas que afectan prioritariamente a la región del pie, situación clínica que suele denominarse «pie diabético». En el ojo, de modo análogo, la pérdida de función de la inervación sensorial ocular somatosensorial por causas diversas como el abuso de los anestésicos, las infecciones por virus de la familia del herpes, las lesiones quirúrgicas de la primera rama del trigémino, etc., pueden provocar un cuadro clínico denominado «queratitis neurotrófica o neuroparalítica» (Sacchetti & Lambiase, 2014; Semeraro et al., 2014).

Se atribuye al fisiólogo francés François Magendie la primera descripción experimental de este fenómeno en 1824 (Georgette, 1983). Magendie pudo comprobar que, en conejos a los que sometió a una lesión quirúrgica experimental del ganglio trigémino, aparecían alteraciones epiteliales de la córnea ipsilateral, cuyo desarrollo no se podía impedir realizando una tarsorrafia. Debido a que las lesiones no parecían deberse al desecamiento de la superficie corneal secundario a la alteración de la lagrimación refleja, Magendie propuso que las neuronas sensoriales corneales debían ejercer un papel trófico sobre los tejidos oculares, en particular, sobre el epitelio corneal (Georgette, 1983).

Por analogía con los mecanismos nerviosos que explican el «reflejo axónico» de Bruce, se ha propuesto que en condiciones fisiológicas, la actividad eléctrica de las neuronas sensoriales de la córnea podría invadir ramas colaterales de las mismas (Carlos Belmonte, Aracil, Acosta, Luna, & Gallar, 2004), lo que provocaría la liberación sobre el epitelio corneal de las sustancias tróficas preconizadas por Magendie. Sin embargo, la naturaleza de las moléculas que, liberadas desde las neuronas corneales, explicarían dicho efecto trófico sigue sin dilucidarse.

Debido a ello actualmente se considera a la queratitis neurotrófica en el espectro de las «enfermedades raras o huérfanas» (Orphanet nº 137596) (Rama & Sacchetti, n.d.). La queratitis neurotrófica se desarrolla en tres etapas clínicas (Sacchetti & Lambiase, 2014): a) una primera fase de alteraciones epiteliales; b) una segunda fase con presencia de defectos epiteliales permanentes; y, c) una tercera fase donde las úlceras corneales son constantes, y pueden llevar, incluso, a la perforación corneal. En su etiopatogenia parece participar no sólo la ausencia de las

presuntas moléculas tróficas que serían liberadas desde las terminaciones nerviosas de la córnea, sino, también, la alteración de los reflejos de protección ocular, como la lacrimación o el parpadeo (Mastropasqua, Massaro-Giordano, Nubile, & Sacchetti, 2017). De manera indirecta se ha estimado que en Europa la prevalencia de la queratitis neurotrófica oscilaría alrededor de 1.6 casos / 10000 habitantes (Sacchetti & Lambiase, 2014). Recientemente se ha publicado el único artículo en el que se ha estimado el coste sanitario asociado a la misma, en concreto en Italia (Stanisic et al., 2018). Según la gravedad de esta patología, en dicho país el coste sanitario, tanto relacionado con las consultas médicas como con los tratamientos utilizados, puede oscilar desde los más de 5000 € por paciente y año en las formas leves, hasta más de 11000 € al año en las formas graves. Extrapolando estos datos a la población española en 2018, en estos momentos debe haber en nuestro país cerca de 7500 personas afectadas por esta patología. Considerando un coste mínimo de la atención sanitaria para estas personas de 5000 € al año, el coste sanitario asociado a la queratitis neurotrófica en España debe superar los 37.5 millones de € al año en estos momentos.

El trabajo experimental recopilado en la presente memoria pretende contribuir a identificar si los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 y Calca del ratón pueden estar entre las moléculas que expliquen esta aparente dependencia trófica de las células epiteliales corneales de las neuronas sensoriales que inervan el epitelio corneal. Debido a que una de las características centrales de la queratitis neurotrófica es la incapacidad de cicatrización de las lesiones epiteliales, en concreto se explorará el papel de estos neuropéptidos sobre la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal.

1.2 La córnea.

La córnea es la estructura semiesférica transparente situada en el polo anterior del globo ocular. En su límite periférico -el limbo esclero-corneal-, esta semiesfera se continúa con la conjuntiva bulbar, en superficie, y con la esclerótica más profundamente. La córnea permite el paso de la luz hacia el interior de ojo, contribuyendo a su apropiada focalización sobre la retina. En el humano presenta un poder dióptrico de unas 43 dioptrías, esto es, aproximadamente 3/4 del poder total de refracción del ojo. Por ello, en condiciones de normalidad la córnea ha de mantenerse perfectamente transparente. Esta transparencia se consigue mediante: 1) el diámetro homogéneo y la particular disposición de las fibras de colágeno que forman su estroma; 2) el estrecho control de su estado de hidratación; y 3) la ausencia en la córnea de otras estructuras anexas, como vasos sanguíneos o pelos. Por ello, la simplicidad estructural de la

córnea la convierte en un modelo ideal para el estudio de interacciones de diferentes moléculas con los escasos tipos celulares que la componen. Del mismo modo, se considera que el epitelio corneal es el tejido superficial con mayor densidad de inervación sensorial del organismo (Carlos Belmonte, Tervo, & Gallar, 2011). Debido a que clásicamente se ha considerado que la estimulación sensorial de la córnea evocaba únicamente sensaciones de dolor, es uno de los tejidos utilizado para estudiar el origen de las sensaciones dolorosas. Por tanto, debido a ambas características la córnea se considera un tejido idóneo para el estudio de las respuestas nocifensivas locales, especialmente las producidas por la liberación de mediadores extracelulares desde las neuronas sensoriales que pudieran actuar sobre los tejidos corneales.

1.2.1 Desarrollo embriológico.

Aunque aún existe debate sobre la temporalización y el origen preciso de los diferentes tejidos que la forman (Dhouailly, Pearton, & Michon, 2014; Lwigale, 2015), se considera que el desarrollo embriológico de la córnea humana comienza entre las semanas 4-5 de gestación. Las células del epitelio corneal parecen derivar de las células del neuroectodermo que recubre la vesícula óptica durante los estadios iniciales de su desarrollo. El epitelio primitivo, de dos capas de células, segrega una primera capa post-epitelial: el primitivo estroma. Alrededor de la semana 12 de gestación el epitelio comienza a tener cuatro capas de células. Sobre la semana 20 de gestación comienza a aparecer la capa de Bowman, y en la semana 26 se produce la apertura ocular, y el epitelio comienza a producir su propia membrana basal. El epitelio sigue manteniendo la estructura de cuatro capas hasta, aproximadamente, los seis meses de vida extrauterina, cuando adquiere ya la configuración adulta, de entre cuatro y seis capas (Dawson, Ubels, & Edelhauser, 2011).

Por su parte, el desarrollo del endotelio primitivo comienza también a las 5 semanas de vida intrauterina. Una primera oleada de células mesenquimales derivadas de la cresta neural migra desde el limbo y se dispone inicialmente en dos capas. Sobre la semana 8 se pierde una de las capas, y se comienza a sintetizar la membrana de Descemet. Hasta la semana 7, ambos, el epitelio y el endotelio primitivos están adyacentes uno al otro. En ese momento, una segunda oleada de células mesenquimales migra desde el limbo y se interpone entre ambos, dando lugar al estroma primitivo. Estas células comienzan a producir el estroma a los pocos días (Dawson et al., 2011).

Sobre las 12 semanas de vida intrauterina, los nervios corneales invaden el estroma y progresivamente penetran la membrana basal, llegando al epitelio, donde se van desarrollando

sus terminaciones libres. Sobre los siete meses de gestación, la córnea tiene la estructura típica del individuo adulto (Dawson et al., 2011), que se describe a continuación.

1.2.2 Estructura general de la córnea adulta.

En la córnea humana totalmente desarrollada se distinguen tres capas fundamentales, que de superficie a profundidad son: a) el epitelio; b) el estroma; y c) el endotelio. Entre el epitelio y el estroma existe zona de especial organización del estroma, denominada capa de Bowman, y una pequeña membrana que sirve como punto de anclaje del epitelio. Por su parte, entre el estroma y el endotelio existe otra de estas membranas, con función análoga, la membrana de Descemet. La facilidad de separación de la membrana de Descemet y el endotelio corneal, del resto del estroma, que facilita el trasplante de dichas estructuras, ha permitido sugerir la existencia de una capa adicional, la capa de Dua, entre la membrana de Descemet y la capa más interna de queratocitos del estroma corneal (Dua, Faraj, Said, Gray, & Lowe, 2013).

En su superficie, el epitelio corneal está bañado por la película lacrimal, en concreto por su capa más profunda, la mucosa, cuyos componentes son producidos fundamentalmente por las células caliciformes («*goblet cells*») de la conjuntiva. Por su parte, el endotelio está bañado por el humor acuoso de la cámara anterior, producido por el cuerpo ciliar. Ambos compartimentos líquidos son esenciales para la nutrición y oxigenación de los tejidos corneales.

1.2.2.1 Epitelio corneal.

El epitelio corneal es un epitelio plano poliestratificado no queratinizado, cuya ultraestructura varía en función de la especie. El epitelio parece derivar embriológicamente de la interacción de las vesículas ópticas neuroectodérmicas y el ectodermo craneal (Lwigale, 2015; McKenna & Lwigale, 2011). En el adulto, el epitelio corneal está compuesto por entre 5 y 7 capas de células, que, en conjunto, miden unas 50 micras en la córnea humana, lo que representa alrededor del 10% del espesor total de la córnea. De profundidad a superficie, las células epiteliales están organizadas en tres capas: a) las células basales; b) las intermedias; y c) las superficiales. Las células basales forman una monocapa de células columnares fijada a la membrana basal que separa el epitelio de la capa de Bowman. Su principal rasgo ultraestructural es su citoesqueleto, con abundantes filamentos de actina, microtúbulos y filamentos de queratina. Las células intermedias, o alares, que ocupan dos o tres capas en la parte central de la córnea, y cuatro o cinco en la periferia, representan un estado de transición entre las basales y las superficiales. Son poligonales y su núcleo se dispone paralelo a la superficie ocular. Por último,

las células superficiales son las más diferenciadas del epitelio corneal: tienen un aspecto alargado y aplanado, y se distribuyen en dos o tres capas, en la más superficial de las cuales predominan las células más maduras, que van a descamarse. Estas células superficiales son anucleadas, y poseen en su membrana apical microvellosidades y micropilis, así como un glicocálix que sirve de soporte a la capa mucosa, la más profunda, de la película lacrimal.

Este epitelio está en constante renovación. De acuerdo a la «hipótesis XYZ» (Thoft & Friend, 1983) la población celular que lo constituye se mantiene en un equilibrio dinámico por la equiparación de la pérdida de células de las capas más superficiales, con la proliferación y posterior migración de las células desde la capa basal hacia la superficial (figura 2, A). A su vez, las células basales serían continuamente reemplazadas desde la periferia de la córnea, aunque la fuente de estas no era conocida en el momento de formularse dicha hipótesis.

Con posterioridad se identificó en el limbo esclero-corneal una población de células epiteliales, en principio conjuntivales, que retienen el marcador de proliferación celular Bromo-deoxi-Uridina (en adelante, BrdU) (Cotsarelis, Sun, & Lavker, 1990; Schermer, Galvin, & Sun, 1986). Estas células expresan marcadores propios de células indiferenciadas (como ABCG2 y ABCB5 o las citoqueratinas 14 o 5), y no expresan las de las células epiteliales corneales maduras (como las citoqueratinas 3 o 12) (Hertsenberg & Funderburgh, 2015). En la actualidad, se considera a estos nichos celulares limbales como el reservorio de células madre, o troncales, del epitelio corneal (Di Girolamo et al., 2015; Ksander et al., 2014; T.-T. Sun, Tseng, & Lavker, 2010; Yoon, Ismail, & Sherwin, 2014), aunque se ha postulado también la existencia de células con capacidad clonogénica extendidas a lo largo de todo el epitelio corneal, el limbal y el conjuntival (Majo, Rochat, Nicolas, Jaoudé, & Barrandon, 2008).

Integrando ambas observaciones, Lavker y colaboradores (Lavker, Tseng, & Sun, 2004) han propuesto un modelo del mantenimiento de la homeostasis de la celularidad del epitelio corneal, basado en la existencia de las denominadas células «*transient amplifying*», derivadas de las células madre limbales y con capacidad tanto para migrar hacia el centro de la córnea, como para diferenciarse en células de las capas más superficiales (figura 2, B).

En profundidad, el epitelio corneal se fija a la siguiente capa –el estroma- mediante una membrana basal, sintetizada por las propias células basales epiteliales. Bioquímicamente, la membrana basal está constituida por colágeno IV y proteoglicanos asociados a varias proteínas (entactina, laminina, fibronectina y osteonectina). Al microscopio electrónico puede observarse en la membrana basal dos capas: una superficial, menos densa electrónicamente y adosada a la capa celular –la lámina lúcida-, y otra profunda, denominada lámina densa. Entre otras posibles

funciones, esta membrana sirve de guía para la migración celular, de soporte para la adhesión celular y de membrana semipermeable. La membrana basal se continúa en profundidad con la capa de Bowman. Ésta se desarrolla durante el cuarto mes de vida embrionaria, probablemente sintetizada también por las células basales epiteliales. Sin embargo, en etapas posteriores estas células ya no son capaces de regenerarla, de manera que, en caso de resultar dañada, se genera un tejido cicatricial que origina opacidades permanentes. La capa de Bowman está compuesta por fibras de colágeno tipos IV, V, VI y VII que presentan una estriación transversal y que se encuentran repartidas al azar en una sustancia fundamental constituida por mucoproteínas similares a las del estroma, con el que se continúa en profundidad (Tamura, Konomi, Sawada, Takashima, & Nakajima, 1991).

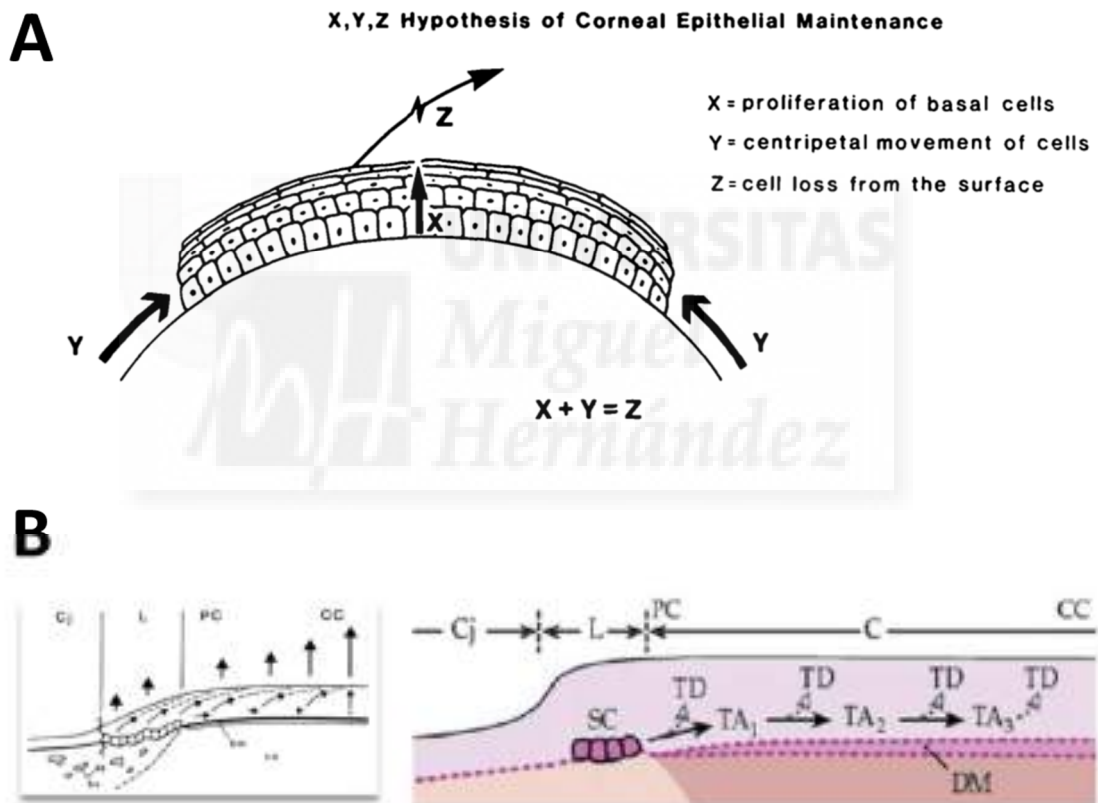


Figura 2. Homeostasis de la celularidad del epitelio corneal.

A: modelo XYZ de Thoft y Friend (Thoft & Friend, 1983) (reproducido con permiso de la Association for Research in Vision and Ophthalmology). La celularidad del epitelio corneal se mantiene en homeostasis por el equilibrio dinámico entre la migración de las células epiteliales y su proliferación, con la descamación de las células epiteliales de las capas más superficiales. B: modelo de Lavker y cols (Lavker et al., 2004) (reproducido con permiso de Elsevier). Izquierda: la descamación de células epiteliales corneales desde la superficie sería mayor en el centro (CC) que en la periferia (PC) de la córnea, lo que contribuiría a generar un gradiente favorable a la migración de las células epiteliales desde el limbo hacia el centro de la córnea. Derecha: Las células madre limbales («stem cells», SC) se diferenciarían a células «transient amplifying» (TA), las cuales, a su vez, podrían seguir proliferando antes de entrar en un estado de diferenciación terminal (TD).

Entre sí, las células epiteliales se unen mediante desmosomas (formados por diferentes proteínas como las cadherinas e integrinas). Adicionalmente, distribuidas con un patrón espacial diferencial que sugiere una compartimentalización funcional, se han encontrado diferentes conexinas formando uniones comunicantes («*gap-junctions*») entre las células epiteliales corneales (Laux-Fenton, Donaldson, Kistler, & Green, 2003). Además de estar unidas entre sí por estos mismos tipos de uniones, en las células superficiales se observan también uniones estrechas («*tight junctions*»), que dotan a estas células de una importante función de barrera. Finalmente, el conjunto del epitelio se une al estroma mediante los denominados «complejos de adhesión», formados por hemidesmosomas entre las células basales y la capa de Bowman.

Además de la población de células epiteliales, en la córnea se han identificado otras estirpes celulares no epiteliales, fundamentalmente con función defensiva, de tipo inmunológico o no. Entre ellas, se han descrito células dendríticas (del tipo de las células de Langerhans), linfocitos y melanocitos (Dawson et al., 2011).

1.2.2.2 Estroma corneal.

El estroma constituye aproximadamente el 90 % del espesor de la córnea. Está formado por agua (78%) y fibras de colágeno (80% del peso seco de la córnea), embebidas en una sustancia fundamental (15% del peso seco corneal), y algunos tipos celulares (5% del peso seco corneal). Las fibrillas de colágeno (fundamentalmente de tipo I, pero también III y V) tienen un diámetro uniforme y se disponen en 200 a 300 láminas que se entrelazan y cruzan regularmente entre sí, formando ángulos de menos de 90° en el estroma anterior y ángulos casi rectos en el estroma posterior. La sustancia fundamental que rodea las fibrillas de colágeno es rica en glucosaminoglicanos (básicamente queratán sulfato y condroitín sulfato, en proporción 3:1).

Toda esta matriz extracelular es producida por unas células grandes, planas y de aspecto estrellado, denominadas queratocitos. Se considera que el limbo esclero-corneal sería también la fuente de células madre estromales (Hertszenberg & Funderburgh, 2015). Tras una lesión estromal, los queratocitos pierden su aspecto fenotípico diferenciado y adquieren características similares a los fibroblastos (reducción de las prolongaciones citoplasmáticas, incremento de retículo endoplásmico rugoso y de los complejos de Golgi) y migran a la zona lesionada, denominándose en este caso «miofibroblastos», donde contribuyen a la cicatrización estromal. Además, en el estroma puede encontrarse una pequeña cantidad de leucocitos polimorfonucleares, células plasmáticas y macrófagos dispuestos entre las láminas de las fibras de colágeno.

1.2.2.3 Endotelio corneal.

En profundidad, el estroma se continúa con el endotelio, mediante la membrana de Descemet - formada por fibras finas de laminina, fibronectina y colágeno de tipo IV-, que es producida por las propias células endoteliales. Estas células son grandes, planas y de morfología hexagonal, con interdigitaciones entre ellas y diferentes tipos de uniones intercelulares («*zónula occludens*», «*mácula occludens*», desmosomas). Se disponen en una única capa, a modo de mosaico. Tienen muy poca actividad mitótica, y se van perdiendo con la edad, pero mantienen una gran capacidad para regenerar la membrana de Descemet dañada. El gran desarrollo de sus orgánulos intracelulares se relaciona con su alta actividad metabólica. En la zona del limbo esclero-corneal también se ha sugerido que podrían encontrarse células madre endoteliales (Hertszenberg & Funderburgh, 2015).

1.2.3 Inervación de la córnea.

Aunque se ha propuesto que tanto en el ser humano (Sakamoto, 1951) como en otras especies (Jones & Marfurt, 1998; C F Marfurt, 1988; C F Marfurt, Kingsley, & Echtenkamp, 1989; Sabatino, Di Zazzo, De Simone, & Bonini, 2017) la córnea podría recibir inervación autonómica, ésta se considera poco relevante para la misma, en oposición al principal tipo de inervación corneal: la sensorial. A continuación, se describen los aspectos generales, tanto estructurales como funcionales, de la vía sensorial corneal.

1.2.3.1 Vía nerviosa sensorial de la córnea.

1.2.3.1.1 Distribución periférica

La inervación somatosensorial del globo ocular, incluyendo la córnea, depende de la rama nasociliar de la división oftálmica del V par craneal, o nervio trigémino. Tanto las características estructurales como funcionales de la misma se ha revisado recientemente (Stapleton et al., 2013). En la córnea humana, los axones periféricos de las neuronas sensoriales corneales se vehiculan a través de la división oftálmica, que discurre por la pared del seno cavernoso. Antes de entrar en la hendidura esfenoideal, la rama oftálmica se distribuye en tres ramas terminales: los nervios lagrimal, frontal y nasociliar. Desde ésta última, y a través de dos nervios ciliares largos y una rama comunicante con el ganglio ciliar, del que parten los nervios ciliares cortos, los axones de las neuronas sensoriales corneales llegan al ojo, penetrando en su estructura por el polo posterior (figura 3). Desde allí, recorren el globo ocular en sentido postero-anterior por el espacio

supracoroideo, hasta alcanzar la región del músculo ciliar, donde ramificándose y anastomosándose, forman el plexo ciliar, formado por fibras nerviosas sensoriales y parasimpáticas, fundamentalmente. De este plexo se separan filamentos nerviosos que van a inervar: a) la córnea; b) el iris y el cuerpo ciliar; y c) la esclera, episclera y conjuntiva.

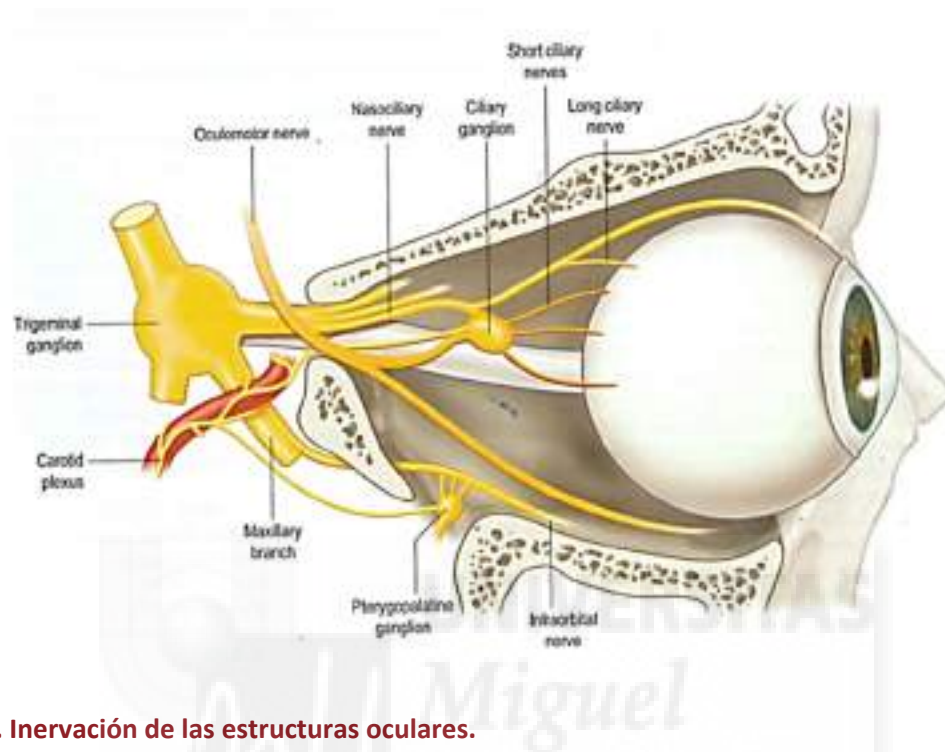


Figura 3. Inervación de las estructuras oculares.

La inervación sensorial de la córnea depende del nervio nasociliar, rama de la división oftálmica del trigémino. Los axones sensoriales llegan a la córnea tanto a través de los nervios ciliares cortos, como de los nervios ciliares largos. Reproducida, con autorización de Elsevier, de Adler's Physiology of the eye, 11ª ed (Carlos Belmonte et al., 2011).

Las fibras nerviosas que van a inervar la córnea se agrupan en una serie de entre 60 y 80 haces nerviosos, que penetran radialmente el estroma, en el tercio medio de su espesor y empiezan a recorrerlo en dirección hacia el centro de la córnea, paralelos a la superficie corneal. Las fibras mielínicas pierden las células de Schwann a su entrada a la córnea, por lo que en su recorrido intracorneal todas las fibras son amielínicas. Progresivamente, estos haces se van situando en el tercio anterior del estroma, dando lugar a un primer plexo, denominado plexo subepitelial, localizado en profundidad respecto a la capa de Bowman. En diferentes localizaciones periféricas y medias, pero evitando la zona central, entre 200 y 500 haces cambian su curso y se dirigen perpendiculares a la superficie corneal, hasta penetrar la capa de Bowman y la membrana basal, y entrar a la capa basal del epitelio. Cada uno de estos haces está formado por unos 40 axones. Ya en el epitelio, estos nervios comienzan a ramificarse y anastomosarse paralelos a la superficie corneal, formando el plexo subbasal. Al igual que en otras especies, en el

humano este plexo termina en una típica forma de espiral o remolino en el centro de la córnea.(Carl F Marfurt, Cox, Deek, & Dvorscak, 2010)

Desde el plexo subbasal se van originando fibras perpendiculares a la superficie corneal que se disponen entre las células de las distintas capas del epitelio, en íntimo contacto con ellas, pero sin formar estructuras que se puedan considerar verdaderas sinapsis. Algunas de estas fibras nerviosas presentan varicosidades a lo largo de su recorrido. Todas ellas terminan a diferentes profundidades respecto a la superficie corneal, en forma de unos ensanchamientos bulbosos, las terminaciones libres, cuyos diámetros oscilan entre 0,25 y 1,25 μm (T. Tervo, Joó, Huikuri, Toth, & Palkama, 1979; Whitear, 1960). Todo ello contribuye a que la densidad de inervación del epitelio sea mayor en el centro que en la periferia de la córnea (de Castro, Silos-Santiago, de Armentia, Barbacid, & Belmonte, 1998; De Felipe & Belmonte, 1999; Linda J. Müller, Marfurt, Kruse, & Tervo, 2003; Rózsa & Beuerman, 1982; Schimmelpfennig, 1982), estimándose en unas 7000 terminaciones libres por mm^2 (Stapleton et al., 2013).

Tanto en las varicosidades como en los bulbos terminales estas fibras contienen grandes vesículas de contenido tanto denso como claro. Las fibras con vesículas densas son inmunorreactivas para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, véase más adelante), mientras que aquellas con vesículas claras lo son para la tirosina hidroxilasa (Ueda, del Cerro, LoCascio, & Aquavella, 1989). Por ello, se ha sugerido que las primeras son propiamente sensoriales, mientras que las segundas pueden tener un origen simpático. Del mismo modo, para las terminaciones sensoriales se ha sugerido que sus diferentes morfologías podrían corresponder a diferentes tipos funcionales (Maclver & Tanelian, 1993a, 1993b), aunque recientemente se ha descrito que la morfología de un mismo tipo funcional, los termorreceptores de frío, cambia con la edad (Alcalde et al., 2018).

Además de este patrón general, en la periferia de la córnea existen fibras que pueden entrar directamente al epitelio desde los troncos derivados del plexo ciliar. Del mismo modo, en la zona del limbo esclero-corneal, se han encontrado algunas terminaciones con especializaciones morfológicas similares a los corpúsculos de Krause de la piel (Lawrenson & Ruskell, 1991), cuyo significado funcional no se conoce.

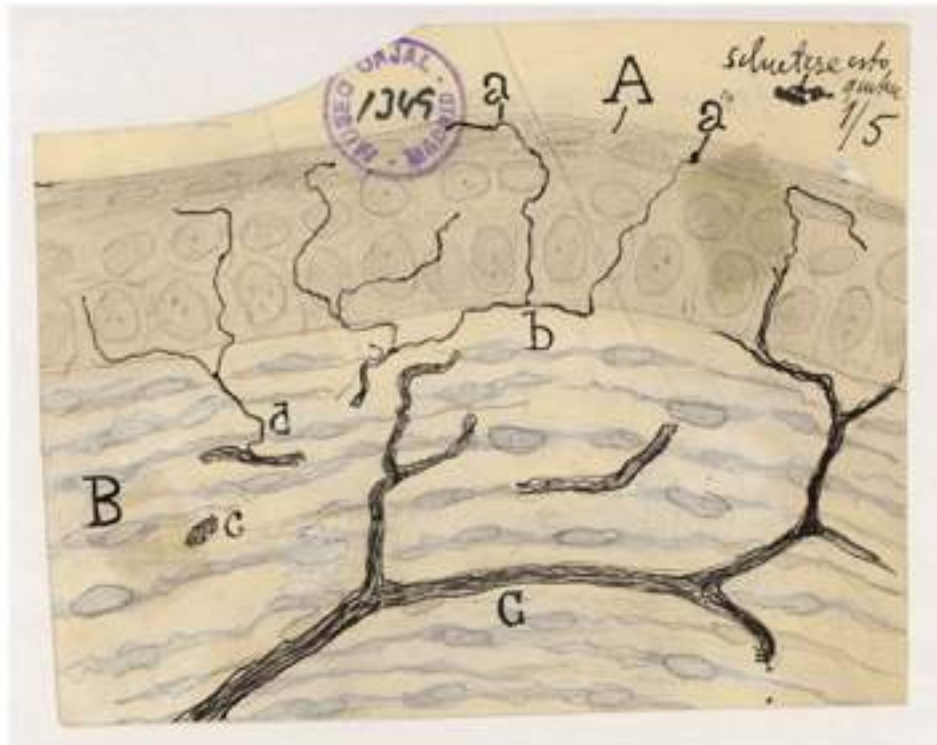
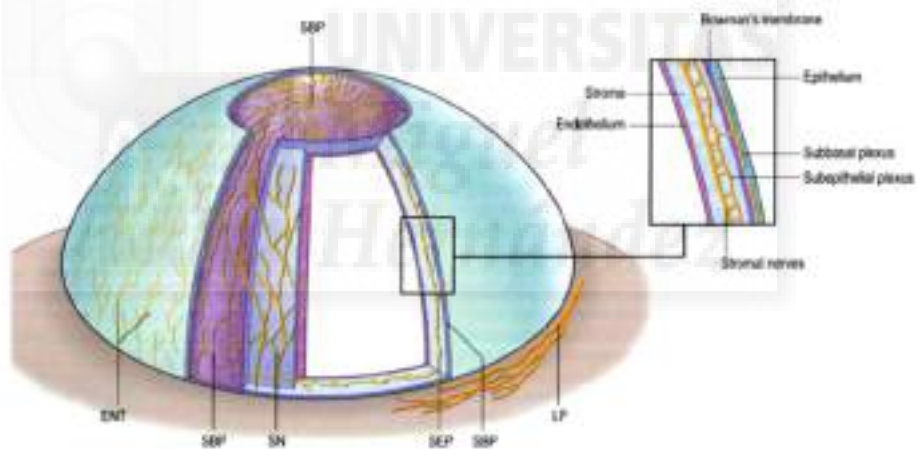
A**B**

Figura 4. Distribución de las fibras nerviosas a lo largo del polo anterior del ojo.

A: Dibujo original de Santiago Ramón y Cajal ilustrando la presencia de terminaciones libres en el epitelio corneal del ratón (cortesía del Instituto Cajal, Legado Cajal, CSIC, Madrid; reproducido con autorización). B: Esquema actual de la anatomía de la inervación corneal. Desde el plexo limbal (LP), una serie de troncos nerviosos penetran en el estroma, dirigiéndose hacia el centro de la córnea, formando el plexo subepitelial. Respetando el área central de la córnea, penetran la membrana de Bowman y entran en el epitelio, formando el plexo subbasal, desde el que las terminaciones libres penetran en el epitelio. Reproducida, con autorización de Elsevier, de Adler's Physiology of the eye, 11ª ed (Carlos Belmonte et al., 2011).

1.2.3.1.2 Vías centrales.

1.2.3.1.2.1 Tronco del encéfalo.

Las neuronas trigeminales con campo receptor corneal proyectan sus ramas centrales hacia el área ventro-lateral de la transición entre las zonas caudal e interpolar (Vi/Vc) del núcleo espinal del trigémino, y la zona más anterior de la transición entre la zona caudal de dicho núcleo y la región cervical (Vc/C1) (van Ham & Yeo, 1996a). La estimulación nociva de la córnea, independientemente del tipo de estímulo aplicado, da lugar a la expresión de c-fos en estas mismas zonas (Bereiter, Hathaway, & Benetti, 1994; Martínez & Belmonte, 1996) coincidiendo en distribución espacial con la descripción anatómica de las zonas de proyección de las neuronas sensoriales corneales primarias (C F Marfurt, 1981a, 1981b; C F Marfurt & Del Toro, 1987).

Las neuronas de segundo orden localizadas en dichas zonas pertenecen a dos tipos funcionales: a) neuronas nociceptoras específicas (nocirreceptoras o neuronas nociceptivas de clase 3); y b) neuronas de amplio rango dinámico (multirreceptoras o de clase 2) (Pozo & Cervero, 1993). Las primeras responden a estímulos mecánicos de alto umbral y al calentamiento nocivo y tienen un campo receptor pequeño, que aumenta de tamaño durante el calentamiento repetitivo. Las segundas tienen umbrales menores y campos receptores más grandes y responden exclusivamente a la estimulación mecánica de la córnea, o de ésta y los tejidos cutáneos adyacentes (S. Nagano, Myers, & Hall, 1975). Las características de su descarga se corresponden muy bien con las de los nociceptores corneales estudiados mediante registro extracelular de nervios periféricos. También se han descrito en el complejo espinal del trigémino neuronas que responden al enfriamiento de la superficie de la córnea (Mosso & Kruger, 1973).

Además de proyectar a regiones superiores del SNC, las neuronas de segundo orden proyectan a otros núcleos troncoencefálicos (núcleo del nervio facial, núcleo salivatorio superior, núcleo del tracto solitario) lo que permite explicar la existencia de respuestas reflejas mediadas a este nivel (Carlos Belmonte et al., 2017; Stapleton et al., 2013; van Ham & Yeo, 1996b), como el parpadeo o la lagrimación (M Carmen Acosta et al., 2004; Dartt, 2009; Stern et al., 1998a, 1998b). Actualmente se considera que las neuronas de segundo orden de la transición Vi/Vc que codifican la intensidad de la estimulación corneal y proyectan hasta estos otros núcleos troncoencefálicos son claves para el mantenimiento de la homeostasis corneal, aunque son mucho menos importantes para los aspectos discriminativos de las sensaciones dolorosas oculares (Carlos Belmonte et al., 2017; Stapleton et al., 2013). Por el contrario, las neuronas de segundo orden localizadas en el núcleo Vc/C1 parecen proyectar hasta regiones supraespinales, por lo que se las

considera el principal núcleo de relevo de la información sensorial corneal en su camino hacia regiones superiores del SNC.

1.2.3.1.2.2 Tálamo.

Las neuronas del complejo del trigémino proyectan a la porción medial del núcleo ventral posterior del tálamo contralateral. Las neuronas talámicas activadas específicamente por estímulos nocivos se localizan caudalmente respecto a las de amplio rango dinámico, que se encuentran en los núcleos intralaminares (Yokota, Koyama, & Matsumoto, 1985). La zona intralaminar recibe información de la córnea, teniendo estas neuronas campos receptores complejos y umbrales mecánicos muy altos (Yokota, Koyama, Nishikawa, & Hasegawa, 1991) más allá del umbral del dolor en humanos.

Del mismo modo, se han identificado neuronas de Vc/C1 que proyectan a zonas posteriores del tálamo y al área parabraquial (Carlos Belmonte et al., 2017).

1.2.3.1.2.3 Corteza cerebral.

La información sensorial del trigémino llega a las áreas somato-sensoriales primaria (SI) y secundaria (SII) y al córtex orbitofrontal (Roland, 1992). En esta zona se han descrito neuronas que responden a la estimulación corneal (Matsumiya & Mostofsky, 1972). Algunas neuronas de SI (Kenshalo, Chudler, Anton, & Dubner, 1988) o del córtex ventrolateral orbital (Snow, Lumb, & Cervero, 1992) igualmente codifican la intensidad de los estímulos aplicados sobre la córnea y/o el tejido periocular. Del mismo modo, desde el tálamo la información nociceptiva corneal llega hasta el sistema límbico, lo que puede explicar el componente emocional desagradable que acompaña a la estimulación corneal (Carlos Belmonte et al., 2017).

1.2.3.1.2.4 Hipotálamo.

Adicionalmente, se ha descrito una vía trigémino-hipotalámica, en la cual se han podido identificar, entre otras, neuronas nociceptivas con campo receptor corneal cuyos axones cruzan contralateralmente y ascienden por el tronco del encéfalo contralateral, para llegar a la decusación supraóptica en el hipotálamo lateral, desde donde, a su vez, la mitad de las mismas cruza hacia el hipotálamo ipsilateral (Malick et al., 2000). Se desconoce el significado funcional que la existencia de esta vía pudiera tener para el control homeostático de los tejidos oculares.

1.2.3.2 Neurofisiología de las neuronas sensoriales primarias corneales

El conocimiento actual de las características de las neuronas sensoriales que inervan la córnea ha sido desarrollado mayoritariamente a lo largo de las últimas cuatro décadas por el

grupo de los Profs. Carlos Belmonte y Juana Gallar. A raíz de sus hallazgos no sólo se tiene actualmente una visión detallada de las características de las neuronas sensoriales corneales, sino que se han producido ciertos cambios de paradigma y se han formulado posibles explicaciones fisiopatológicas para situaciones clínicas para las que todavía éstas no existían.

Debido a que la mayoría de las fibras nerviosas que inervan la córnea son de tipo C (L J Müller, Vrensen, Pels, Cardozo, & Willekens, 1997), y a que los estudios psicofísicos clásicos (Kenshalo, 1960) mostraban que la estimulación corneal evocaba sensaciones dolorosas, hasta épocas recientes se ha considerado que la córnea estaba inervada exclusivamente por nociceptores. En la actualidad se acepta que existen tres subtipos de neuronas sensoriales corneales, dos de las cuales se consideran claramente nociceptoras, mientras que sobre la tercera se ha ido cambiando de idea a lo largo del tiempo. La figura 5 resume los tipos de receptores sensoriales corneales propuestos hasta el momento. A continuación, se describen en más detalle cada uno de ellos.

1.2.3.2.1 Mecanorreceptores de alto umbral, o nociceptores mecánicos.

Los mecano-nociceptores responden exclusivamente a estímulos nocivos de alto umbral de naturaleza mecánica (C Belmonte, Gallar, Pozo, & Rebollo, 1991; Lele & Weddell, 1959; MacIver & Tanelian, 1993b; Tanelian & Beuerman, 1984) y conducen los potenciales de acción en el rango de las fibras A δ . En el gato representan aproximadamente entre un 20 y 30 % del total de la población de receptores sensoriales de la córnea (C Belmonte et al., 1991; Lele & Weddell, 1956). Tienen campos receptores ovalados (de unos 7 mm de diámetro), solapados entre sí, y su umbral de activación oscila entre 0,63 mN en la córnea del gato (C Belmonte et al., 1991) y 2.2 mN en la del conejo (MacIver & Tanelian, 1993b; Tanelian & Beuerman, 1984). Los mecano-nociceptores responden de manera fásica y proporcional a la intensidad del estímulo, y pueden llegar a presentar adaptación con estímulos sostenidos sobre su campo receptor (C Belmonte & Giraldez, 1981).

Recientemente se ha comprobado la existencia de canales mecano-sensibles Piezo-2 en una subpoblación de neuronas sensoriales corneales exclusivamente mecano-sensibles (Alamri, Bron, Brock, & Ivanusic, 2015; Bron, Wood, Brock, & Ivanusic, 2014), por lo que se ha propuesto que este pueda ser el mecanismo de transducción de esta población neuronal.

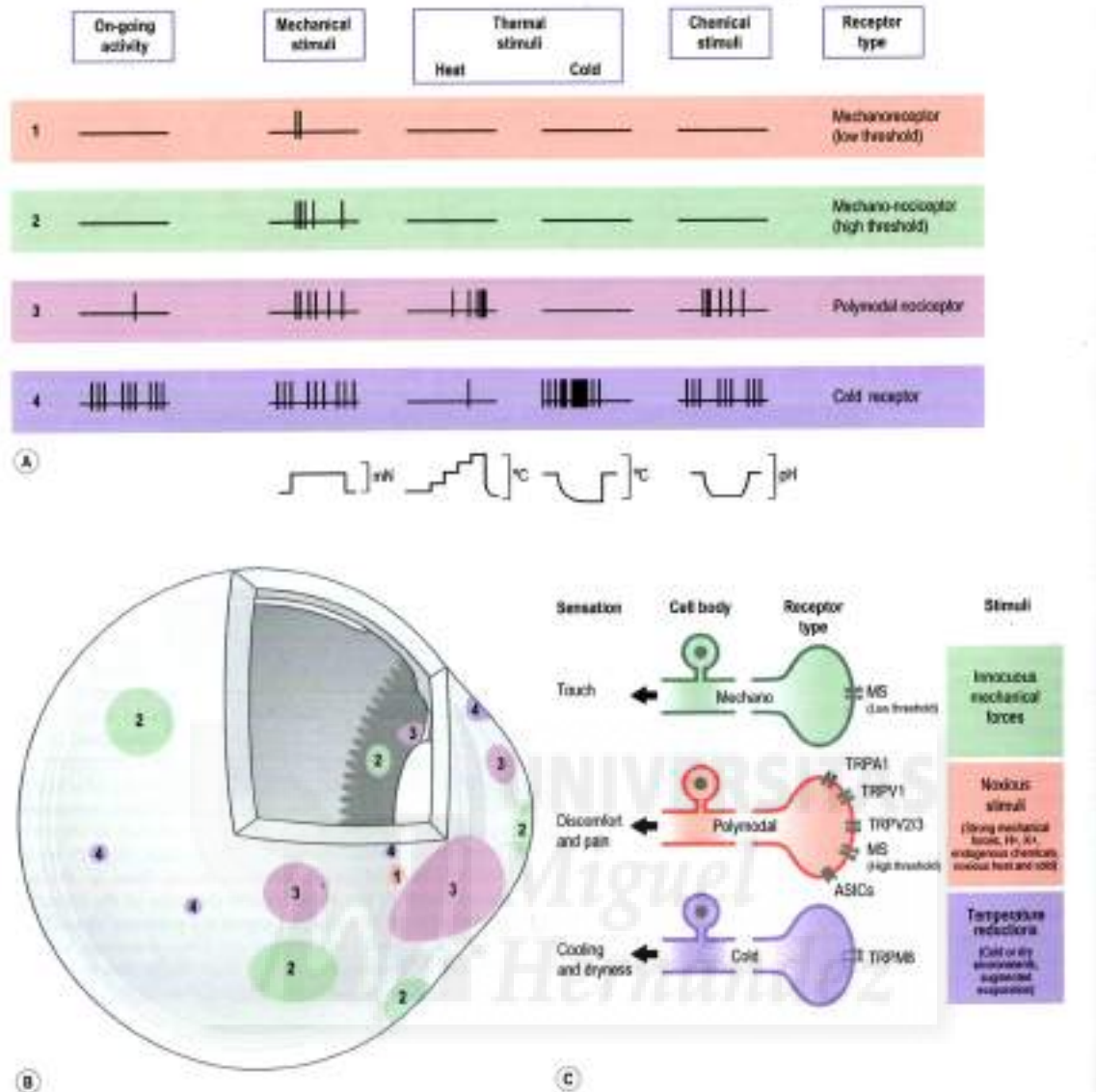


Figura 5. Tipos funcionales de neuronas sensoriales de la córnea.

En la córnea se han identificado tres poblaciones de neuronas sensoriales, según sus propiedades funcionales, y su respuesta a diferentes estímulos: a) los mecano-nociceptores (identificados con el número 2 y en color verde); b) los nociceptores polimodales (identificados con el número 3, y en color rojo); y c) los receptores de frío (identificados en el número 4, y en color morado). Reproducida, con autorización de Elsevier, de Adler's Physiology of the eye, 11ª ed (Carlos Belmonte et al., 2011).

1.2.3.2.2 Nociceptores polimodales.

Los nociceptores polimodales son la población mayoritaria en la córnea (C Belmonte et al., 1991; Gallar, Pozo, Tuckett, & Belmonte, 1993; Giraldez, Geijo, & Belmonte, 1979). Suelen presentar actividad espontánea y se denominan así porque responden a la presencia sobre sus grandes campos receptores (2,5 cm²) de estímulos mecánicos, químicos y al calor aumentando su frecuencia de disparo. La mayoría conducen los potenciales de acción en el rango de las fibras C, aunque también se han descrito fibras Aδ (C Belmonte et al., 1991; C Belmonte & Giraldez, 1981;

Chen, Gallar, Pozo, Baeza, & Belmonte, 1995; Gallar et al., 1993; Giraldez et al., 1979). Los asociados a las fibras C suelen tener campos receptores más pequeños, presentan mayor fatiga y postdescarga y poseen una actividad espontánea más alta que los asociados a fibras A δ (Gallar et al., 1993; Pozo, Gallego, Gallar, & Belmonte, 1992), siendo ambos similares en el resto de sus características.

Su umbral mecánico es menor que el de los mecano-nociceptores (Belmonte y cols, 1991), y descargan de manera tónica e irregular al aplicar estímulos mecánicos sobre su campo receptor. Si la estimulación mecánica es sostenida, pueden mostrar adaptación y, cuando ésta es de alta intensidad, pueden presentar postdescarga. La repetición del estímulo puede llevar a la fatiga de los nociceptores polimodales (C Belmonte & Giraldez, 1981).

Los nociceptores polimodales corneales también responden a la elevación de la temperatura de su campo receptor, con umbrales entre los 38 y 39 °C, mediante un tren inicial de impulsos cuya frecuencia se reduce progresivamente hasta adaptarse a la nueva temperatura (C Belmonte & Giraldez, 1981). La disminución de la temperatura por debajo de 20°C silencia a los nociceptores polimodales, y sólo una pequeña proporción de aquellos asociados a fibras A δ responde de forma inconsistente al enfriamiento nocivo (C Belmonte & Giraldez, 1981).

Los nociceptores polimodales corneales responden igualmente a diferentes sustancias químicas, como la capsaicina (C Belmonte et al., 1991; Chen et al., 1995; Gallar et al., 1993), y otras, liberadas endógenamente durante la inflamación, como las prostaglandinas (Pozo et al., 1992) y los protones (Chen et al., 1995), que pueden causar la sensibilización de estos nociceptores.

Tanto la sensibilidad mecánica como a la capsaicina de estos nociceptores puede explicarse por la expresión en los mismos del canal TRPV1, mientras que la sensibilidad al frío podría deberse a la co-expresión en un porcentaje de ellos del canal TRMP8 (Alamri et al., 2015). Adicionalmente, en distintas subpoblaciones de nociceptores polimodales parecen expresarse otros mecanismos de transducción, como los ASICs o el TRPA1, que explicarían la respuesta de dichas subpoblaciones a los protones o el frío intenso (Carlos Belmonte et al., 2017).

1.2.3.2.3 Receptores «de frío» («*cold thermoreceptors*»).

Los receptores de frío representan aproximadamente un 15% de las neuronas sensoriales de la córnea. Inicialmente se les denominó «nociceptores de frío» («*cold nociceptors*»), debido a que conducían sus potenciales de acción en el rango de las fibras A δ y C (Tanelian & Beuerman, 1984). Sin embargo, debido a que su patrón de respuesta es análogo al de otras poblaciones de

receptores de frío, y a que es posible discriminar cambios de temperatura corneal no necesariamente asociados a sensaciones de dolor (Carlos Belmonte & Gallar, 2011) actualmente reciben esta otra denominación.

Las características electrofisiológicas de los receptores de frío fueron descritas con detalle por las Profas. Juana Gallar y María del Carmen Acosta (M C Acosta, Belmonte, & Gallar, 2001; Gallar et al., 1993) en el gato. Éstos tienen campos receptores pequeños redondeados u ovals (2 a 9 mm), habitualmente localizados en la córnea periférica. Actualmente se distinguen dos tipos: a) los receptores de alta actividad espontánea y bajo umbral (HB-LT, de *high background – low threshold*); y b) los de baja actividad espontánea y alto umbral (LB-HT, de *low background – high threshold*) (Carlos Belmonte et al., 2017).

El 70% de ellos son del primer tipo. Se caracterizan por presentar actividad espontánea a la temperatura normal de la córnea (34.5 °C), que aumenta de manera fásica con disminuciones de temperatura de hasta 0.5 °C, y disminuye cuando la temperatura se incrementa, esto es, parecen responder a las variaciones de la temperatura, más que a la temperatura alcanzada en sí mismo. Responden también a soluciones de elevada osmolaridad y al mentol, estímulos que aumentan la actividad del receptor TRPM8, que se considera su mecanismo transductor (Alamri et al., 2015). Se ha propuesto que estos receptores de frío serían los responsables de mantener la lagrimación basal (Andrés Parra et al., 2010) y del parpadeo (Quallo et al., 2015), y que su funcionamiento aberrante podría explicar el origen de algunas sensaciones de discomfort ocular (Carlos Belmonte & Gallar, 2011). Los del segundo tipo han sido menos estudiados en la actualidad.

1.2.3.3 Contenido en neuropéptidos de las neuronas sensoriales corneales.

Los diferentes subtipos de neuronas presentes en la córnea expresan una serie de péptidos que son distintos para cada uno de ellas (Troger et al., 2007). La identificación inmunohistoquímica de los mismos se ha utilizado, también, para su caracterización fenotípica. De entre todos ellos, la expresión de los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 y Calca parece quedar restringida a las neuronas sensoriales. A continuación, se detallan algunos aspectos de estos péptidos.

1.2.3.3.1 Péptidos codificados en el gen Tac1: sustancia P y neuroquinina A.

La familia de las taquiquininas (denominada así originalmente porque los primeros miembros de esta familia identificados aumentaban la frecuencia de contracciones del músculo liso intestinal, al contrario de la bradiquinina) está compuesta actualmente por una serie de péptidos codificados en tres genes distintos en la especie humana, denominados TAC1, TAC3 y TAC4. Dichos péptidos comparten una misma secuencia amino terminal (X-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂) (Steinhoff, von Mentzer, Geppetti, Pothoulakis, & Bunnett, 2014).

En la especie humana el gen TAC1 se localiza en el cromosoma 7 (7q21.3) y tiene 7 exones. El exón 3 codifica la sustancia P (SP), y el exón 6, la neuroquinina A (NKA). Por recombinación de sus regiones codificantes, este gen da lugar a cuatro transcritos (α TAC1, β TAC1, δ TAC1 y γ TAC1), en todos los cuales se encuentra el exón 3, y, por lo tanto, dan lugar a la expresión de la SP. Por su parte, la NKA sólo se expresa cuando se transcriben los transcritos α y β (figura 6). Actualmente se considera que el gen TAC1 codifica, también, otros dos péptidos adicionales: el neuropéptido K y el neuropéptido γ . Por su parte, el gen TAC3 se localiza en el cromosoma 12 (12q13.3), consta de 9 exones, y codifica la neuroquinina B, mientras que el gen TAC4 se localiza en el cromosoma 17 (17q21.33), consta de 5 exones, y codifica la hemoquinina y diversas isoformas de la endoquinina. Los genes ortólogos en el ratón (*Mus musculus*) se denominan Tac1 (cromosoma 6, 8 exones), Tac2 (cromosoma 10, 8 exones) y Tac4 (cromosoma 11, 4 exones), respectivamente.

Por ensayos de afinidad farmacológica se propuso originalmente que las taquiquininas actuarían sobre una familia de receptores, originalmente denominados «receptores para neuroquininas» («*neurokinin receptors*»), de lo que toman su abreviatura actualmente (NKR). Posteriormente se han podido clonar los genes que codifican esta familia de receptores, que actualmente está formada por tres miembros, identificados con los números 1 a 3. Así el receptor NK1 se considera el receptor con mayor afinidad por la sustancia P, mientras que el NK2 se considera el de mayor afinidad para la neurokinina A, y el NK3 está considerado el receptor de mayor afinidad para la neurokinina B (figura 6). Sin embargo, todos estos ligandos pueden unirse a los distintos receptores, en función de su concentración. Todos estos receptores son proteínas de siete dominios transmembrana, ligadas a sistemas de proteínas G. Tras la unión del correspondiente ligando, estos receptores activan diversos mecanismos de señalización intracelular, distintos y específicos en diferentes estirpes celulares.

Por ejemplo, la unión de la SP al receptor NK1, activa, entre otras vías intracelulares, la adenilato ciclasa, que aumenta el AMPc intracelular, pero, adicionalmente, puede causar la transactivación del receptor para el factor de crecimiento epitelial (EGFR) (Steinhoff et al., 2014).

Del mismo modo, como parte de los procesos de endocitosis mediada por clatrin, estos receptores sufren un proceso de internalización, que hasta hace poco se creía que contribuía a limitar su actividad de señalización. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que los receptores NK1 internalizados siguen manifestando actividad, lo que podría contribuir a coordinar diferentes procesos intracelulares (Jensen et al., 2017).

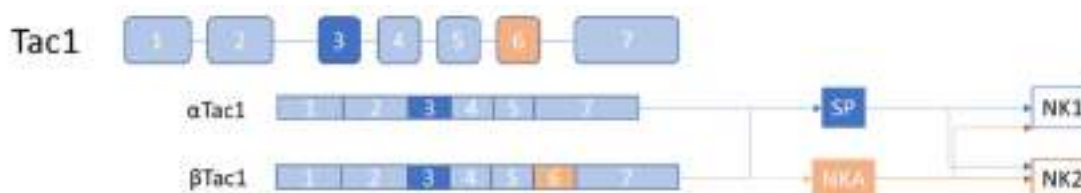


Figura 6. Taquiquininas codificadas en el gen Tac1.

El gen Tac1 está formado por siete exones, de los cuales la sustancia P (SP) está codificada en el 3, mientras que la neuroquinina a (NKA, originalmente denominada sustancia K), está codificada en el 6. Estas moléculas ejercen sus acciones a través de su unión a receptores de membrana de la familia de los receptores para neuroquininas (NK). Estos receptores no son absolutamente selectivos, sino que cualquier taquiquinina puede desarrollar sus efectos sobre cualquiera de ellos, dependiendo de su concentración. Los receptores NK1 presentan su mayor afinidad para la SP, mientras que los NK2 la presentan para la NKA.

1.2.3.3.2 El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (α CGRP).

El CGRP es un péptido de 37 aminoácidos, denominado así porque se descubrió como un producto del procesamiento alternativo («*alternative splicing*», «*differential display*») del gen de la calcitonina (CALCA) en tejido nervioso (Amara, Jonas, Rosenfeld, Ong, & Evans, 1982; Rosenfeld et al., 1983). Con posterioridad se identificó un segundo gen (CALCB) (Amara et al., 1985; Höppener et al., 1985), independiente, que produce una isoforma de CGRP, que se denominó β CGRP, renombrándose la primera como α CGRP. Ambas isoformas difieren tan sólo en un único aminoácido (Amara et al., 1985). En la especie humana CALCA y CALCB se localizan en el cromosoma 11 (11p15.2) y contienen 5 exones, de entre los cuales, el 5, que es el codificante para el CGRP mantiene una alta homología (figura 7). Los ortólogos en el ratón se denominan Calca y Calb y ambos se localizan en el cromosoma 7. Calca contiene 7 exones y Calcb, cinco.

La expresión de ambos genes parece iniciarse en el periodo embrionario (E7, en el ratón) y se extiende hasta la edad adulta, con grados variables de expresión de cada péptido en diferentes tejidos a diferentes edades (Rezaeian et al., 2009), lo que sugiere que puedan presentar funciones biológicas diferentes, tanto durante el desarrollo, como en diferentes tejidos en la edad adulta. Del mismo modo, se ha comprobado que en el ratón adulto el α CGRP parece

más abundante que el β CGRP en las neuronas sensoriales primarias, mientras que este último parece más abundante en las neuronas de los plexos mientéricos (Schütz, Mauer, Salmon, Changeux, & Zimmer, 2004a), por lo que se considera que ambas moléculas podrían ejercer funciones biológicas distintas.

La expresión del CGRP parece regulada por CREB, que se activa en respuesta a AMPc o NGF por vías diferentes (Freeland, Liu, & Latchman, 2000). De hecho, en animales adultos, el NGF no es necesario para la supervivencia neuronal, pero sí para la expresión de neuropéptidos como la SP o el CGRP (R M Lindsay, Lockett, Sternberg, & Winter, 1989; Ronald M Lindsay & Harmar, 1989).

El CGRP ejerce sus funciones mediante su unión a un receptor de membrana, compuesto de varias subunidades (Bouvier, 2001). La subunidad central, actualmente denominada CRL (de *calcitonin receptor-like receptor*) (Russell, King, Smillie, Kodji, & Brain, 2014), pertenece a la superfamilia de los receptores con siete dominios transmembrana ligados a proteínas G. Para formar el receptor funcional es necesario que esta proteína interactúe con otras dos: a) RAMP1 (de *receptor activity modifying protein*); y b) RCP (de *CGRP receptor component protein*). CRLR parece una proteína cuya preferencia por el ligando depende del tipo de RAMP con la que oligomerice. Así, la oligomerización de RAMP1 y CRLR parece necesaria para permitir la unión del CGRP (figura 7), mientras que si CRL oligomeriza con otras isoformas de RAMP (como la 2 o la 3), se convierte en el receptor de la adrenomedulina. Del mismo modo, la interacción de RAMP1 con el receptor de la calcitonina modifica la sensibilidad de éste, permitiendo entonces la unión de la amilina (Yu, Hou, Fu, & Zhang, 2009). Para el desencadenamiento del mecanismo de señalización intracelular parece necesaria la interacción del CRLR y de RCP (Egea & Dickerson, 2012), aunque esto se ha discutido en la literatura (Barwell et al., 2013).

La unión del CGRP a su receptor activa a la adenilato-ciclase, elevando las concentraciones citoplasmáticas de AMPc (Evans, Rosenblatt, Mnayer, Oliver, & Dickerson, 2000; Morfis, Christopoulos, & Sexton, 2003; R.-Q. Sun et al., 2004) que, a su vez, activan la vía de la proteína quinasa A. Como consecuencia de toda la cascada de eventos intracelulares, se activan factores de transcripción nuclear como CREB, o varias kinasas, como ERK1 o MAPK (Pin & Bahr, 2008; Schaeffer et al., 2003; R.-Q. Sun et al., 2004), que son las responsables de desencadenar las respuestas celulares al péptido.

De modo análogo a lo descrito para los receptores NK1, la internalización endosomal de los receptores para el CGRP no finaliza su actividad, sino que ésta puede seguir dándose a nivel intracelular, contribuyendo a diversos procesos celulares (Yarwood et al., 2017).

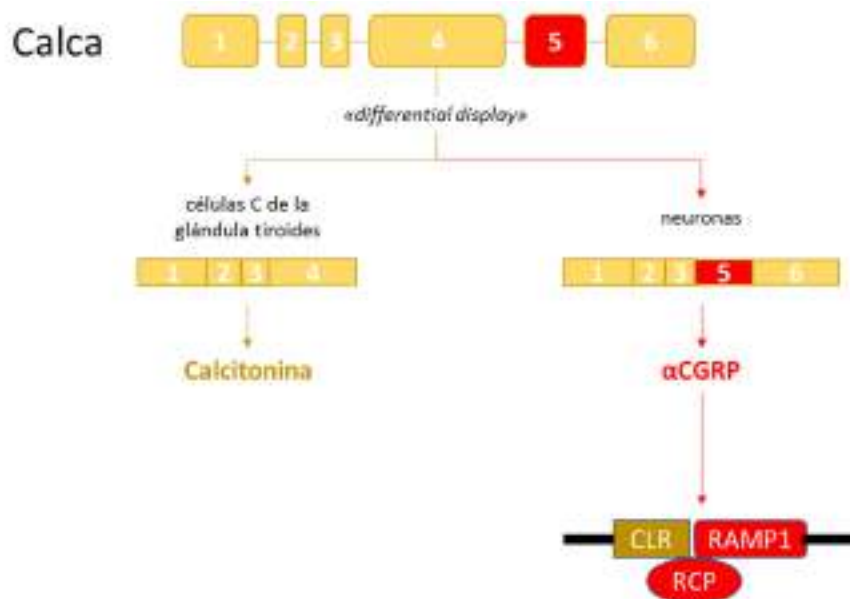


Figura 7. Expresión del α CGRP, y mecanismo de acción de este.

El α CGRP está codificado en el exón 5 del gen de la calcitonina (Calca). En función del tipo de célula en la que se esté expresando, este gen puede dar lugar a la calcitonina o al α CGRP. Este neuropéptido ejerce su acción actuando sobre un complejo proteico heteromérico, del que forman parte: a) una subunidad análoga al receptor de la calcitonina (CLR), común para varias moléculas; b) una proteína modificadora de su actividad (RAMP1), que confiere selectividad para el α CGRP; y, c) una proteína intracelular (RCP) responsable de la transducción. Además del gen Calca existe otro, denominado Calcb, que da lugar a otra isoforma del CGRP (β CGRP). Por la similitud estructural de ambos, se considera que comparten mecanismos y acciones biológicas, pero en tejidos distintos.

1.2.3.3.3 Expresión de SP, NKA y α CGRP en las neuronas sensoriales de la córnea.

En la córnea de la especie humana se han encontrado fibras nerviosas inmunorreactivas para el CGRP (Ueda et al., 1989; Uusitalo, Krootila, & Palkama, 1989), la SP (K. Tervo et al., 1982), y, más recientemente, frente a la NKA, estas últimas en el estroma superficial y profundo (Schmid et al., 2005).

El CGRP y la SP forman parte también de la composición normal de la película lacrimal (Golebiowski, Chao, Stapleton, & Jalbert, 2017; Linda J. Müller et al., 2003), y su concentración en la misma no se ve afectada por el estímulo mecánico continuo que representa el llevar lentes de contacto (Golebiowski et al., 2017). Sin embargo, en el caso del CGRP sí se ha demostrado que tras la cirugía LASIK su liberación hacia la película lacrimal se eleva durante los dos primeros días (Mertaniem, Ylätuja, Partanen, & Tervo, 1995), regresando a valores previos a la cirugía una semana tras la misma (Chao et al., 2015; Mertaniem et al., 1995) y manteniéndose en dichos niveles durante los seis primeros meses tras la misma (Chao et al., 2015). Sin embargo, al año de

la cirugía, la concentración de CGRP en la película lacrimal de paciente operados de LASIK, es superior a la de la población no operada (Chao et al., 2016). Del mismo modo, las concentraciones de SP en la película lacrimal a los tres meses tras la cirugía LASIK parecen elevarse respecto a los niveles previos a la misma (Chao et al., 2015). Todo ello sugiere que estos neuropéptidos se liberan desde las terminaciones periféricas de las neuronas sensoriales, tanto en situaciones basales como en respuesta a la lesión de los tejidos corneales.

La distribución y las características de las neuronas del trigémino con campo receptor corneal no se han estudiado en la especie humana. Se pueden considerar como correlatos los estudios realizados en la rata (*Rattus norvegicus*) y el ratón (*Mus musculus*, véase apartado específico, más adelante).

En la rata, los nervios corneales presentan un intenso marcaje frente a CGRP, SP y galanina (Jones & Marfurt, 1998). Realizando diferentes estudios de denervación, Jones y Marfurt concluyeron que los dos primeros tienen sólo origen sensorial, mientras que el tercero puede tener, también, origen parasimpático. Las fibras nerviosas inmunorreactivas para el CGRP y la SP positivas tienden a colocalizar, lo que sugiere que ambos neuropéptidos se expresan en las mismas neuronas. En la misma especie, en estudios de marcaje retrógrado con fluorogold (A. Nakamura et al., 2007) o con toxina colérica (Murata & Masuko, 2006) no se ha podido establecer con precisión el número de neuronas con campo receptor corneal. Así, Murata y Masuko estiman un número de unas 50 por ganglio, mientras que Nakamura y cols. estiman que habría unas 285 de media. Ambos estudios sí parecen coincidir, por el contrario, en que alrededor del 30% de los somas de dichas neuronas expresan CGRP, mientras que alrededor del 10% de los mismos expresan SP. Ambos estudios indican, también, que entre un 23% y un 37% de los somas de dichas neuronas expresan TRPV1, el receptor de la capsaicina. De ellas, el 75% expresan CGRP y un tercio SP (Murata & Masuko, 2006).

En la rata, las neuronas sensoriales inmunorreactivas para el CGRP parecen desarrollarse en las tres primeras semanas postnatales, adquiriendo su patrón definitivo de distribución a partir de ese momento (Jones & Marfurt, 1991). Este patrón adulto se caracteriza por una alta densidad de fibras inmunorreactivas para el CGRP en la zona central de la córnea, así como en la zona del limbo esclero-corneal. Las neuronas inmunorreactivas para el CGRP se extienden también a otras regiones del ojo, como la musculatura pupilar, la úvea y el cuerpo ciliar (Terenghi et al., 1985).

En otra especie en la que ha sido estudiada la expresión de neuropéptidos, el cobaya pigmentado (*Cavia porcellus*), la expresión del CGRP y de la SP también está restringida a las neuronas sensoriales del trigémino, cuyas terminaciones estarían imbricadas entre las capas más

profundas del epitelio (Alamri et al., 2015; Ivanusic, Wood, & Brock, 2013). La expresión de estos neuropéptidos no coincide con la del TRPM8, lo que excluiría que estos neuropéptidos se expresasen en los receptores de frío, y que pudieran ser liberados por la activación de los mismos (Ivanusic et al., 2013). Sin embargo, la mitad de las neuronas que expresan TRPV1, co-expresan el CGRP (Alamri et al., 2015), y, a la inversa, el 80% de las neuronas que expresan el CGRP co-expresan, también, TRPV1. En esta especie, todas las neuronas que expresan el CGRP co-expresan, también, la SP (Ivanusic et al., 2013).

Por todo ello, actualmente se acepta que la expresión de la SP y el CGRP está restringida a la subpoblación de nociceptores polimodales, y que sólo puede ser evocada experimentalmente por la activación de los mismos.

1.3 Respuesta del epitelio corneal a su lesión: cicatrización epitelial de la córnea.

Tras una lesión del epitelio corneal, los tres elementos del mecanismo XYZ de Thoft (Thoft & Friend, 1983) se ven modificados, en mayor o menor grado, con la finalidad de recubrir el defecto epitelial en el menor plazo de tiempo posible. Así, se ha propuesto que, tras una fase de latencia inicial, las células del borde de la lesión sufren un proceso de desdiferenciación, y adquieren características migratorias, que permiten el cierre rápido del defecto epitelial. Los mecanismos que explican esta fase migratoria pueden incluir desde la emisión de pseudópodos que permiten un movimiento ameboideo de las células epiteliales basales (en la rana), hasta el deslizamiento (“sliding”, en la versión original inglesa) de las diferentes capas adyacentes a la zona lesionada en distintas especies, como el conejo (Hanna, 1966; Zhao, Song, Pu, Forrester, & McCaig, 2003), la vaca, la rata, el ratón y el ser humano (Zhao et al., 2003). La reorganización del citoesqueleto parece un fenómeno esencial para el proceso de migración epitelial, puesto que la administración de citochalasin D retrasa la cicatrización de las lesiones epiteliales de la córnea (Gipson, Westcott, & Brooksby, 1982). Además, acompañando a la migración de las diferentes capas epiteliales, se incrementaría la proliferación de células madre limbales, y su diferenciación hacia células *transient amplifying*, lo que contribuiría a recuperar la celularidad de epitelio corneal (Lavker et al., 2004). Algunos autores han encontrado que en la córnea humana en cultivo primario, las células epiteliales mantienen la suficiente capacidad migratoria y clonogénica como para poder regenerar por sí mismas —es decir, sin la participación de la células madre limbales— lesiones restringidas al epitelio corneal (Chang, Green, McGhee, & Sherwin, 2008).

En todo caso, una vez se ha recubierto el defecto epitelial se diferencian y las células que lo han rellenado comienzan a expresar las estructuras de adhesión, tanto entre ellas, como con las que no se vieron afectadas por la lesión, y la proliferación de las nuevas células basales vuelve a recomponer la estratificación normal del epitelio corneal (Liu & Kao, 2015; Ljubimov & Saghizadeh, 2015).

1.3.1.1 Moléculas de señalización extracelular

Tras la lesión del epitelio, en la córnea se producen diferentes factores de crecimiento y citoquinas, que permiten la coordinación de los procesos migratorios y proliferativos (Liu & Kao, 2015; Ljubimov & Saghizadeh, 2015; Zelenka & Arpitha, 2008). En resumen, EGF, HGF, FGF y KGF, se sobre-expresan y estimulan los fenómenos migratorios y de proliferación celular. Estos factores son producidos por las propias células epiteliales o los fibroblastos estromales, y pueden encontrarse también en la película lagrimal. De un modo similar actúan el IGF-1 y el NGF, que se han probado clínicamente en humanos con éxito para la reparación de úlceras corneales persistentes (Chikama, Fukuda, Morishige, & Nishida, 1998; Lambiase, Rama, Bonini, Caprioglio, & Aloe, 1998). Del mismo modo, otros factores de crecimiento, como el PDGF, thymosin-beta4 y OGF (Met5), así como la interleukina 6, el ATP (a través de receptores purinérgicos P2Y o P2X) y el Toll-like receptor 4 parecen estimular también la migración y/o proliferación del epitelio corneal en cicatrización (Ljubimov & Saghizadeh, 2015). Por su parte, el TGFbeta1 parece antagonizar la proliferación del epitelio inducida por la familia del EGF y del HGF (Ljubimov & Saghizadeh, 2015).

1.3.1.2 Vías intracelulares

Todas estas moléculas de señalización extracelular activan distintas cascadas moleculares intracelulares, lo que permite sugerir que puedan existir mecanismos de *cross-talk* entre ellas, tanto de potenciación recíproca como de antagonismo, a nivel intracelular. Debido a que estas vías todavía se están estudiando, el efecto de las mismas sobre los fenómenos de cicatrización todavía no está bien definido. Sin embargo, una serie de estudios ya antiguos sugieren que el AMPc parece jugar un papel central en la cicatrización epitelial de la córnea (M M Jumblatt, Fogle, & Neufeld, 1980; Marcia M. Jumblatt & Neufeld, 1981). Se ha comprobado que el AMPc se produce de manera constitutiva en el epitelio corneal, y que su concentración aumenta tras una lesión epitelial. Del mismo modo, la adición exógena de un análogo del AMPc acelera la curación de estas lesiones, y el bloqueo de su producción enlentece y o abole la misma. Aunque inicialmente se especuló con la posibilidad de que el incremento de la concentración intracelular de AMPc se debiera al aumento de liberación local de diferentes moléculas adrenérgicas,

procedentes de la inervación simpática de la córnea, posteriormente se ha descartado esta posibilidad (Marcia M. Jumblatt & Neufeld, 1981), y siguen sin conocerse las señales extracelulares que desencadenan este incremento de la concentración intracelular del AMPc.

Como se ha comentado anteriormente, tanto la unión de la SP y como del CGRP a sus respectivos receptores activa la adenilato ciclasa, aumentando la producción de AMPc.

1.3.1.3 Efectos de la SP sobre la cicatrización epitelial de la córnea.

De entre los péptidos codificados en el gen *Tac1*, la SP ha sido largamente propuesta como una molécula candidata a ser la mediadora de los efectos tróficos de las neuronas nociceptivas sobre el epitelio corneal. Sin embargo, la literatura previa presenta resultados contradictorios en ocasiones, que pueden ser atribuibles a la heterogeneidad de modelos experimentales usados para estudiar su efecto.

Por ejemplo, en el epitelio corneal del conejo, uno de los modelos experimentales más utilizados para estudiar la cicatrización epitelial de la córnea, no se ha encontrado expresión constitutiva del receptor NK1 en el epitelio corneal (Denis et al., 1991). Ello es congruente con la ausencia de efecto de la aplicación tópica ocular de SP sobre la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal en esta especie *in vivo* (Gallar, Pozo, Rebollo, & Belmonte, 1990; Kingsley & Marfurt, 1997; M Nakamura, Ofuji, Chikama, & Nishida, 1997). Sin embargo, en distintos modelos *in vitro* la SP parece estimular directamente el crecimiento de células epiteliales corneales de conejo (Garcia-Hirschfeld, Lopez-Briones, & Belmonte, 1994b; Reid, Murphy, Iwahashi, Foster, & Mannis, 1993) así como potenciar el efecto estimulante de IGF-1 sobre la migración de las mismas (Nishida et al., 1996), a través del receptor NK1 (Masatsugu Nakamura, Ofuji, Chikama, & Nishida, 1997). La diferencia de efectos entre ambos modelos experimentales sugiere que la expresión del receptor NK1 podría inducirse en situaciones *in vitro* en las células epiteliales corneales de esta especie. Adicionalmente, no se puede descartar que en los modelos *in vitro* la SP no estuviese actuando de manera inespecífica sobre otros receptores puesto que excepto en un caso, se usó a concentraciones por encima de las específicas para el receptor NK1 (Alexander et al., 2013).

De manera análoga, en el ojo humano la expresión de sitios de unión para la SP por autorradiografía parece estar restringida a la retina y la coroides (Kieselbach, Ragaut, Knaus, König, & Wiedermann, 1990). Sin embargo, en células epiteliales corneales humanas en cultivo primario se ha demostrado la expresión del ARNm de este receptor, así como la unión al mismo de SP a concentraciones que lo estimulan (Mau T Tran, Lausch, & Oakes, 2000). En este caso, la

unión de la SP a su receptor parece incrementar la expresión de la interleucina 8 (IL-8) por estabilización de los transcritos de la misma.

En contraste con lo observado en el conejo, en la córnea de la rata sí se ha descrito la expresión constitutiva de receptores para la SP por autorradiografía (Denis et al., 1991), aunque no se precisó más su posible localización. Del mismo modo, en un modelo de lesión unilateral del trigémino en esta especie, aparecieron lesiones espontáneas del epitelio corneal, que revertieron con la administración concomitante de SP e IGF-1 (T. Nagano et al., 2003). Sin embargo, el efecto aislado de la SP no se probó en este trabajo, por lo que no se puede establecer su papel concreto en el proceso.

Por lo tanto, tanto la especie en la que se estudie el proceso de cicatrización epitelial de la córnea, como el modelo experimental, parecen variables que pueden afectar a la comprensión de los efectos de la SP sobre dicho proceso.

1.3.1.4 Efectos del CGRP sobre la cicatrización epitelial de la córnea.

Aunque el CGRP es el principal neuropéptido corneal -tanto por número de fibras inmunorreactivas al mismo (He & Bazan, 2016; Ivanusic et al., 2013), como por concentración tisular (Linda J. Müller et al., 2003; Schmid et al., 2005)-, no se han encontrado sitios de unión para el CGRP en el epitelio corneal de distintas especies, como el mono, el gato, el cerdo o el cobaya. En estas especies sí se han podido identificar por autorradiografía sitios de unión para el CGRP en diferentes estructuras vasculares y del cuerpo ciliar, el iris y el ángulo esclero-corneal, lo que sugiere que el papel del CGRP en la biología ocular sería, predominantemente, en los procesos que regulan la presión intraocular (Heino, Oksala, Luhtala, & Uusitalo, 1995; Malminiemi & Malminiemi, 1992). Sin embargo, también parece haber sitios de unión en la conjuntiva limbal (Heino et al., 1995). En todo caso, la cantidad y distribución de estos sitios de unión parece depender de la especie estudiada (Heino et al., 1995). En el caso de la especie humana se desconoce la expresión de receptores para el CGRP en los diferentes tejidos oculares. De modo análogo a lo descrito para la SP, el CGRP parece estimular la expresión de IL-8 en células epiteliales corneales humanas en cultivo primario (M. T. Tran, Ritchie, Lausch, & Oakes, 2000).

De manera similar a lo descrito para la SP, en la córnea del conejo no parece existir expresión constitutiva de la proteína RCP (la proteína central del complejo heteromérico del CGRP) (Rosenblatt, Dahl, & Dickerson, 2000). Aunque el efecto del CGRP sobre la cicatrización epitelial de la córnea en esta especie no se ha estudiado *in vivo*, en un modelo *in vitro* de cicatrización epitelial en cultivo de bloques corneales de conejo, el CGRP estimuló la migración

epitelial (Mikulec & Tanelian, 1996). Por el contrario, la aplicación de CGRP a células epiteliales corneales de conejo en cultivo primario disminuyó el número de estas últimas (Garcia-Hirschfeld et al., 1994b). En ambos casos el CGRP se usó a concentraciones por encima de las selectivas para su efecto sobre su receptor (Alexander et al., 2013).

En la rata la expresión del receptor para el CGRP ha sido demostrada por inmunofluorescencia en la retina (Blixt, Radziwon-Balicka, Edvinsson, & Warfvinge, 2017), pero se desconoce si este receptor se expresa en el epitelio corneal. Sin embargo, la aplicación tópica de resiniferatoxina, un análogo potente y de larga duración del receptor TRPV1 (Bates et al., 2010), produce una depresión profunda de la sensibilidad corneal a estímulos químicos y una gran reducción de la inmunorreactividad de los nervios corneales al CGRP que no afectó al proceso de cicatrización epitelial de la córnea *in vivo* en esta especie.

1.4 El ojo del ratón (*Mus musculus*) como modelo experimental.

Los roedores y, de entre ellos, el ratón (*Mus musculus*), son los animales más usados en experimentación animal (Jennings et al., 1998). Desde la década de los 30 del pasado siglo XX, el ratón ha sido el animal de elección en la investigación experimental (Rosenthal & Brown, 2007). A pesar de ello, hasta épocas recientes han sido poco utilizados en la investigación ocular, posiblemente porque las similitudes anatómicas entre el ojo de otras especies animales (como el conejo, el cerdo o la vaca) con el ojo humano, así como su tamaño, permite una extrapolación más directa de técnicas diagnósticas y terapéuticas convencionales, propias de la oftalmología clínica, a la investigación básica, y viceversa. Del mismo modo, por estas mismas razones parece lógico pensar que los resultados obtenidos en estos otros modelos sean, igualmente, más fácilmente extrapolables al diagnóstico y tratamiento de procesos patológicos que interesen al ojo humano.

Sin embargo, la comprobación de la alta homología genética existente entre el genoma humano y el del ratón (Waterston et al., 2002), la similitud de las características fisiológicas y patológicas de ambas especies (Rosenthal & Brown, 2007) y la relativa facilidad actual de poder obtener cepas de ratones modificadas genéticamente ha despertado el interés por el uso de estos animales también en la investigación ocular.

1.4.1 La córnea del ratón.

La estructura general de la córnea del ratón es similar a la de las restantes especies de vertebrados. Consta de las mismas cinco capas, aunque igual que se ha discutido para otras especies animales, debido a la dificultad para visualizar la capa de Bowman en las preparaciones de microscopía óptica, se ha dudado de su existencia. Sin embargo, estudios con microscopía electrónica confirman su presencia en la córnea del ratón (R. Smith, 2000).

En el ratón, el epitelio corneal parece derivar de células ectodérmicas Pax-6 positivas (Lwigale, 2015). Desde E12.5 hasta el nacimiento, el epitelio tiene dos capas celulares, que sobre E15.5 comienzan a expresar citoqueratina K12. En P12, tras la apertura palpebral, comienza una fase de rápida proliferación que permite que a las 10 semanas de vida extrauterina el epitelio tenga ya su estructura madura, con entre 6 y 8 capas de células.

Durante el envejecimiento normal del ojo del ratón de laboratorio, se ha descrito la posibilidad de que aparezcan depósitos mineralizados subepiteliales y en el estroma anterior (R. Smith, 2000). Estos depósitos son extracelulares, basofílicos y de aspecto globular, y pueden asociarse a adelgazamientos o ulceraciones del epitelio suprayacente. Del mismo modo, en animales viejos se ha descrito la presencia de neovascularización corneal y de queratitis, posiblemente relacionados con el lecho de las jaulas de estabulación, o resultado de la interacción con otros ratones (R. Smith, 2000). Igualmente se han identificado cepas susceptibles de desarrollar blefarokonjuntivitis, que se asocia a un mayor riesgo de que los animales padezcan queratitis y sus secuelas (R. Smith, 2000).

1.4.2 Inervación corneal del ratón.

Entre E12.5 y E13.5 comienza a desarrollarse la inervación corneal: fascículos nerviosos penetran desde los cuatro cuadrantes de la córnea formando un plexo estromal, del que deriva un plexo subbasal desde el que las neuronas sensoriales comienzan a inervar el epitelio en E16.5, es decir, desde sus primeras fases de desarrollo (Lwigale, 2015; McKenna & Lwigale, 2011). A diferencia de lo que ocurre en otras especies, estas fibras no forman un anillo limbal o pericorneal (Lwigale, 2015; McKenna & Lwigale, 2011). A las tres semanas de vida postnatal, los nervios subbasales se orientan hacia el centro de la córnea generando el patrón de terminación en un remolino («*swirl*» en el original inglés), similar al que se observa en los humanos. El desarrollo de la inervación corneal parece depender tanto de factores neurotróficos (NGF, BDNF, GDNF, neurotrofina 3) como de moléculas de guía axonal (semaforina 3A, Nrp1, Slit2/Robo1), actuando

sobre sus respectivos receptores (de Castro et al., 1998; Lwigale, 2015). En el ratón, durante los dos primeros meses de vida la densidad de inervación epitelial de la córnea aumenta significativamente, para comenzar a declinar a partir de ese momento (C. Wang, Fu, Xia, & Li, 2012). La distribución de las terminaciones sensoriales corneales en el ratón muestra un patrón altamente dinámico, pudiendo variar en períodos tan cortos como dentro de un mismo día (Harris & Purves, 1989). Este fenómeno de remodelado se ha relacionado con el continuo reemplazamiento de las células epiteliales corneales.

Con marcajes retrógrados desde la córnea, se ha estimado que en el trigémino del ratón existen unas 250 neuronas con campo receptor corneal, el 70% de la cuales tienen un soma pequeño (De Felipe, Gonzalez, Gallar, & Belmonte, 1999). Considerando que el número de neuronas del trigémino se ha estimado en 19000, las neuronas corneales representan, por tanto, alrededor del 1,5 % de las mismas. Los somas de estas neuronas son de tamaño pequeño o medio, y se localizan en la zona dorso-medial del ganglio, considera como la región oftálmica (De Felipe et al., 1999; C F Marfurt, 1981b).

Con respecto a su comportamiento electrofisiológico, se han identificado varias subpoblaciones de neuronas sensoriales corneales (Cabanes, Lopez de Armentia, Viana, & Belmonte, 2002; López de Armentia, Cabanes, & Belmonte, 2000). Respecto a su velocidad de conducción, se las clasifica en A (mielínicas, con velocidades de conducción superiores a los 1,5 m/s), y C (amielínicas, con velocidades de conducción inferiores o iguales a 1,5 m/s). Prácticamente todas las del tipo C y 2/3 de las del tipo A, presentaron una «joroba» (*hump* en la versión original inglesa) en la fase repolarizante del potencial de acción. Este subtipo de neuronas, cuyos potenciales de acción son tetrodotoxin-resistentes, se consideran neuronas nociceptivas polimodales (tanto A δ como C), mientras que las que carecen de tal característica electrofisiológica se consideran fundamentalmente neuronas mecanosensoriales puras de tipo A δ (Cabanes et al., 2002). Se ha sugerido, igualmente, que una subpoblación neuronal con alta resistencia eléctrica podría corresponder a neuronas sensibles al frío (Orio et al., 2012). Todo ello sugiere que las diferentes poblaciones de neuronas sensoriales de la córnea del ratón podrían ser similares a las de otras especies, como las descritas en la córnea del gato (Gallar et al., 1993). En un solo trabajo en la literatura, con registros electrofisiológicos *in vivo*, se ha propuesto que las neuronas sensoriales corneales del ratón no serían de tipo nociceptivo, al presentar bajos umbrales de activación al ser estudiadas bajo estas condiciones experimentales (Boada, 2013).

Mediante una adaptación del registro focal de la actividad eléctrica de las terminales sensoriales de la córnea inicialmente desarrollada para estudiar la córnea del cobaya (Brock,

McLachlan, & Belmonte, 1998), recientemente se ha podido comprobar que las terminales sensoriales corneales del ratón son mayoritariamente sensibles al frío o de tipo polimodal, y menos del 10% pueden ser mecanosensibles puras (González-González, Bech, Gallar, Merayo-Llves, & Belmonte, 2017). En este mismo trabajo se ha sugerido la existencia de dos subpoblaciones de terminales sensibles al frío, a saber, unas con baja actividad espontánea y alto umbral de activación, y otra con alta actividad espontánea y bajo umbral de activación, cuyas características funcionales parecen modificarse durante el envejecimiento normal del ojo del ratón, en aparente asociación con la producción anormalmente alta de lágrima en los animales envejecidos (Alcalde et al., 2018).

En todo caso, se ha podido comprobar recientemente (Joubert et al., 2018) que la lesión experimental del epitelio corneal del ratón por diferentes modos, aumenta la actividad eléctrica de fibras de los nervios ciliares, lo que correlaciona de modo directo con la sensibilidad corneal frente a diferentes estímulos, en distintos test conductuales.

Además de la inervación sensorial, en un estudio comparativo con otras especies de mamíferos (rata, cobaya, hámster y humano), se ha comprobado que la distribución de las fibras nerviosas corneales inmuno-reactivas a la tirosina hidroxilasa en el ratón presenta la menor densidad de todas estas especies (C F Marfurt & Ellis, 1993). La extirpación del ganglio cervical superior elimina en una gran mayoría estas fibras, lo que sugiere que son de origen fundamentalmente simpático.

1.4.3 Expresión de neuropéptidos en las neuronas sensoriales de la córnea del ratón.

En algunos trabajos se ha encontrado que el 40% de las 250 – 270 neuronas trigeminales que inervan la córnea del ratón son inmunorreactivas para la SP o el CGRP (LaVail, Johnson, & Spencer, 1993). En otros, se ha podido comprobar que casi el 60% de las neuronas con campo receptor corneal son inmunorreactivas para el CGRP mientras que alrededor del 20% lo son para la SP. Del resto de las neuronas trigeminales, sin campo receptor corneal, alrededor del 4% presentaron inmunorreactividad frente a la SP, y el 5.8% frente al CGRP. De todas las neuronas inmunorreactivas al CGRP, el 13% tenía campo receptor corneal mientras que de las inmunorreactivas a la SP, sólo el 6% lo tenía.

Respecto a su distribución en el epitelio corneal del ratón, el 70% de las fibras del plexo subbasal del centro de la córnea son inmunorreactivas para el CGRP, mientras que el 58% lo son

para la SP (He & Bazan, 2016). Del mismo modo, el 62% de las terminales intraepiteliales son inmunorreactivas frente al CGRP y el 59% a la SP. El 57% de los troncos nerviosos corneales, en su entrada limbal, son inmunorreactivos para el CGRP y el 51% para la SP. En el conjunto del ganglio, el 32% de las neuronas son inmunorreactivas para el CGRP y el 26%, para la SP. Todas las inmunorreactivas para la SP presentaron, también, doble marcaje para CGRP.

1.4.4 Cicatrización de las lesiones epiteliales de la córnea del ratón.

La cicatrización de lesiones epiteliales corneales del ratón es un fenómeno rápido, en el que pueden participar varios mecanismos. Por ejemplo, defectos epiteliales de entre 1 y 1.4 mm de diámetro se reparan en un período de entre 12 y 16 horas (Buck, 1979), y los de mayor diámetro en unas 24. En la literatura existen resultados contradictorios sobre el efecto que el fondo genético del ratón pudiera tener sobre la cicatrización epitelial de la córnea. Por ejemplo, algunos autores han encontrado que la cepa C57BL/6 cicatriza más rápido que la BALBc (Pal-Ghosh, Tadvalkar, Jurjus, Zieske, & Stepp, 2008), mientras que otros han encontrado justo lo opuesto (Pham, Kakazu, He, & Bazan, 2018). En lo que sí parece haber más consenso es que el proceso de cicatrización presenta dimorfismo sexual, de modo que, independientemente del fondo genético, las lesiones del epitelio corneal cierran más lentamente en las hembras que en los machos (Pham et al., 2018; S. B. Wang et al., 2012). Las razones para ello no parecen estar del todo claras, pero se ha comprobado que el epitelio corneal del ratón presenta una expresión basal de genes diferente entre machos y hembras (Suzuki, Richards, Liu, Jensen, & Sullivan, 2009).

Un primer mecanismo que podría explicar la cicatrización del epitelio corneal es la migración de las células adyacentes para cubrir el defecto epitelial. De modo similar a lo descrito anteriormente, este mecanismo parece implicar el «*sliding*» de todas las capas del epitelio adyacente a la lesión (Zhao et al., 2003). En el caso del ratón, se ha comprobado, además, que se produce una reorganización de los microfilamentos de actina en las células del borde migratorio de la lesión (Danjo & Gipson, 1998). En estas células, los haces de F-actina se disponen en forma de un anillo, de forma más o menos paralela al borde migratorio de la lesión, interconectándose entre las diferentes células por uniones del tipo E-cadherina (Danjo & Gipson, 1998). Se ha sugerido, por tanto, que este mecanismo pueda contribuir al cierre de los defectos epiteliales generando tracción, al modo de los hilos que cerraban las antiguas bolsas de monedas («*purse string*»). Además, en el ratón, a las 12 horas de producirse una despitelización corneal central, comienza a aumentar la proliferación de células alejadas al borde de la lesión (Hanna, 1966), y la del nicho de células madre del limbo esclero-corneal (Cotsarelis, Cheng, Dong, Sun, & Lavker,

1989), fenómeno que alcanza su máximo a las 24 horas de la lesión. No se conocen, sin embargo, cuáles podrían ser los mecanismos de señalización que explicarían esta respuesta proliferativa de las células madre del limbo esclero-corneal.

Por tanto, los mecanismos que explican la cicatrización epitelial de la córnea del ratón parecen similares a los descritos para la especie humana.

1.4.5 Efectos de los neuropéptidos sobre la cicatrización del epitelio corneal del ratón.

La expresión constitutiva de receptores NK1 o para el CGRP en la córnea del ratón no se ha descrito hasta el momento. Indirectamente se ha observado que ratones KO para el receptor NK1 presentan una reducción de la inervación corneal, una reducción de la producción lacrimal basal, y un incremento de la densidad de las células del epitelio corneal (Gaddipati et al., 2016), lo que implicaría a la SP, actuando a través de dicho receptor, en estos procesos. Del mismo modo, en experimentos *in vitro* la SP parece tener proteger las células de una línea epitelial corneal de ratón del daño inducido por su exposición a soluciones hiperosmóticas, a través, también, del receptor NK1 (Yang et al., 2016). Se ha observado también que el desarrollo de neovascularización corneal inducida por diferentes modelos de lesión de la córnea del ratón, se atenúa con el uso del inhibidor del receptor NK1, Lanepitant (Bignami et al., 2014). Todo ello sugiere que este receptor estaría expresándose en el epitelio corneal, y que ejercería funciones biológicas. Por su parte, en ratones KO para la expresión del gen Tac1 (Barbariga, Rabiolo, et al., 2018) se ha mostrado que los animales carentes de la expresión de dicho gen no muestran alteraciones epiteliales espontáneas. Aunque no se mostraron resultados de la cicatrización corneal en estos animales, en respuesta a una abrasión mecánica de todo el epitelio corneal los animales Tac1-KO mostraron unos menores índices de neovascularización capilar y linfática, una menor infiltración por células CD45⁺ y una menor expresión de IL-1 β . Del mismo modo, se ha encontrado que el desarrollo de neovascularización corneal también está reducido en animales KO para el CGRP (Toriyama et al., 2015).

Sin embargo, no parecen existir en la literatura datos previos respecto al papel de estos neuropéptidos sobre la cinética de la cicatrización epitelial *in vivo* en ratones carentes de la expresión de los mismos.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

*Miguel
Hernández*



El mantenimiento de la integridad de la superficie ocular precisa de la interacción, compleja y dinámica a lo largo del tiempo, de múltiples estructuras nerviosas y oculares. Se ha propuesto que el funcionamiento conjunto de todas estas estructuras forma una “unidad funcional” (Stern et al., 1998b, 1998a), de modo que el daño de cualquiera de sus elementos altera el funcionamiento del conjunto. En este contexto, la inervación sensorial del polo anterior del ojo, especialmente la inervación sensorial de la córnea jugaría, pues, un papel primordial como vía aferente de las respuestas protectoras de la superficie ocular, como la lagrimación o el parpadeo. Desde esta perspectiva es desde la que se ha entendido clásicamente el papel de la inervación sensorial de la córnea sobre el mantenimiento de la integridad de las estructuras del polo anterior del ojo, especialmente, el epitelio corneal.

Debido a que el daño estructural de la división oftálmica del trigémino altera la vía aferente del control de la producción lacrimonal, la contribución de la desecación secundaria de la superficie ocular al desarrollo de la queratitis neurotrófica *in vivo* dificulta el poder comprobar el papel directo de las neuronas sensoriales sobre el mantenimiento trófico o la cicatrización del epitelio corneal. Así, por ejemplo, en un modelo de denervación en la rata (Sigelman & Friedenwald, 1954) sólo se observó una disminución de la actividad mitótica del epitelio corneal en aquellas zonas del mismo cuya superficie se había desecado de manera secundaria a la lesión, mientras que no se observó dicho fenómeno en aquellas zonas que permanecieron adecuadamente humedecidas. Del mismo modo, en un modelo de denervación sensorial en primates (Alper, 1975a), en el que se realizaron neurotomías de la división oftálmica a distintos niveles, se observó que se producía una atrofia del epitelio corneal independientemente de la localización de la lesión nerviosa. Sin embargo, sólo se producía una degeneración *walleriana* de la inervación corneal en aquellos casos en los que la lesión interesaba exclusivamente a la división oftálmica. Del mismo modo, sólo cuando la lesión se realizaba a este nivel como cuando interesaba directamente al ganglio trigémino, se producía una cromatolisis de las células ganglionares trigeminales, que se acompañaba de una inflamación crónica del limbo esclerocorneal. En esta misma serie de experimentos, sólo aparecieron lesiones epiteliales espontáneas, similares a las de la queratitis neurotrófica, en aquellos animales en los que accidentalmente se rompió la tarsorrafia que les cubría la superficie ocular. Del mismo modo, en un modelo en conejo (Gilbard & Rossi, 1990a) se ha podido comprobar que la osmolaridad de la lágrima aumenta tras la cauterización experimental del trigémino, lo que se acompaña de un adelgazamiento del epitelio corneal, y una disminución de la densidad de células caliciformes en la conjuntiva ocular. Por tanto, se considera que existe un componente de la queratitis neurotrófica atribuible en cierto modo a la desecación de la superficie ocular. Para poder

demostrar el efecto directo de la inervación sensorial de la córnea sobre el epitelio sería interesante, pues, disponer de modelos en los que se puedan evitar este tipo de efectos secundarios de los modelos basados en la lesión nerviosa.

Los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 y Calca son moléculas candidatas a explicar los efectos tróficos sobre el epitelio corneal que se atribuyen a las neuronas sensoriales corneales. Sin embargo, las evidencias que permiten involucrarlos en estos procesos han sido obtenidas o bien en modelos en los que se ha dañado la inervación sensorial, o bien en modelos *in vitro*. Por ello, en el presente trabajo de investigación se propone utilizar ratones manipulados genéticamente para evitar selectivamente la expresión de dichas sustancias. La utilización de este modelo experimental permitiría estudiar el proceso de cicatrización del epitelio corneal en ausencia de dichas moléculas *in vivo*, sin necesidad de dañar estructuralmente la vía nerviosa sensorial de la córnea. Consecuentemente, en este modelo se evitarían los principales sesgos asociados a dichos modelos.

Por tanto, se puede hipotetizar que si, en efecto, estos neuropéptidos participan en el mantenimiento trófico del epitelio corneal o en su cicatrización, dichos procesos se verán alterados en los animales en los que se ha evitado su expresión, en comparación con animales en los que dichas moléculas sí se estén expresando.

Para comprobar esta hipótesis, en el presente trabajo se pretende analizar si la eliminación de la expresión de los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 o Calca del ratón:

1. Produce alguna alteración fenotípica estructural ocular, macro o microscópica.
2. Causa alguna alteración funcional de la vía nerviosa sensorial, bien sobre la percepción de estímulos nociceptivos, o sobre el control autónomo de la producción lacrimal. Y,
3. Afecta el proceso de cicatrización epitelial de la córnea y, en su caso, si ello obedece al efecto directo de estos neuropéptidos sobre las células epiteliales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS





3.1 Animales

3.1.1 Manipulación general.

El trabajo experimental realizado en la presente Memoria de Tesis Doctoral sobre animales vivos, intentó ajustarse en todo momento a la regla de las tres «R» (Jennings et al., 1998; Morton et al., 2001): a) *refinamiento* de las técnicas experimentales; b) *reducción* del número de animales empleados; y c) *reemplazamiento*, cuando fue posible, de los experimentos *in vivo* por otras alternativas *in vitro*.

Siguiendo las recomendaciones de Hooijmans, et al (Hooijmans, Leenaars, & Ritskes-Hoitinga, 2010) se describen las condiciones de mantenimiento de los animales. Los animales se estabularon en las instalaciones que el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández (UMH) tiene en el Campus de Sant Joan d'Alacant. Los animales se mantuvieron en cajas, separados por sexo, en grupos de 5-6 por caja, con comida tipo «*pellet*» y agua *ad libitum*, en condiciones de temperatura y humedad controladas, y con un ciclo circadiano de luz:oscuridad 12:12. Inmediatamente tras su recepción, se les sometió a cuarentena, y durante su mantenimiento pasaron los controles sanitarios pertinentes. Para su utilización experimental, los animales fueron trasladados al laboratorio cuyas condiciones ambientales eran bastante estables al estar dotado de aire acondicionado con control independiente. Para minimizar su estrés, se les dejó aclimatarse a dicho ambiente al menos 30 min, transcurridos los cuales comenzaban los procedimientos experimentales correspondientes. Cuando así lo precisaba el procedimiento experimental, los animales fueron devueltos a las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal, donde permanecieron hasta la siguiente vez en que fue necesario trasladarlos de nuevo al laboratorio. Del mismo modo, una vez terminado el trabajo experimental con los animales, o cuando fue preciso obtener tejidos procedentes de los mismos, se aplicó alguno de los procedimientos de eutanasia éticamente aceptados para roedores adultos (eutanasia en cámara de CO₂, dislocación cervical, sobredosis anestésica) (Close et al., 1996).

Los procedimientos experimentales empleados para realizar los experimentos descritos en la presente Memoria se ajustaron en todo momento a las recomendaciones contenidas en la *Resolution on the Use of Animals in Vision and Eye Research* de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology*, y las recomendaciones de la *International Association for the Study of Pain*, así como a la legislación vigente sobre uso de animales en investigación. Todos los

procedimientos experimentales contaron con la aprobación del Comité de Ética en la Investigación Experimental de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

3.1.2 Características de las cepas de ratones utilizadas.

En los diferentes procedimientos experimentales se compararon los resultados obtenidos en dos cepas de animales modificados genéticamente (véase a continuación) con los de la cepa cuyo bagaje genético compartían (C57BL/6; WT). Estos últimos fueron obtenidos de la colonia del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández. Se compararon animales de edades similares, y, siempre que fue posible, se intentó igualar la proporción de machos y hembras.

3.1.2.1 Ratones en los que se eliminó la expresión de los neuropéptidos codificados en el gen Tac1 (sustancia P y neuroquinina A).⁷

Se usaron ratones consanguíneos en los que se eliminó la expresión de los neuropéptidos sustancia P y neuroquinina A (Tac1^{tm1Pig}, Tac1-KO) (Zimmer et al., 1998). Esta cepa se creó reemplazando parte de los exones 2 y 3 del gen Tac1 con un cassette de resistencia a neomicina en células madre embrionarias MPI2, de las que derivaron quimeras que se cruzaron con ratones C57BL/6J. Por entrecruzamiento de animales heterocigotos para la mutación, se consiguió obtener animales homocigotos para la misma.

Estos animales no mostraron alteraciones fenotípicas, fueron fértiles y viables, con tamaños y pesos similares a los WT. Los mutantes Tac1-KO no expresaban sustancia P ni neuroquinina A, pero la expresión de la neuroquinina B no se vio afectada. Del mismo modo, en el asta dorsal de la médula espinal la distribución de neuronas inmunorreactivas para el CGRP fue similar a la de los animales WT. Debido a la co-expresión de SP y α CGRP en estas neuronas, los autores interpretaron estos resultados como que no se había producido una alteración en el número de neuronas sensoriales debida a la mutación. En el estriado de los animales Tac1-KO sí se observó un mayor número de receptores NK1.

Estos animales no mostraron diferencias con los WT en el «*tail flick test*» -realizado tanto en condiciones basales, como tras someterlos a un estímulo estresante (90 segundos de natación

⁷ Deseo manifestar nuestro agradecimiento al Dr. Andreas Zimmer (Institut für Molekulare Psychiatrie, Rheinische Friederich-Whilhems-Universität Bonn, Alemania), por la cesión de estos animales.

en agua a 4°C)-, ni en el test de las contracciones abdominales inducidas por la inyección intraperitoneal de ácido acético. Por el contrario, los animales mostraron una mayor latencia en el «*hot plate test*» y una ausencia de respuestas dolorosas en ambas fases del test de la formalina (Zimmer et al., 1998). Estas últimas no se han observado con posterioridad (Matak, Tékus, Bölcskei, Lacković, & Helyes, 2017). Recientemente se ha observado, también, que estos animales no tienen alteradas las respuestas nociceptivas tras la inyección articular del adyuvante de Freund (Borbély et al., 2013).

Por ello, los autores concluyeron que los neuropéptidos sustancia P y neuroquinina A podrían tener su papel, fundamentalmente, en el procesamiento supraespinal de las sensaciones nociceptivas (Zimmer et al., 1998).

3.1.2.2 Ratones en los que se eliminó la expresión del receptor NK1⁸.

Algunos experimentos descritos en la presente memoria pudieron realizarse, además, en ratones consanguíneos en los que se eliminó la expresión constitutiva del receptor NK1 (Tacr1^{tm15ph}, NK1-KO) (Felipe et al., 1998). Estos animales se crearon sustituyendo el exón 1 del gen por un cassette que contenía el gen IRES-lacZ y un gen de resistencia a neomicina en células madre embrionarias HM-1, que se inyectaron en blastocistos C57BL/6. Los machos quiméricos se cruzaron con hembras C57BL/6, y por entrecruzamiento de animales heterocigotos se obtuvieron animales homocigotos para la mutación, que se cruzaron entre sí para expandir la colonia. Los animales así creados fueron viables, fértiles y saludables (Felipe et al., 1998).

Esta cepa de ratones NK1-KO no presenta expresión de receptor NK1 ni en la médula espinal ni en el cerebro, y parece mantener conservada tanto la intensidad como el patrón de expresión de la SP y el CGRP en ambas localizaciones. Estos animales tienen alterada la capacidad de codificación de los estímulos nociceptivos de tipo mecánico, lo que se atribuyó a una disminución del control inhibitorio descendente. Del mismo modo, no presentan fenómeno de «*wind up*». En distintos modelos experimentales de dolor agudo con estimulación eléctrica, mecánica o térmica nociva, los umbrales de respuesta eran similares a los de los animales WT, por lo que se concluyó que la SP no media las respuestas nociceptivas agudas. Por el contrario, en distintos modelos de inflamación neurogénica mediante la inyección intradérmica de capsaicina o de carragenina se observó una disminución muy marcada de la inflamación tisular en

⁸ Deseo manifestar nuestro agradecimiento a los Dres. Carmen de Felipe (Instituto de Neurociencias, UMH-CSIC, España) y Stephen P. Hunt (University College London, UK), por la cesión de estos animales.

los animales NK1-KO. Del mismo modo, los animales NK1-KO mostraron una disminución de las respuestas nociceptivas en el test de la formalina (Felipe et al., 1998), aunque con posterioridad no se ha visto este efecto (Matak et al., 2017). El desarrollo de hiperalgesia inducido por la inyección del adyuvante de Freund, no se vio alterado en los animales NK1-KO (Felipe et al., 1998), aunque, sin embargo, posteriormente se ha observado lo contrario (Borbély et al., 2013).

Tanto en modelos de dolor agudo por inyección de formalina, como de dolor crónico (inflamatorio o neuropático), la toxina botulínica disminuye las respuestas nociceptivas. Este efecto no se observó ni en animales Tac1-KO ni en NK1-KO (Matak et al., 2017).

Aunque los animales NK1-KO parecen desarrollar el mismo grado de inflamación de las vías respiratorias en un modelo de asma alérgico inducido por la exposición a la ovoalbúmina que los WT, sí que parecen tener algunos cambios basales en este tejido, como una hiperplasia de la «*goblet cells*» (De Swert, Tournoy, Joos, & Pauwels, 2004). Tanto los ratones NK1-KO como los Tac1-KO muestran una mayor susceptibilidad a la infección que los WT en un modelo de infección vírica respiratoria, mientras que, paradójicamente, el doble KO para ambos presenta una mayor resistencia a la misma (Quinn et al., 2011).

En diferentes test conductuales se pudo comprobar que estos animales no tienen alterada la ansiedad, aunque presentan menor agresividad, así como una reducción de la analgesia, tanto mediada por la morfina, como desencadenada por estímulos estresantes.

Estos animales parecen tener una mayor neurogénesis en hipocampo mediada por una mayor expresión de BDNF, que, sin embargo, no se acompaña de una mayor supervivencia neuronal (Morcuende et al., 2003).

Estos animales parecen tener también elevada la producción de noradrenalina (Herpfer, Hunt, & Stanford, 2005), aunque asociada a una desensibilización de los receptores α -adrenérgicos (Fisher, Stewart, Yan, Hunt, & Stanford, 2007).

3.1.2.3 Ratones en los que se eliminó la expresión del α CGRP.⁹

Se usaron ratones consanguíneos en los que se había eliminado la expresión del α CGRP (Calca^{tm1pc}, α CGRP-KO) (Salmon et al., 1999). Esta cepa fue creada eliminando selectivamente por recombinación homóloga el exón 5 del gen de la calcitonina. El constructo inicial fue introducido en células madre embrionarias HM-1, que se inyectaron en blastocistos de origen genético

⁹ Deseo manifestar nuestro agradecimiento al Dr. Jean Pierre Changeux (Institut Pasteur, Francia), por la cesión de estos animales.

C57B1/h6. Tras la obtención de animales heterocigotos estos se cruzaron, para la expansión y mantenimiento de la cepa, con ratones C57BL/6. Por entrecruzamiento de animales heterocigotos para la mutación, se consiguió aislar individuos homocigotos carentes de la expresión selectiva del α CGRP, que se cruzaron entre sí para expandir la colonia. Los animales así creados fueron viables, fértiles y no presentaron anomalías fenotípicas llamativas (Salmon et al., 1999).

En los animales α CGRP-KO se ha descrito una atenuación muy marcada de la inmunorreactividad frente al α CGRP en las astas dorsales de la médula espinal, donde no termina de desaparecer del todo. Se ha hipotetizado que esta inmunorreactividad residual podría ser debida a la reactividad cruzada del anticuerpo frente al β CGRP (Salmon et al., 1999). En todo caso, no se observaron diferencias en los niveles de sustancia P (Salmon et al., 1999), ni de β CGRP (Schütz, Mauer, Salmon, Changeux, & Zimmer, 2004b) respecto a los animales WT, lo que parece indicar que no existen fenómenos de sobrecompensación de estas moléculas entre sí, en la cepa de animales carentes de la expresión del α CGRP.

Del mismo modo, se ha comprobado la ausencia de inmunorreactividad para el α CGRP en las astas anteriores de la médula espinal, así como en las placas motoras, aunque el desarrollo de estas últimas no pareció verse afectado (Salmon et al., 1999) en los animales α CGRP-KO, por lo que no es esperable que estos animales tengan limitada su capacidad de movimiento en aquellos experimentos descritos en la presente memoria en los que se estudian respuestas con componente motriz (véase más adelante).

En estudios sobre la percepción de las sensaciones dolorosas, no se han descrito diferencias en la latencia de la respuesta ni en el «*tail flick test*», que mide respuestas espinales al dolor, ni en el «*hot plate test*», que mide respuestas supraespinales al dolor (Salmon et al., 2001). Los animales α CGRP-KO sí mostraron, por el contrario, una atenuación de la respuesta algésica a la inyección plantar de capsaicina, en el test de la formalina y en un test de dolor visceral abdominal por inyección intraperitoneal de ácido acético (Salmon et al., 2001). Ello parece sugerir la implicación del α CGRP en los procesos de inflamación neurogénica y de dolor inflamatorio, y no así en los procesos de dolor agudo. Del mismo modo, se apreció una atenuación de la capacidad antinociceptiva de la morfina en el «*tail flick test*» (Salmon et al., 1999). Los animales α CGRP-KO mostraron, igualmente, una reducción de los signos del síndrome de abstinencia de opioides (Salmon et al., 2001). Todo ello permitió sugerir a los creadores de la cepa que el α CGRP podría estar involucrado en las vías opioides.

3.2 Procedimientos anestésicos.

En los experimentos que precisaron de la anestesia de los animales de experimentación, ésta se realizó mediante la inyección intraperitoneal, usando una aguja hipodérmica de 30G, de una mezcla de clorhidrato de ketamina (Imalgene® o Ketolar®, 100 mg·kg⁻¹), e hidrocloreuro de xilazina (Xilagesic® o Rompún®, 10 mg·kg⁻¹). Esta combinación anestésica no parece afectar a la secreción lacrimonal estimulada por la administración intraperitoneal de pilocarpina en el ratón (Moore, Ma, Yang, & Verkman, 2000). Se comprobó que la anestesia estuviera en plano profundo por presión de la pata trasera, ajustando convenientemente la dosis hasta alcanzar dicho plano.

3.3 Estudios histológicos.¹⁰

Para comprobar si la eliminación de los neuropéptidos causó alguna alteración estructural durante el desarrollo del ojo, se estudiaron mediante los siguientes procedimientos histológicos los ojos de algunos animales.

3.3.1 Histología general.

Se sacrificó a los animales por dislocación cervical e inmediatamente a continuación se extrajeron los globos oculares. Tras lavarlos en PBS, se fijaron en fijador de Clarke (3:1 vol:vol, etanol absoluto y ácido acético glacial) durante 24 h. A continuación, el tejido se deshidrató en una serie de alcoholes: tres lavados de 20 minutos en etanol absoluto, un lavado de la misma duración en alcohol de 80º, y un último lavado de la misma duración en alcohol de 70º. Posteriormente se incluyeron en parafina, realizando, al menos, 3 o 4 cambios de la misma. Tras solidificar la misma, se mantuvieron a 4ºC hasta que se cortaron (20 µm) y se tiñeron con tinción de violeta de cresilo, para su posterior observación microscópica.

¹⁰ Deseo agradecer a los Dres. Albrecht May (Anatomisches Institut II, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Alemania), Nicolás Cuenca (Universidad de Alicante), Kamila Mizerska y Sonia Bonilla Jiménez (Instituto de Neurociencias, UMH-CSIC) su colaboración para desarrollar estos estudios.

3.3.1.1 Estudio de la proliferación celular.

Se inyectó intraperitonealmente a los animales 5-bromo-deoxouridina (BrdU), a razón de $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La BrdU estaba disuelta a $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en NaOH 0.007N y solución salina fisiológica (0.9% NaCl). A las dos horas los animales fueron sacrificados, y se extrajeron sus globos oculares que se fijaron en fijador de Clarke, y se procesaron para inmunohistoquímica. Las muestras se incubaron con una dilución 1:500 de un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Beckton-Dickinson) durante 48 h a 4°C . La presencia de BrdU se reveló con el uso de un anticuerpo secundario biotinilado (Becton-Dickinson™, 1:200; 1 h a temperatura ambiente), y la incubación con el complejo avidina-biotina (ABC, 1:400, Amersham™).

3.3.2 Marcaje del citoesqueleto.

Para marcar el citoesqueleto de las células epiteliales de la córnea se utilizó faloidina conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (faloidina-TRITC, Sigma P1951). Ésta se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO) para dejarla en un stock a $100 \mu\text{M}$. Se prepararon alícuotas de $50 \mu\text{L}$ que se mantuvieron congeladas a -20°C y protegidas de la luz hasta su uso.

Para teñir el citoesqueleto de las células epiteliales, tras sacrificar al animal se lavó su superficie ocular con PBS, y se fijó el epitelio *in situ* manteniendo sobre la superficie ocular, entre 20 y 30 minutos, $50 \mu\text{L}$ de paraformaldehído al 4% en PBS. Tras lavarlo, se extraía quirúrgicamente la córnea y se colocaba sobre un portaobjetos, para su montaje en plano. A continuación, se lavaba durante 10 minutos en PBS y se permeabilizaba el tejido incubándolo durante 10 minutos en Tritón X-100 al 0.2%, tras lo cual se lavaba en dos ocasiones durante 20 minutos en PBS. Inmediatamente después, el tejido se incubaba con la solución de faloidina-TRITC a $1 \mu\text{M}$ durante 30 minutos, tras lo cual se lavaba durante el mismo tiempo con PBS. Cuando no hubo de realizarse ninguna tinción adicional, en este momento el tejido se post-fijó incubándolo en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, se volvió a lavar en tres ocasiones durante 10 minutos con PBS, y se montó en plano con Vectashield.

Las muestras se miraron en un microscopio confocal, con filtros de excitación a 540 nm y de emisión a 570 nm .

3.3.3 Marcaje de núcleos.

Para marcar los núcleos celulares se utilizó dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma D9542). El stock se preparó a 300 μ M en agua, y se prepararon varias alícuotas de 100 μ L en PBS, a diluciones 1:500 o 1:1000, que se mantuvieron congeladas a -20 $^{\circ}$ C y protegidas de la luz hasta el momento de su uso. Las muestras se incubaron en DAPI durante 5 minutos en oscuridad, y se lavaron en cuatro ocasiones durante 5 minutos con PBS en oscuridad. Posteriormente el tejido se fijó incubándolo en paraformaldehído al 4% durante 30 minutos, se volvió a lavar en tres ocasiones durante 10 minutos con PBS, y se montó en plano con Vectashield.

En los dobles marcajes de citoesqueleto y núcleos, la tinción de los segundos se realizó después de la tinción para el citoesqueleto previamente descrita.

Las muestras se miraron en un microscopio confocal, con filtros de excitación a 340 nm y de emisión a 480 nm.

3.3.4 Estudio de la inervación corneal.

Se sacrificó a los animales y se extrajeron sus globos oculares, que se fijaron en paraformaldehído 4% durante 45 min y se sometieron, posteriormente, a una serie de gradientes de sucrosa. Las corneas se montaron en plano y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina clase III (Tuj1, 1:200; Covance™). La presencia de esta proteína se reveló con la técnica ABC, previamente descrita. Se obtuvieron imágenes de las preparaciones histológicas con el sistema Neurolucida de Leica™ y los nervios corneales se dibujaron usando una cámara lúcida. Los análisis morfométricos se realizaron con el software ImageJ™.

3.4 Evaluación de la nocicepción corneal.¹¹

Para determinar los efectos de las distintas manipulaciones experimentales del genoma de las diferentes cepas de ratones sobre la función del sistema sensorial nociceptivo ocular, se desarrolló expresamente para el presente trabajo de investigación un test conductual para evaluar la nocicepción ocular en el ratón (Aracil, Acosta, Gallar, & Belmonte, 1999). Dicho test ha

¹¹ Deseo agradecer a la Dra. María del Carmen Acosta, así como a Dña. Carolina Luna y Dña. Susana Quirce (Instituto de Neurociencias, UMH-CSIC), su colaboración para desarrollar estos estudios.

sido utilizado para el cribado de la actividad analgésica de moléculas candidatas en fase preclínica (Planells-Cases et al., 2000).

El test de nocicepción ocular consistió en contar el número de movimientos de rascado o lavado («wipping») que el animal dirigía hacia el ojo en el que previamente se habían instilado tópicamente 2,5 μ L de una solución del agente pungente capsaicina. La capsaicina (8-Metil-N-vanillil-trans-6-nonenamida) es un alcaloide sintetizado por las plantas del género *Capsicum*, que actúa a través de su unión a un receptor de membrana, inicialmente denominado VR-1 (receptor vanilloide tipo 1) (Caterina et al., 1997). Este receptor se incluye en estos momentos dentro de la superfamilia de receptores TRP (transient receptor potential), subfamilia receptores para vanilloides y se denomina TRPV1 (Clapham, Julius, Montell, & Schultz, 2005). El receptor TRPV1 se localiza fundamentalmente en la membrana de las neuronas sensoriales nociceptivas, y su activación por la capsaicina, u otros agonistas (como las temperaturas elevadas o el pH ácido) evoca conductas aversivas en animales de experimentación, y sensación de dolor en el ser humano.

Para evaluar la sensibilidad ocular a la capsaicina se procedió del siguiente modo. Mientras un experimentador inmovilizaba al ratón y mantenía abierto el ojo del animal, otro administraba sobre su superficie la solución con una micropipeta. Inmediatamente después el animal era liberado en una caja transparente de plástico, y se contaban los movimientos de rascado realizados por el animal con la pata anterior y dirigidos al ojo en el que se había instilado la capsaicina.

3.4.1 Desarrollo del test conductual.

Para validar el test se realizaron diversos ensayos que se describen a continuación.

3.4.1.1 Determinación del rango de concentraciones de capsaicina al que es sensible el ojo del ratón.

Para determinar inicialmente el rango de concentraciones de capsaicina al que es sensible el ojo del ratón se utilizaron hembras de entre dos y tres meses de edad de ratones albinos de la cepa OF-1. En los dos ojos de cada animal se estudió la respuesta a una serie ascendente de concentraciones de capsaicina (desde 1 nM a 333 μ M), dejando entre cada dos de ellas un intervalo de, al menos, 20 min. La respuesta evocada en cada ojo se estudió en un día diferente, con un intervalo mínimo de 48 horas. El vehículo de la concentración más alta de capsaicina se probó aleatoriamente en algunos animales y no evocó en ningún caso respuestas significativas.

Del mismo modo, se intentó inicialmente medir el número de parpadeos y el tiempo que el animal pasaba con el ojo cerrado, pero debido a las dificultades de observación, se descartó usar estas variables.

Tras la administración de capsaicina a las dosis en las que el ojo del ratón es sensible, los animales cierran el ojo y comienzan inmediatamente a dirigir movimientos de rascado hacia el mismo. A lo largo del periodo de estudio, en ocasiones se lamen la pata anterior antes de volver a dirigirla al ojo, y, en ocasiones, llegan a rascarse con la pata posterior. En general los animales tienen a abandonar el centro de la caja en la que se les está estudiando, y se arrinconan en alguna de sus esquinas.

Como se muestra en la figura 8 A, la mayor parte de la respuesta conductual a la administración de capsaicina ocurre en el primer minuto tras su administración sobre la superficie ocular. Por ello, para futuros estudios se utilizó este tiempo de observación. En esta cepa de animales la respuesta conductual durante el primer minuto se pudo ajustar a una curva logística sigmoidea cuatrimétrica ($y = \min + (\max - \min) / (1 + (x/EC_{50})^{-Hill})$; r^2 ajustada = 0.830; mínimo = 2.01 ± 1.47 rascados·min⁻¹, máximo = 54.9 ± 6.6 rascados·min⁻¹; $EC_{50} = 200 \pm 100$ μM; coeficiente de Hill: 0.95 ± 0.3 ; media ± desviación estándar; figura 8 B). Del mismo modo, la respuesta normalizada sobre el 100 % en el primer minuto también ajustó bien al mismo modelo (r^2 ajustada = 0.867; mínimo = 32 ± 2.1 % y máximo = 97.1 ± 9.9 %; media ± desviación estándar; figura 8 C). La correlación de la respuesta en el primer minuto entre ambos ojos fue alta y muy significativa ($r = 0.849$, $p < 0.001$, Pearson), y durante los dos minutos, también ($r = 0.817$; $p < 0,001$; Pearson). Sin embargo, considerando los datos de ambos ojos y correlacionando la respuesta del primer y del segundo minuto, dicha correlación, aunque significativa, fue menor ($r = 0.614$; $p = 0.007$; Pearson). Todo ello se interpreta como que: a) hay animales con distinta sensibilidad ocular a la capsaicina; b) la sensibilidad es similar en ambos ojos; y c) el patrón de respuesta puede ser heterogéneo: mientras que la mayoría de los animales responde fundamentalmente durante el primer minuto, en algunos casos la respuesta se prolonga un poco más.

3.4.1.2 Efecto sobre la respuesta conductual de la administración repetida de capsaicina y de fármacos anestésicos y antiinflamatorios, tanto esteroideos como no esteroideos.

Para comprobar la consistencia de la respuesta, y el efecto de distintas sustancias sobre la misma, se realizaron dos experimentos en hembras de ratón OF-1, en los que se administró sobre la superficie ocular una gota de 2.5 μL de capsaicina 333 μM en varias ocasiones, separadas

entre sí por 20 minutos. En uno de los experimentos (figura 9), entre las administraciones segunda y tercera se administraron 2.5 μL de una de las siguientes soluciones: a) Acular® (Ketorolaco 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Allergan); b) Ocuflur® (Flurbiprofeno 0,03%, Allergan); y c) Anestésico doble Colircusí® (Oxibuprocaína, 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Tetracaína, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Como control negativo se utilizó solución salina balanceada (BSS®, Alcon). La aleatorización no fue pareada, es decir, el ojo contralateral del mismo animal no siempre recibió BSS.

En otro experimento (figura 10), diez minutos antes de aplicar la capsaicina se pretrató uno de los ojos del animal con 2.5 μL de una de las siguientes soluciones: a) Acular®; b) Ocuflur®; c) Diclofenaco-Lepori® (Diclofenaco 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Lepori); d) Maxidex® (Dexametasona 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); y e) Anestésico doble Colircusí®. En este experimento, el ojo contralateral se usó como control negativo, y recibió 2.5 μL de BSS. Estas sustancias se administraron de manera aleatorizada y enmascarada para el experimentador.

Ninguno de los fármacos antiinflamatorios (tanto esteroideos como no esteroideos) atenuaron la respuesta conductual desencadenada por la administración de la capsaicina tópica ocular, en comparación con el salino. Sin embargo, los anestésicos sí redujeron dicha respuesta. Por ello, se puede considerar que en este modelo no existe una participación inflamatoria reseñable y, que, por tanto, puede ser considerado un test de nocicepción aguda.

3.4.1.3 Efecto de bagaje genético sobre la respuesta conductual a la administración ocular tópica de capsaicina.

Para comprobar si el bagaje genético de la cepa de ratones podría tener alguna influencia sobre la respuesta conductual se realizó una curva dosis-respuesta en hembras de ratón C57BL/6 de manera similar a lo expuesto anteriormente. En la figura 11 se comparan entre sí ambas curvas dosis-respuesta. Como se puede observar allí, en el caso de las hembras de ratón de la cepa C57BL/6 la máxima respuesta tiene lugar a concentraciones en el rango micromolar, y tiende a aparecer una desensibilización de la misma en el rango milimolar. Por el contrario, en las hembras OF-1 no se produce esta desensibilización en dicho rango, sino que a estas concentraciones se alcanza la máxima respuesta. Por lo tanto, el bagaje genético de la cepa a utilizar debe tenerse en cuenta a la hora de comparar los resultados en este test, realizados usando diferentes cepas de ratones.

3.4.2 Evaluación de la respuesta conductual a la administración ocular tópica de capsaicina en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.

La respuesta conductual a la administración ocular tópica de capsaicina en ambas cepas se realizó de la manera previamente expuesta. Se realizó una curva dosis-respuesta para cada animal aplicando las concentraciones de capsaicina (1 nM hasta 33 μ M) en orden creciente y con un intervalo de 20 min. Los dos ojos de cada animal se estudiaron en días distintos, con una separación de, al menos, 48 horas. Para cada cepa de animales mutantes ($n = 6$ animales por cepa) se utilizó un grupo de WT distinto ($n = 6$ por grupo control). En cada experimento se enmascaró para el investigador la cepa que estaba siendo usada en cada momento. Se estudió la correlación interocular de la respuesta, que fue alta ($r > 0.800$, Pearson). Por ello, los datos de ambos ojos de cada animal se promediaron y el valor promedio para cada concentración se ajustó a la función previamente descrita. Se usaron dos aproximaciones: a) se ajustó cada serie de datos individual a dicha función, y de cada una de ellas se extrajeron los parámetros que la definen (mínimo, máximo, EC_{50} y coeficiente de Hill), cuyos valores promedios se compararon entre grupos; y, b) se realizó un ajuste conjunto de todas las series de datos a dicha función.

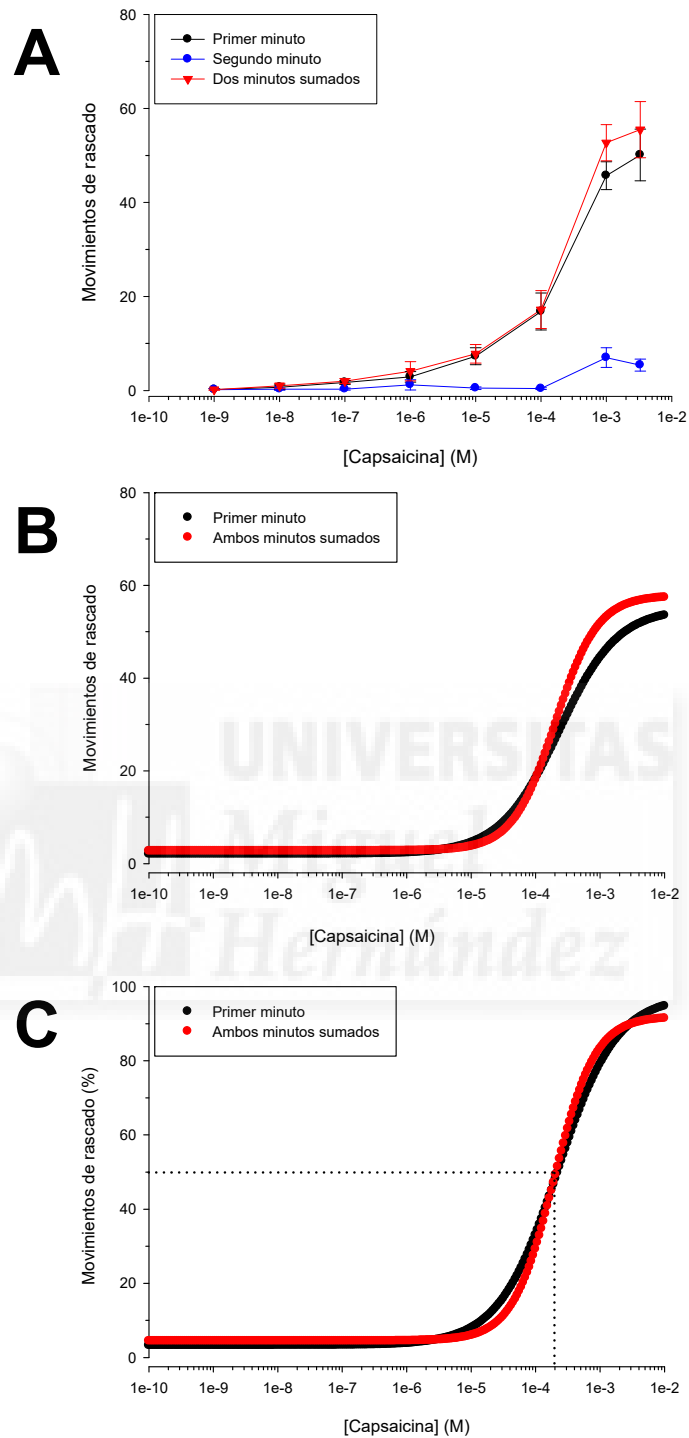


Figura 8. Respuesta conductual de hembras adultas de ratón OF-1 a la administración ocular tópica de capsaicina.

A: Número de rascados dirigidos al ojo que había recibido la solución de capsaicina ($n = 12$ ojos de 6 animales por punto; media \pm desviación estándar). Se observa que la respuesta ocurrió en el primer minuto tras la aplicación. B: suavizado de los datos tras su ajuste a la función indicada en el texto. C: suavizado de los datos normalizados respecto al máximo, ajustada a la función indicada en el texto. Las líneas punteadas representan el 50% de la respuesta máxima en el primer minuto.

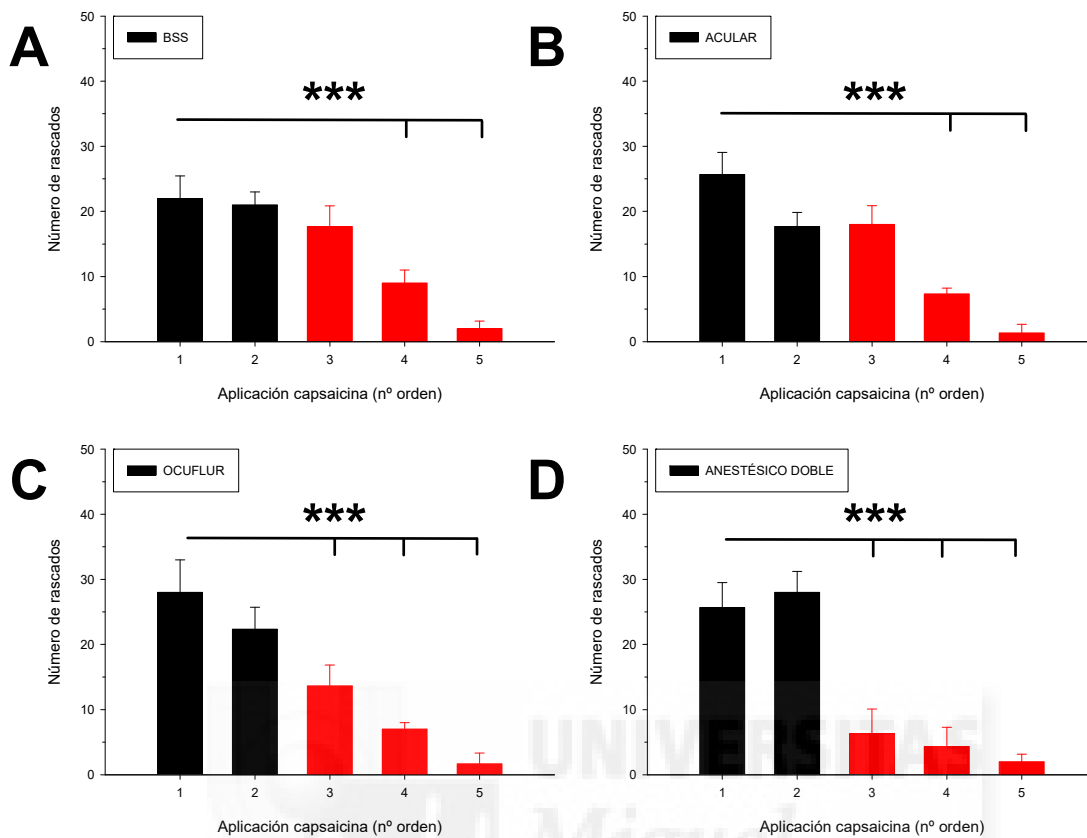


Figura 9. Efecto de la administración de dosis repetidas de capsaicina y de fármacos antiinflamatorios y anestésicos sobre los resultados del test conductual.

Entre las aplicaciones 2 y 3 de capsacina, de manera aleatorizada, enmascarada y no pareada, se instilaron 2.5 μ L de: A: solución salina balanceada (BSS, n = 3 ojos); B: Ketorolaco (Acular[®], n = 3 ojos); C: flurbiprofeno (Ocuflur[®], n = 3 ojos); y D: oxiburpocaína + tetracaína (Anestésico doble[®], n = 3 ojos). La capsacina se administró a 333 μ M, cada 20 minutos. Los rascados se contaron durante un minuto, tras lo cual se lavó la superficie ocular con 1 mL de salino. Se usaron hembras OF-1. Media \pm desviación estándar, *** $p < 0.001$, ANOVA de medidas repetidas.

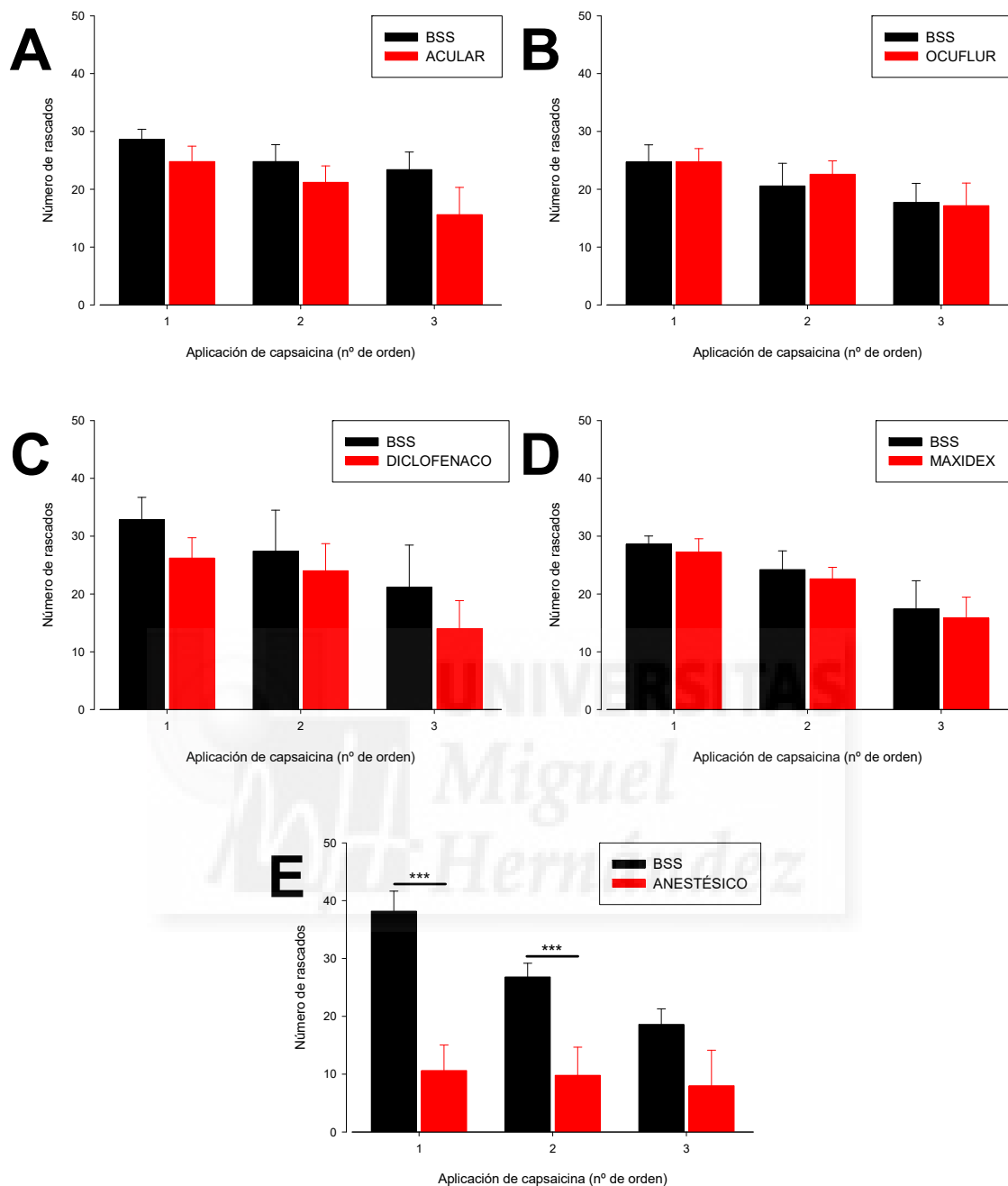


Figura 10. Efecto del pretratamiento de la superficie ocular con diferentes fármacos antiinflamatorios o anestésicos antes de la administración de capsaicina.

De manera aleatorizada y enmascarada se instilaron 2.5 μ L de las soluciones que se indican sobre la superficie de un ojo del animal, y solución salina balanceada (BSS), en el otro, que sirvió como control: A: Ketorolaco (Acular[®]); B: flurbiprofeno (Ocuflur[®]); C: Diclofenaco (Diclofenaco Lepori[®]); D: dexametasona (Maxidex[®]); y E: oxibupocaína + tetracaína (Anestésico doble[®]). Los fármacos se administraron 10 min antes de aplicar capsaicina a 333 μ M, cada 20 minutos. Los rascados se contaron durante un minuto, tras lo cual se lavó la superficie ocular con 1 mL de salino. Se usaron hembras OF-1. Media \pm desviación estándar, $n = 5$ (excepto en el caso del Ocuflur, $n = 7$). *** $p < 0.001$, ANOVA de medidas repetidas

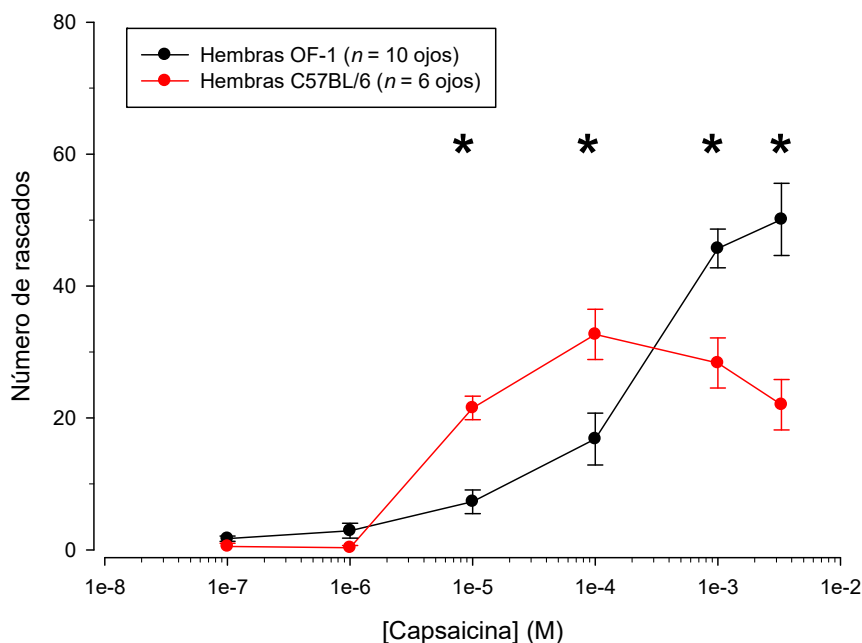


Figura 11. Respuesta a la administración tópica ocular de capsaicina en diferentes cepas de ratones.

Se observa que la sensibilidad ocular a este compuesto pungente es variable de unas cepas a otras. * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas. Los datos representan la media y el error estándar de la media de 10 ojos (OF-1) y 6 ojos (C57BL/6).

3.5 Medición de la secreción lacrimal.

Se evaluó indirectamente el volumen de lágrima producido en las diferentes cepas de animales, usando al respecto una modificación *ex profeso* del denominado «test del hilo de rojo fenol» («*phenol red thread*»). Ante la imposibilidad de acceder en su momento a la versión comercial de hilos de rojo fenol, para desarrollar este test en el presente trabajo de investigación se usaron hilos de algodón preparados expresamente en nuestro laboratorio, siguiendo el método propuesto por Kurihashi (Kurihashi, Yanagihara, & Honda, 1977). Aunque los valores medidos con ambos tipos de test, esto es, con hilos de rojo fenol comerciales respecto al de hilos preparados en el laboratorio pueden diferir, las medidas se consideran consistentes y sensibles cuando se usa siempre un mismo método (Kwong & Cho, 1998).

3.5.1 Preparación de los hilos impregnados en fluoresceína.

Se extrajeron hilos de algodón de gasa estéril comercial, se cortaron y se impregnó uno de sus extremos en una solución de fluoresceína sódica al 2%. Se dejaron secar, y se recortó

posteriormente el extremo impregnado, para dejar una zona de 1 mm impregnada de fluoresceína. Se recortaron también por el otro extremo, para intentar dejarlos de la misma longitud. La zona impregnada con fluoresceína es la que se colocaba en contacto con el saco conjuntival inferior, en la mitad nasal, de los ojos de los animales en los que se estudió la producción lacrimal.

Cada hilo se introdujo en un tubo de polipropileno de 1.5 mL, que se mantuvo cerrado, e identificado. Cada tubo, conteniendo un hilo, se pesó antes y después de usar el mismo en una balanza de precisión. A los valores obtenidos se les restó el peso del correspondiente tubo vacío. Como estimación del volumen recuperado por cada hilo se calculó la diferencia de su peso entre ambas pesadas. Los hilos así fabricados mostraron un peso inicial bastante homogéneo (1.5 ± 0.03 mg, $n = 89$).

Del mismo modo, inmediatamente tras haber humedecido el hilo y antes de proceder a introducirlo en el tubo para su segunda pesada, bajo luz azul cobalto y a través de una lupa MZ6 (Leica), con la ayuda de un micrómetro (Leica) se midió el frente de avance de la fluoresceína a lo largo del filamento, arrastrado por el fluido lacrimal absorbido por el mismo, expresándose la longitud humedecida en mm.

3.5.2 Determinación de las variables a medir y del tiempo a tener el hilo en el saco conjuntival.

Para determinar qué variables usar para medir la producción lacrimal (el incremento del peso del hilo o su longitud humedecida) y el tiempo a tener en contacto el hilo en el saco conjuntival se realizó el siguiente experimento. Se depositó sobre un portaobjetos una gota de un volumen variable de solución salina (1, 2, 5 o 10 μ L, o 1 mL) y se puso en contacto la zona impregnada de fluoresceína de un hilo con la superficie de la misma, durante un tiempo de 2, 5, 7, 10, 13, 15 o 30 segundos ($n = 5$ para cada tiempo y volumen). Como puede observarse en la tabla 1 la variable que mayor correlacionó con la longitud humedecida del hilo fue el tiempo del contacto con la gota. De hecho, aunque el incremento de peso del hilo y la longitud humedecida del mismo mostraron una correlación positiva y significativa, el incremento del peso del hilo no correlacionó con el tiempo de contacto con la gota.

Tabla 1. Correlaciones entre diferentes variables relacionadas con el método desarrollado para estimar la producción lacrimal. Se indican la *r*, *p* y *n*.

	Tiempo contacto (s)	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Delta peso (mg)	Longitud humedecida (mm)
Volumen gota (μL)	0.188	0.0964	0.00499	-0.106	0.035
	0.0855	0.38	0.964	0.333	0.751
	85	85	85	85	85
Tiempo contacto (s)		-0.162	-0.0117	0.174	0.72
		0.138	0.915	0.112	7.67E-15
		85	85	85	85
Peso inicial (mg)			0.745	-0.0649	-0.159
			3.05E-16	0.555	0.146
			85	85	85
Peso final (mg)				0.618	0.126
				3.06E-10	0.251
				85	85
Delta peso (mg)					0.375
					0.0004
					85

La regresión lineal múltiple permitió establecer que la longitud humedecida del hilo dependió significativamente del tiempo de contacto con la gota, y no tanto con el volumen inicial de la misma (Longitud = 7.911 – (0.00105·vol (μL)) + (0.583·t(s)); $r^2 = 0.529$; $p = 0.182$, volumen; <0.001 , tiempo).

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas para la longitud humedecida del hilo en función del volumen inicial de la gota dentro de cada tiempo de contacto, las correspondientes rectas de regresión (figura 12) mostraron que los volúmenes pequeños de la gota –como los que cabría esperar en la película lacrimal del ratón- sólo tendían a mostrar longitudes humedecidas del hilo diferentes entre sí para tiempos cortos, mientras que, por el contrario, cuando los tiempos de contacto eran lo suficientemente prolongados, las longitudes humedecidas del hilo tendían a ser similares, independientemente del volumen inicial de la gota. Como conclusión a todos estos ensayos preliminares, y dado que el volumen de producción lagrimal esperado en el ratón era muy bajo, se determinó usar en los ensayos un tiempo corto (7 s) de contacto del filamento con la película lacrimal para determinar la producción lacrimal.

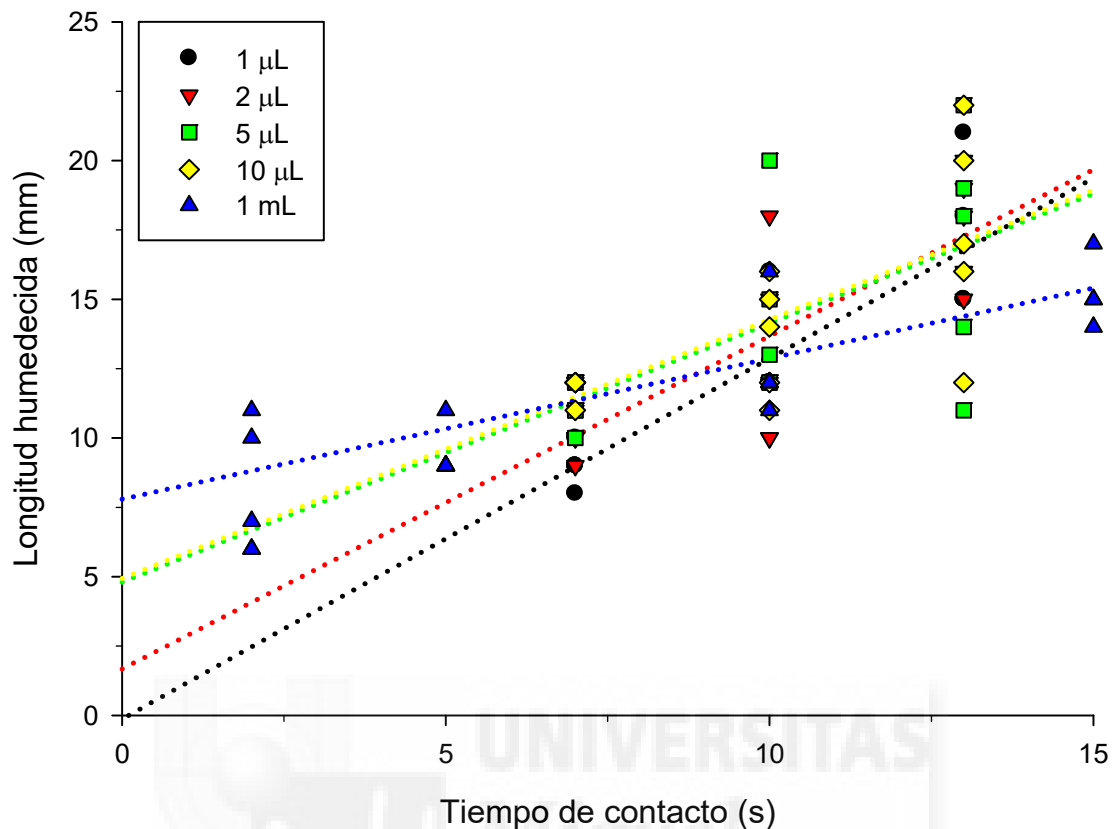


Figura 12. Relación entre el volumen inicial de la gota, el tiempo de contacto con la misma y la longitud humedecida de un filamento de algodón.

De manera análoga a lo descrito por Kurihashi en humanos adultos sanos, (Kurihashi et al., 1977), no se encontraron diferencias en los valores promedio medidos a diferentes tiempos. Sin embargo, para volúmenes pequeños de producción lacrimal, como los que presumiblemente cabría esperar en el ratón, la longitud humedecida durante tiempos cortos de contacto pareció ser más discriminante.

3.5.3 Evaluación de la producción lacrimal en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.

Se anestesió a los animales y se les colocó sobre una manta térmica retroalimentada para mantener una temperatura de 38°C. Bajo lupa (MZ6, Leica) con la ayuda de pinzas de relojero se les abrió el párpado inferior procurando no tocar el borde libre del mismo ni ninguna de las estructuras de la superficie ocular. La punta teñida con fluoresceína de un hilo se puso en contacto con el saco conjuntival inferior durante 7 s. Tras retirarla, se midió la longitud humedecida del hilo. La producción lacrimal se expresó en milímetros de hilo humedecido. Los ojos del lado izquierdo se midieron sistemáticamente en primer lugar. Para este estudio se

utilizaron 7 WT (3 hembras y 4 machos), 11 Tac1-KO (5 hembras y 6 machos) y 11 α CGRP-KO (5 hembras y 6 machos), todos ellos adultos.

En estos animales se estudió, también, la producción lacrimal en respuesta a la estimulación mecánica nociva de la córnea. Para ello, con los animales anestesiados, se tocó la superficie corneal con un filamento de nylon que deformaba la curvatura de la córnea. El filamento se mantuvo en el centro de la córnea durante 5 s. Un minuto después se midió la producción lacrimal. Los valores se compararon con los de la producción lacrimal basal. Los dos ojos de cada animal se estudiaron de manera secuencial, con una separación de, al menos, 20 minutos. El ojo izquierdo se estudió siempre en primer lugar.

3.6 Estudio de la liberación de neuropéptidos desde las terminales periféricas de las neuronas sensoriales de la córnea.

3.6.1 Modelo *in vitro* para el estudio de la liberación de neuropéptidos desde las terminales sensoriales corneales.

Para cuantificar la liberación de neuropéptidos desde las terminales periféricas de las neuronas sensoriales que inervan la córnea se siguió el siguiente protocolo. Primero se administró una sobredosis letal de anestésico al ratón y por microdissección se extirparon sus córneas. Cada córnea se colocó durante 5 min en un tubo de polipropileno que contenía 1 mL de solución salina fisiológica (BSS, de «*Balanced Salt Solution*», Alcon). A continuación, el tejido se pasó a otro tubo que contenía 1 mL de solución de capsaicina al 1% en PBS, donde se mantuvo durante otros 5 min adicionales. Inmediatamente después se volvió a pasar a otro tubo con solución salina, donde se mantuvo otros 5 min, e inmediatamente después a otro más conteniendo igualmente solución salina, durante 5 min adicionales. En las figuras correspondientes se indica cada una de estas mediciones como BASAL, EST, POST5 Y POST10, respectivamente. Inmediatamente después las córneas fueron pesadas en una balanza de precisión. La cantidad de neuropéptido liberada se expresó normalizándola en función del peso de la córnea. La figura 13 resume el protocolo experimental llevado a cabo en este apartado.

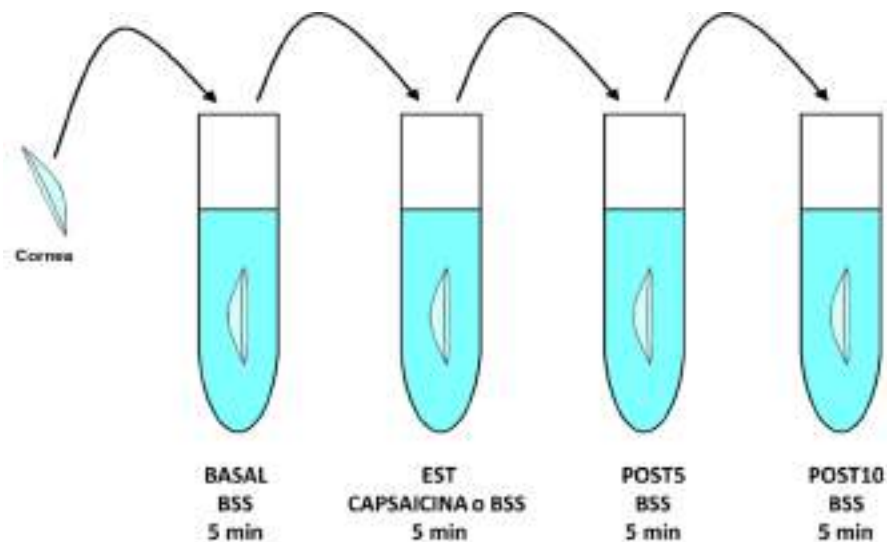


Figura 13. Representación esquemática del modelo de liberación de neuropéptidos desde las terminaciones sensoriales nociceptivas corneales en respuesta a la capsaicina.

Tras extirpar la córnea del animal, ésta se colocó en un tubo de polipropileno que contenía una solución salina durante 5 min. A continuación, se pasó a otro tubo que contenía una solución de capsaicina o su vehículo, y, sucesivamente, a otros dos tubos que contenían solución salina. En cada tubo, la córnea estuvo cinco minutos.

3.6.2 Métodos de cuantificación de neuropéptidos.

La cantidad de neuropéptidos se determinó usando los kits comerciales de enzimo-inmuno-ensayo (ELISA) que se describen a continuación.

3.6.2.1 ELISA para la NKA.

La concentración de NKA se midió usando un kit comercial de ELISA competitivo (EK-0465-15, Phoenix Phamaceuticals). Este kit tenía un límite de detección inferior de $0.46 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y superior de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un rango lineal de entre 0.46 y $6.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, y no tenía reactividad cruzada para la SP. La microplaca tenía unido un anticuerpo secundario que reconocía el fragmento Fc de un anticuerpo primario frente a la NKA. La solución problema se incubaba junto con el anticuerpo primario y NKA biotinilada, de modo que el péptido que pudiese haber en la solución problema y el biotinilado competían por los sitios Fab del anticuerpo primario. Posteriormente se incubaba la placa con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP), H_2O_2 y tetrametilbenzidina lo que coloreaba la solución de azul. Al añadir HCl a la solución, se detenía la reacción enzimática y el color de la solución viraba a amarillo, cuya intensidad se midió en un lector de microplacas Anthos-Rosys a 414 nm . La intensidad de color era directamente

proporcional a la cantidad de NKA biotinilada fijada al anticuerpo primario, e inversamente proporcional a la de NKA libre en la solución problema.

La liberación de NKA se estudió en hembras WT y Tac1-KO (n = 5 en cada grupo).

3.6.2.2 ELISA para el α CGRP.

La concentración de α CGRP se determinó usando un kit de ELISA frente al α CGRP humano (A05481, SPI BIO). Los anticuerpos de este kit presentan una reactividad cruzada del 100% entre las dos isoformas de CGRP humano y de rata, mientras que no la presentan con la calcitonina, la amilina, la sustancia P, o el antagonista del α CGRP, CGRP₈₋₃₇. Aunque los fabricantes no indicaban la reactividad con el α CGRP de ratón, dado que se ha comprobado que las secuencias del α CGRP de ratón y de la rata son idénticas (Thomas, Nasonkin, Zhang, Gagel, & Cote, 2001), se utilizó este mismo kit con las muestras obtenidas de ratón.

Este kit tenía un límite de detección de 2 pg·mL⁻¹ y un límite de cuantificación de 1000 pg·mL⁻¹, y consistía en una microplaca de 96 pocillos que tenían fijado un anticuerpo monoclonal contra un primer epítipo del péptido. Tras el procesado de la microplaca conforme a las instrucciones del fabricante, la solución en la que se quería determinar la concentración de α CGRP se colocaba en el pocillo y se dejaba incubar junto a otra solución que contenía un segundo anticuerpo conjugado con acetilcolinesterasa (AChE) dirigido contra un segundo epítipo del péptido. Este período de incubación permitía la inmovilización del α CGRP por unión a ambos anticuerpos. Tras ello, se lavaba el resto de la solución, y se aplicaba al pocillo una solución de reactivo de Ellman. El producto de la reacción, de color amarillo, se leyó en un lector de microplacas Anthos-Rosys, filtrando la señal emitida a 414 nm. La intensidad de color se comparó frente a la de la curva patrón de cada microplaca, para extrapolar la concentración de α CGRP en la solución correspondiente.

La liberación de α CGRP se midió en 6 animales WT y 6 animales α CGRP-KO (3 animales de cada sexo por cepa).

3.7 Modelo *in vitro* de cicatrización del epitelio corneal.¹²

3.7.1 Línea de células epiteliales corneales humanas inmortalizadas (HCEC).¹³

Para los estudios *in vitro* desarrollados en el presente trabajo de investigación se utilizó una línea de células epiteliales corneales humanas inmortalizadas (K Araki-Sasaki et al., 1995). El cultivo primario se obtuvo de una mujer de 49 años, a la que se le extrajeron *post mortem* sendos botones corneales, que no contenían el limbo esclero-corneal. A los botones se les eliminó quirúrgicamente el endotelio y se cultivaron, evitando la proliferación de fibroblastos. Posteriormente, las células epiteliales se infectaron con un vector adenoviral recombinante (SV40) y se cultivaron para su expansión. Las células así expandidas mostraron características estructurales (microvilli) y bioquímicas (expresión de queratinas AE1 y AE5, desmosomas, aldehído deshidrogenasa, etc.), propias de las células epiteliales corneales humanas diferenciadas. Al exponerlas a una interfase aire-líquido, estas células formaron estructuras poliestratificadas. Por todo ello, los autores consideraron que estas células mantenían las características propias de las células epiteliales corneales humanas diferenciadas.

El efecto de la sustancia P ha sido estudiado en esta misma línea celular con antelación (Kaoru Araki-Sasaki et al., 2000). Estas células expresan el ARNm de los receptores NK1, NK2 y NK3 y también, de modo constitutivo, la proteína de adhesión celular E-cadherina. La exposición de estas células a un rango de concentraciones de entre 10^{-9} y 10^{-6} M de sustancia P incrementó la expresión de la proteína E-cadherina de modo dosis-dependiente. Sin embargo, la incubación de estas células con medio suplementado con sustancia P a concentraciones de 10^{-8} y 10^{-6} M no incrementó la proliferación celular respecto al medio convencional. La E-cadherina es una proteína de adhesión celular que parece involucrada en la reorganización del epitelio tras su lesión (Danjo & Gipson, 1998) permitiendo que se acople

¹² Deseo agradecer a la Dra. Ana Sánchez García (Instituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid), su colaboración para poner en marcha este modelo experimental en nuestro grupo.

¹³ Deseo agradecer a las Dras. Margarita Calonge y Yolanda Diebold (Instituto de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid), la cesión de estas células.

el citoesqueleto de actina de las células epiteliales del borde de lesiones circulares, lo que puede contribuir a la migración de epitelio y favorecer su cicatrización.

Del mismo modo, estas células se han co-cultivado con células PC12 expuestas a NGF para su diferenciación a neuronas y con células del trigémino de rata en cultivo primario, y se han cultivado expuestas a sustancia P o CGRP (ambos a 10^{-6} M) (Ko et al., 2014). Todas estas condiciones estimularon la poliestratificación de estas células, pero en este caso estimularon la expresión de N-cadherina, y no la de E-cadherina. Mientras que la E-cadherina se expresa en las capas más superficiales del epitelio, la N-cadherina parece expresarse en células madre del nicho limbal y se considera que las mantiene en estado indiferenciado, evitando la proliferación de las mismas (Hayashi et al., 2007). Por lo tanto, la SP parece ejercer un papel sobre la diferenciación de estas células, más que sobre la proliferación o la migración de las mismas.

3.7.2 Estandarización de las desepitelizaciones *in vitro*.

Para estandarizar la realización de las desepitelizaciones *in vitro* se procedió del siguiente modo. En primer lugar, se cultivaron las HCEC en placas de 24 pocillos (NUNCLON) hasta lograr su confluencia en el centro del pocillo en medio DMEM:F12 suplementado con suero bovino fetal (FBS, 7.5%, FBS), epitelial growth factor (EGF, $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), insulina ($0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), dimetilsulfóxido (DMSO, 1 %) y penicilina-estreptomicina ($100 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las células se plantaron a una densidad inicial estimada de $80000 - 100000 \text{ céls}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se incubaron en una atmósfera de 5% CO_2 , 95% de humedad, y a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. El medio se cambiaba cada 2-3 días. Todos los medios de cultivo se adquirieron a GIBCO.

Una vez lograda la confluencia se dejaba a las células 24 horas en cultivo sin FBS y sin EGF, y transcurrido dicho tiempo se realizaban las desepitelizaciones en la monocapa. Para remedar la forma circular de las desepitelizaciones realizadas *in vivo* (véase más adelante), se diseñó un cilindro de metacrilato, que encajaba en el pocillo y cuyo centro se labró en forma cónica, para permitir el paso de una punta de pipeta amarilla hasta que esta tocara el fondo del pocillo. La pipeta se introducía con el émbolo presionado hasta tocar el fondo del pocillo, momento en el cual se aspiraba suavemente. Con ello se arrastraban las células que hubieran quedado dentro de la punta de la pipeta, quedando intacta el resto de la monocapa (figura 14).

A partir de ese momento cada pocillo podía ser cultivado de una de las siguientes condiciones: a) en el medio antes descrito, con FBS pero sin EGF (controles positivos); b) en

el medio antes descrito, sin FBS ni EGF (controles negativos); y c) en medio sin FBS ni EGF, pero o en co-cultivo con células del trigémino (véase más adelante) o con diferentes concentraciones de α CGRP. Estos pocillos se consideraban los experimentales.

Se fotografió cada pocillo cada 12 horas con un microscopio Zeiss Axiophot. El área de la zona desepitelizada en cada fotografía se midió con el software Image J[®]. Se realizaron tres medidas de cada lesión, y para la estimación de la cinética de la cicatrización (véase más adelante) se usó el valor promedio de las tres mediciones.



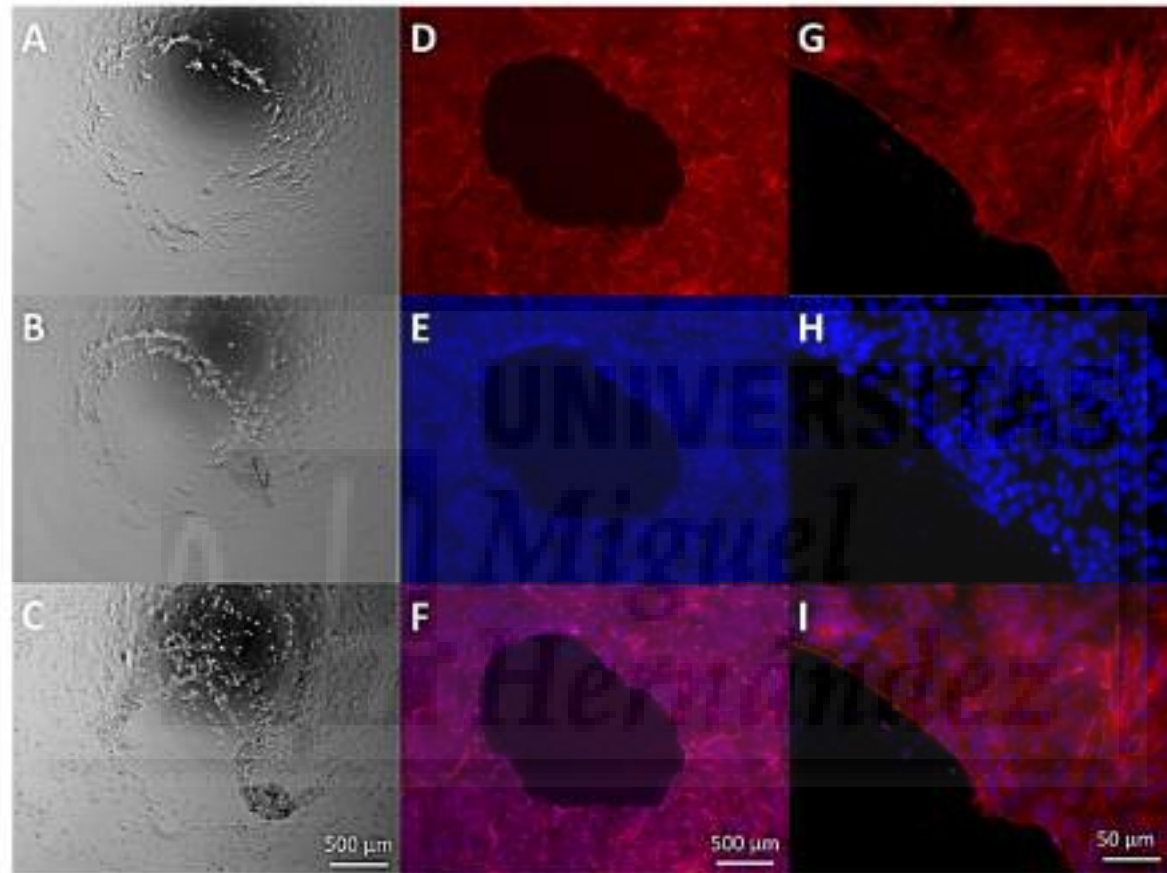


Figura 14. Modelo de desepitelizaciones en monocapas de HCEC.

La aplicación de una punta de pipeta en el centro del pocillo, a través de una guía de metacrilato, consiguió generar desepitelizaciones en la monocapa de HCEC, que pudieron seguirse a lo largo del tiempo. A-C: imagen del mismo pocillo inmediatamente tras realizar la desepitelización (A), así como a las 24 y 48 horas (B y C, respectivamente). Este pocillo se cultivó en ausencia de FBS, por lo que no se modificó el área de la lesión. D-I: imagen del mismo pocillo tras 96 horas en cultivo sin FBS. D y E: tinción del citoesqueleto con faloidina-TRITC; E y H: tinción de los núcleos con DAPI; F e I: superposición de ambas tinciones. Como se puede observar, en estas condiciones de cultivo no se produjo las HCE no cubrieron el defecto causado experimentalmente en la monocapa.

3.7.3 Modelo de co-cultivo de HCEC y células disociadas del ganglio trigémino.

Para obtener un cultivo primario de células del trigémino se sacrificó a los animales por dislocación cervical e inmediatamente a continuación se abrió la cavidad craneal y se retiró la masa encefálica, dejando al descubierto ambos ganglios trigéminos, que se disecaron microscópicamente. Los dos ganglios trigéminos se colocaron juntos y se sometieron a digestión enzimática (colagenasa XI, $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y dispasa, $9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en solución INCMix durante una hora a 37°C en atmósfera de 5% CO_2 y 95% humedad) (Baker & Bostock, 1997). Inmediatamente después se aplicó una disociación mecánica suave mediante agitación manual, y la solución se diluyó hasta un volumen final de 5 mL añadiéndole un medio completo de cultivo para neuronas (MEM-COMP: MEM con Earles's BSS suplementado con MEM-vit 1% y penicilina/estreptomicina 1 %). A continuación, la suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 700 g. El pellet se resuspendió en 400 μL de MEM-COMP suplementado con FBS 10 %, y NGF $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todos los medios de cultivo se adquirieron a GIBCO.

Finalmente, 150 μL de la suspensión de células del trigémino se depositaron en «*inserts*» cuya base era una membrana porosa (Transwell, 0.4 – 3 μm de diámetro de poro; Costar). Por tanto, en cada experimento el co-cultivo se realizó en duplicado. El fondo de estos inserts quedaba sumergido en 600 μL del medio de cultivo de las células epiteliales como se muestra en la figura 15. Se realizaron dos experimentos independientes, para los cuales los trigéminos se extrajeron de machos adultos: 2 WT (7 y 12 meses de edad); 2 Tac1-KO (7 meses de edad), y 2 $\alpha\text{CGRP-KO}$ (4 meses de edad).

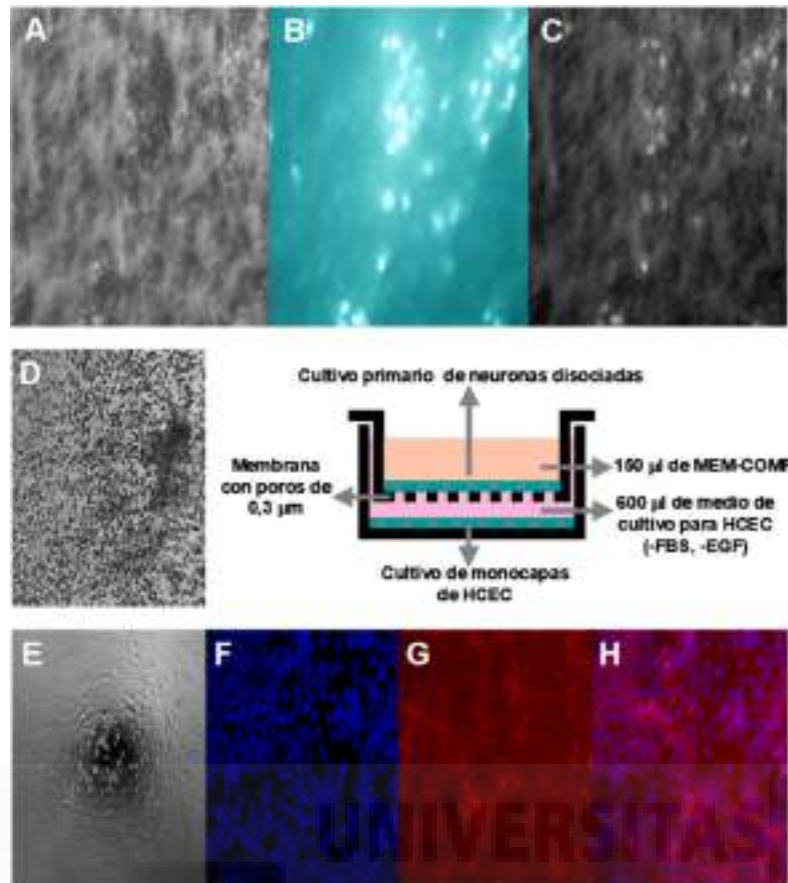


Figura 15. Modelo de co-cultivo de HCEC con células del trigémino.

Se plantaron células del trigémino de ratones adultos en membranas porosas de poliéster (A-D) que quedaban sumergidas en el medio de cultivo de las HCEC. **A:** Aspecto microscópico de las células de trigémino sobre la membrana. **B:** Tinción con DAPI de núcleos celulares en la parte superior de la membrana. **C:** Imágenes A y B superpuestas. **D:** Aspecto microscópico de la membrana con los poros. **E:** Aspecto microscópico de la monocapa de las HCEC cultivadas. **F:** Tinción con DAPI del núcleo de la monocapa de HCEC. **G:** Tinción del citoesqueleto de actina de las HCEC con faloidina-TRITC. **H:** imágenes F y G superpuestas.

3.7.4 Efecto del α CGRP sobre la cicatrización epitelial *in vitro*.

En el modelo de desepitelizaciones *in vitro* antes descrito se probó el efecto sobre la cicatrización de la adición directa de α CGRP al medio de cultivo. Se prepararon monocapas de HCEC y se realizaron desepitelizaciones circulares en las mismas, conforme se ha descrito. Veinticuatro horas antes de realizar las desepitelizaciones, se retiró el suero del medio de cultivo. Tras realizar las lesiones, las células se incubaron en: a) medio con suero (controles positivos); b) medio sin suero ni α CGRP (controles negativos); y c) medio sin suero, pero en presencia de α CGRP humano (SPIBIO) a 10^{-18} , 10^{-15} , 10^{-12} o 10^{-10} M. El medio se cambió cada 12 horas a partir de ese momento, coincidiendo con el momento en el que se tomaban las fotografías.

3.8 Estudio de la cicatrización de lesiones epiteliales corneales *in vivo*.

Antes de realizar las lesiones epiteliales experimentales como se describe más adelante, se exploró la superficie corneal de los ratones, para excluir que tuviese alguna alteración basal. Para ello, con los animales anestesiados, se les instilaron 2.5 μ L de fluoresceína al 2% sobre la superficie corneal, e, inmediatamente a continuación, se lavó la misma con 1.5 mL de solución salina. Los restos de la misma se secaron con una torunda de algodón desde el canto nasal y acto seguido se exploró a los animales bajo lupa (Leica, MZ6).

Las escasas córneas que presentaron un punteado epitelial se distribuyeron aleatoriamente entre las distintas cepas, incluyendo los WT. Debido a que este tipo de lesiones pueden ser debidas a la consanguinidad de los animales (R. Smith, 2000), no se pudieron atribuir a la manipulación genética de las cepas mutantes. De todos modos, los animales que las presentaban se excluyeron de los estudios.

Las lesiones del epitelio corneal se realizaron aplicando durante 30 s en el centro de la córnea un círculo de papel Whatmann del número 1, de 2 mm de diámetro, previamente impregnado en n-heptanol (Cintron, Hassinger, Kublin, & Friend, 1979). El círculo de papel se sumergía brevemente en el heptanol, y se depositaba sobre papel secante durante 10 s, para eliminar el exceso del mismo. A continuación, con la ayuda de unas pinzas de relojero y bajo lupa, se aplicaba en el centro de la córnea, manteniéndolo sujeto con las pinzas durante todo el tiempo que estaba en contacto con la misma. Tras retirarlo, se procedía a lavar la superficie ocular con 1.5 mL de salino, cuyo exceso se retiraba con una torunda de algodón, se instilaban 2.5 μ L de

fluoresceína y se volvía a lavar la superficie corneal. La lesión así teñida se observaba bajo lupa y se fotografiaba con una cámara acoplada a la misma. En algunos experimentos en los que no se pudo disponer de la cámara, con la ayuda de un micrómetro (Leica) la lesión se medía manualmente bajo lupa, y su forma se dibujaba en un papel. Posteriormente se estimaba el área de la misma con la fórmula del círculo o del óvalo, según fuese su forma. Para el análisis del área de las lesiones que pudieron fotografiarse se usó el software ImageJ®. En este caso, el área teñida por la fluoresceína se midió tres veces y para el estudio de la cinética de la cicatrización (véase más adelante) se usó el valor promedio de las tres mediciones.

Como muestra la figura 16, en la zona de la superficie corneal teñida con fluoresceína no se pudo observar tinción con DAPI ni con faloidina-TRITC, lo que se interpretó como que se había conseguido eliminar el epitelio de dicha zona. Este mismo modelo de lesión no parece estimular la expresión del proto-oncogén *c-jun* en las neuronas del trigémino con campo receptor corneal del ratón (De Felipe & Belmonte, 1999), a diferencia de lo que causan otros modelos de lesión más profunda. En la rata, las lesiones del epitelio corneal con n-heptanol causan una hiperalgesia unilateral a las 24 horas tras la lesión (medida con la aplicación ocular tópica de mentol), que se recupera a la semana tras la misma (Hegarty, Hermes, Morgan, & Aicher, 2018), mientras que la secreción lacrimal no se ve alterada a las 24 horas de la lesión, pero sí está reducida una semana tras la misma. Estos mismos autores han comprobado, también, que en este modelo lesional el plexo subbasal de la zona desepitelizada desaparece tras la lesión, sigue ausente a las 24 h de la misma, y está parcialmente recuperado a la semana. A este último tiempo, aproximadamente un 25% de las fibras del plexo subbasal en regeneración expresan CGRP, lo que representa un porcentaje significativamente mayor que la expresión en los ojos contralaterales o en ojos no lesionados. En dicho modelo, la expresión de CGRP en el trigémino siguió el patrón temporal inverso, es decir, se elevó a las 24 h tras la lesión y volvió a niveles normales a la semana de esta.

3.8.1 Cicatrización epitelial de la córnea en ratones Tac1-KO, NK1-KO y α CGRP-KO.

Las lesiones se realizaron unilateralmente en los ojos izquierdos de ratones de las cepas Tac1-KO y α CGRP-KO, y en sus correspondientes WT, mientras que en los experimentos en los que se usaron ratones NK1-KO las lesiones se realizaron bilateralmente. Debido a la separación temporal entre los distintos experimentos y al método de medida de las lesiones usado en cada uno de ellos, se usaron dos grupos de WT control: uno con los NK1-KO y otro que fue común para

los Tac1-KO y los α CGRP-KO. En todo caso, la cepa del animal fue enmascarada para el investigador en los distintos estudios.



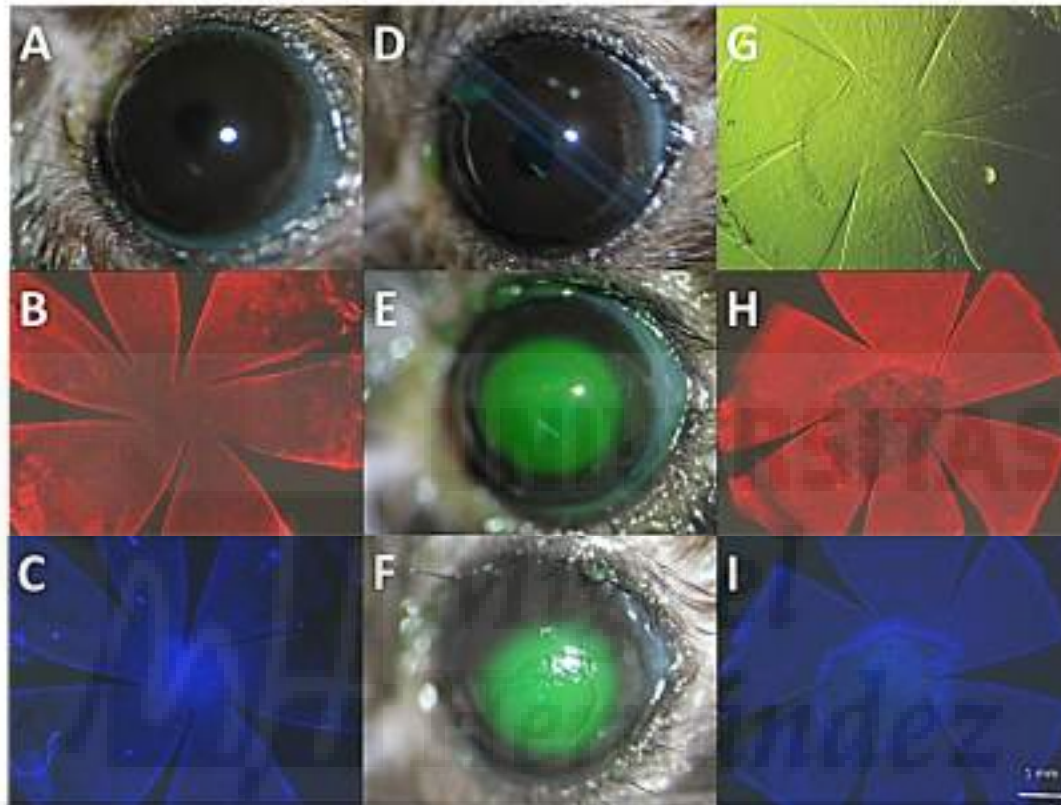


Figura 16. Modelo de desepitelizaciones *in vivo*.

A-C: imágenes de una misma córnea WT, sin haber realizado ninguna manipulación previa. A: la córnea de este animal era transparente y no presentaba tinción con fluoresceína. B: tinción con faloidina-TRITC de la misma córnea montada en plano. C: ídem, pero con DAPI. D-I: imágenes de otra córnea WT antes y después de lesionarla experimentalmente. D: de modo similar al otro caso, la córnea era transparente y no mostró ningún grado de tinción antes de realizar ninguna manipulación experimental en la misma. E: imagen de la lesión inmediatamente tras su realización. F: imagen de la lesión tras dejarla curar durante 16 h, momento en el que el animal fue sacrificado. Se puede observar que la fluoresceína tiende a difundir a lo largo de una zona mayor que el aparente relieve lesional. G: Imagen de la córnea anterior mediante luz polarizada, en la que se puede apreciar el relieve del borde lesional. H: Tinción con faloidina-TRITC de la misma córnea, en la que se puede apreciar un aumento de expresión de actina en las células del borde de la lesión. I: tinción con DAPI de la misma córnea, en la que puede apreciarse el aumento del número de núcleos en el borde de la lesión.

3.8.2 Efecto del α CGRP sobre la cicatrización epitelial de la córnea en ratones α CGRP-KO.

En un grupo de animales α CGRP-KO se probó el efecto de la administración ocular tópica de α CGRP durante la cicatrización epitelial corneal *in vivo*. Para ello, se realizaron desepitelizaciones en ambas córneas e inmediatamente tras la lesión, y cada tres horas se administró una gota de 5 μ L de solución salina (BSS, Alcon[®]) en un ojo, que se consideró control, y el mismo volumen de α CGRP (SPI-BIO) disuelto en BSS a una concentración de 500 pg·mL ($1.3 \cdot 10^{-10}$ M) en el otro, que se consideró experimental. La administración de las gotas no se interrumpió en la fase nocturna. Tanto la cepa del animal como la solución que estaba recibiendo en cada ojo se aleatorizaron por personas ajenas al experimento, y se enmascararon para el investigador.

Las lesiones se midieron bajo lupa cada 12 horas como se ha expuesto anteriormente. A esos mismos tiempos un único observador midió también el grado de opacidad de la córnea en una escala subjetiva, donde 0 representaba una córnea totalmente transparente, que permitía ver el iris y la pupila nítidamente, y 3 representaba una córnea totalmente opaca, con imposibilidad de ver el iris ni la pupila. La opacidad se expresó en incrementos de 0.5.

3.8.3 Medición de la cinética de la cicatrización epitelial.

Independientemente del método de medición del área de las lesiones epiteliales, los valores del área de la lesión a lo largo del tiempo se normalizaron respecto al área inicial, tras comprobar que no había diferencias estadísticas en la misma entre los grupos a comparar.

Se realizaron dos tipos de análisis de la cinética de la cicatrización, tanto *in vitro* como *in vivo*. Para describir la cinética de la variación del área de las lesiones a lo largo del tiempo se ajustó la misma a un modelo logístico cuatrimétrico proporcionado por el software Sigmaplot 11.0[®]. Se realizaron dos aproximaciones: a) se ajustaron las series de datos individuales a esta función, y se obtuvieron los parámetros que la definen (mínimo, máximo, T_{50} y coeficiente de Hill), que se compararon entre grupos; y, b), se ajustaron colectivamente los datos de cada grupo de animales, con la finalidad de definir el comportamiento del cambio del área en el grupo. Por otra parte, con la finalidad de estimar la velocidad máxima de reducción del área (v_{max}) y el tiempo al que esta se alcanzaba (t_{max}), se restó el valor del área de la lesión entre dos mediciones consecutivas, y se dividió por el tiempo transcurrido entre ambas, con la finalidad de obtener la velocidad media de

cicatrización en dicho periodo de tiempo. Dependiendo de los datos, esto se ajustaron a una función gaussiana o a una función Weibull con el software Sigmaplot 11.0®. De modo similar a lo ya descrito, se realizaron tanto ajustes de series de datos individuales (de los que se obtuvieron la v_{\max} y el t_{\max}), como ajustes colectivos. La bondad del ajuste se analizó mediante la r^2 ajustada. Por último, se calculó la velocidad de reducción del área durante la fase lineal (pendiente de la función lineal de la cicatrización entre las 12 y las 24 h), y el tiempo estimado de cicatrización (proyección hasta valores de área iguales a cero, de dicha función lineal)(Gallar et al., 1990).

3.9 Métodos estadísticos.

Para establecer la asociación entre variables se usó el análisis de correlación de Pearson. Para la comparación de medias de variables continuas se usó el test de la t de Student o el análisis de la varianza unifactorial (ANOVA). La respuesta conductual a la aplicación tópica ocular de capsaicina y la cinética de la cicatrización corneal se compararon con un análisis de la varianza bifactorial de medidas repetidas, con una comparación múltiple de Hom-Sidak. Cuando los datos no se ajustaban a una distribución normal, se usaron las oportunas variantes no paramétricas de estos test, que se indican oportunamente a lo largo del texto o de los pies de figura. Para la detección de *outliers* se utilizó el método de Chauvenet. Salvo que se indique otra cosa, los datos se presentan como media \pm error estándar de la media. Se consideró que las diferencias fueron significativas cuando $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

MH Miguel Hernández



4.1 Fenotipo ocular en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.

Los ojos de ambas cepas de ratones modificados genéticamente fueron comparables entre sí y a los de los ratones WT, tanto macroscópica como microscópicamente (figura 17). Todas las estructuras del globo ocular pudieron identificarse y no se observaron alteraciones fenotípicas que pudieran sugerir un efecto de los neuropéptidos sobre el desarrollo del ojo en el ratón.

En las tres cepas la córnea presentaba su estructura típica en tres capas (endotelio, estroma y epitelio). El epitelio pareció tener un número de capas celulares similar en las tres cepas y en la capa basal del mismo se pudo identificar células BrdU(+) (figura 17). La tinción con fluoresceína de la superficie ocular previa a la realización de cualquier procedimiento experimental mostró, en ocasiones, un punteado epitelial difuso. Los casos en los que se observó este fenómeno se distribuyeron entre las tres cepas, incluyendo los animales WT, por lo que este fenómeno no parece deberse a la ablación de la expresión de los neuropéptidos. En un WT se observó una anoftalmia unilateral, por lo que este animal fue excluido de los estudios.

En las tres cepas los puntos de penetración de los nervios corneales en el epitelio se distribuyeron por la córnea periférica, respetando un área central (figura 18), de acuerdo a lo previamente descrito (He & Bazan, 2016). El único hallazgo reseñable fue respecto a la densidad de número de puntos de penetración de fibras nerviosas en el epitelio, que tendió a ser menor en los ojos de los animales α CGRP-KO (WT: 95.5 ± 26.6 puntos por cuadrante, $n = 2$; Tac1-KO: 78.7 ± 5.8 puntos por cuadrante, $n = 3$; α CGRP-KO: 50.75 ± 0.1 , puntos por cuadrante, $n = 4$; $p = 0.061$, ANOVA; figura 18).

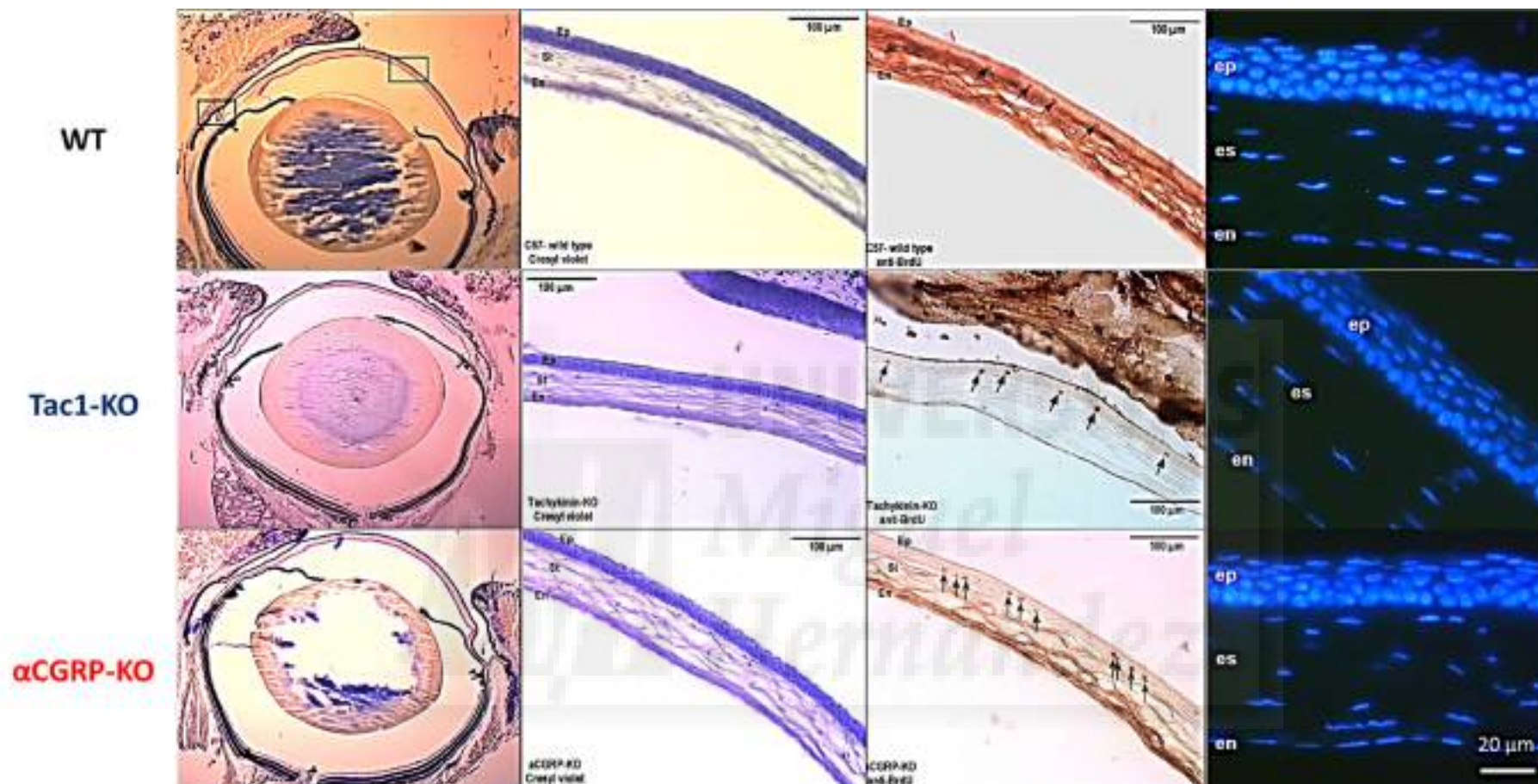


Figura 17. Comparación del aspecto histológico de la córnea de las cepas utilizadas.

El desarrollo ocular de los Tac1-KO y α CGRP-KO fue similar entre sí y al de los WT. La histología general (primera columna) mostró que todas las estructuras oculares estaban desarrolladas. La córnea (segunda columna) pareció tener un desarrollo también similar entre las tres cepas. En la córnea de las tres cepas (tercera columna) pudieron identificarse células BrdU(+), localizadas en la capa basal de epitelio (flechas). La tinción con DAPI (cuarta columna), mostró una distribución comparable de núcleos en las distintas capas corneales, así como dentro del epitelio en las tres cepas. Ep: epitelio; St o Es: estroma; En: endotelio.

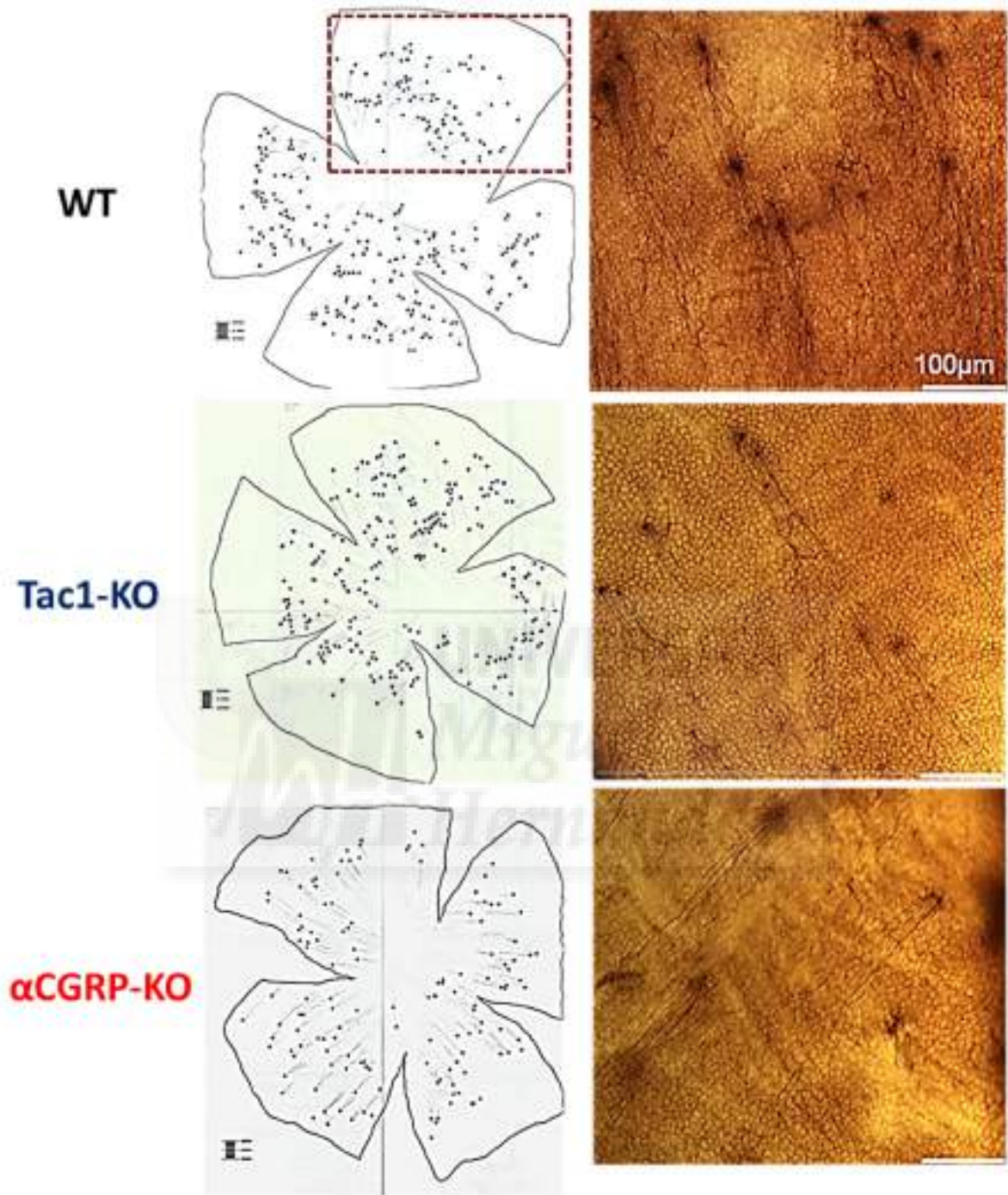


Figura 18. Inervación de la córnea de las cepas utilizadas.

La distribución espacial de los puntos de penetración de los nervios corneales en el epitelio corneal fue similar en las tres cepas, y coincidió con lo descrito en la literatura (He & Bazan, 2016). Sin embargo, su densidad por cuadrante tendió a ser menos en las córneas de los animales α CGRP-KO, que en las restantes dos cepas (columna izquierda). Desde cada uno de los puntos de entrada las fibras nerviosas se distribuyeron en «*leashes*» de un modo similar en las tres cepas (columna derecha).

4.2 Respuestas conductuales a la administración ocular tópica de capsaicina.

4.2.1 Respuestas en la cepa Tac1-KO.

Tanto los ratones Tac1-KO como sus correspondientes controles respondieron a la administración ocular tópica de capsaicina incrementando la frecuencia de movimientos de rascado dirigidos al ojo a medida que aumentaba la concentración de aquella. Dentro de cada cepa, la respuesta en ambos ojos mostró una alta correlación (WT: $y = 13.7 \cdot x + 1$, $r = 0.795$; Tac1-KO: $y = 10.4 \cdot x + 1$, $r = 0.840$; $p < 0.001$, Pearson; figura 19, A). Del mismo modo, al segregar los animales estudiados en función de su sexo, la correlación interocular fue similar en ambos sexos de cada cepa (figura 19, B y C).

La curva dosis-respuesta ajustó al modelo propuesto con $r^2 = 0.788$ (WT) y $r^2 = 0.867$ (Tac1-KO), con los siguientes parámetros: WT: mínimo = 2.3 ± 2.4 rascados·min⁻¹, máximo = 41.9 ± 2.2 rascados·min⁻¹, EC₅₀ = 21.7 ± 5 μM y coeficiente de Hill = 1.5 ± 0.5 ; Tac1-KO: mínimo = 0.74 ± 2.1 rascados·min⁻¹, máximo = 45.95 ± 1.7 rascados·min⁻¹, EC₅₀ = 16.9 ± 3 μM y coeficiente de Hill = 2.2 ± 0.5 (figura 20, E). Exceptuando el valor mínimo estimado de la función para los Tac1-KO, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos parámetros entre ambas cepas (tabla 2). La comparación de las correspondientes funciones estimadas por cepas y sexos se muestra en la figura 21.

Tabla 2: Comparación de los parámetros de las funciones de ajuste de la respuesta conductual a la aplicación ocular tópica de capsaicina en los animales Tac1-KO, y sus correspondientes controles.

	WT			Tac1-KO		
	Global (n = 6)	Machos (n = 3)	Hembras (n = 3)	Global (n = 6)	Machos (n = 3)	Hembras (n = 3)
Min (rascados·min ⁻¹)	3.4 ± 0.7	3.4 ± 0.9	3.4 ± 1.5	1 ± 0.4*	1.6 ± 0.6	0.5 ± 0.4
Max (rascados·min ⁻¹)	42 ± 4.5	36.6 ± 8.5	47.2 ± 2.2	46.6 ± 2.1	48.7 ± 1.3	44.5 ± 3.9
EC₅₀ (μM)	25.8 ± 5	20.9 ± 7.2	30.8 ± 6.1	18.3 ± 3	23.1 ± 3.9	13.5 ± 2.6
Hill	7.4 ± 3.3	13.5 ± 5.6	2.4 ± 0.9	4.3 ± 1.8	2.5 ± 0.2	5.7 ± 3.3

Min: mínimo número de rascados en un minuto estimado por la función de ajuste; Max: máximo número de rascados en un minuto estimado por la función de ajuste; EC₅₀: concentración efectiva 50, estimada por la función de ajuste; Hill: coeficiente de Hill estimado por la función de ajuste. Los datos globales se compararon entre cepas con la t de Student (* $p < 0.05$). Los datos por sexo y cepa se compararon con un ANOVA bifactorial.



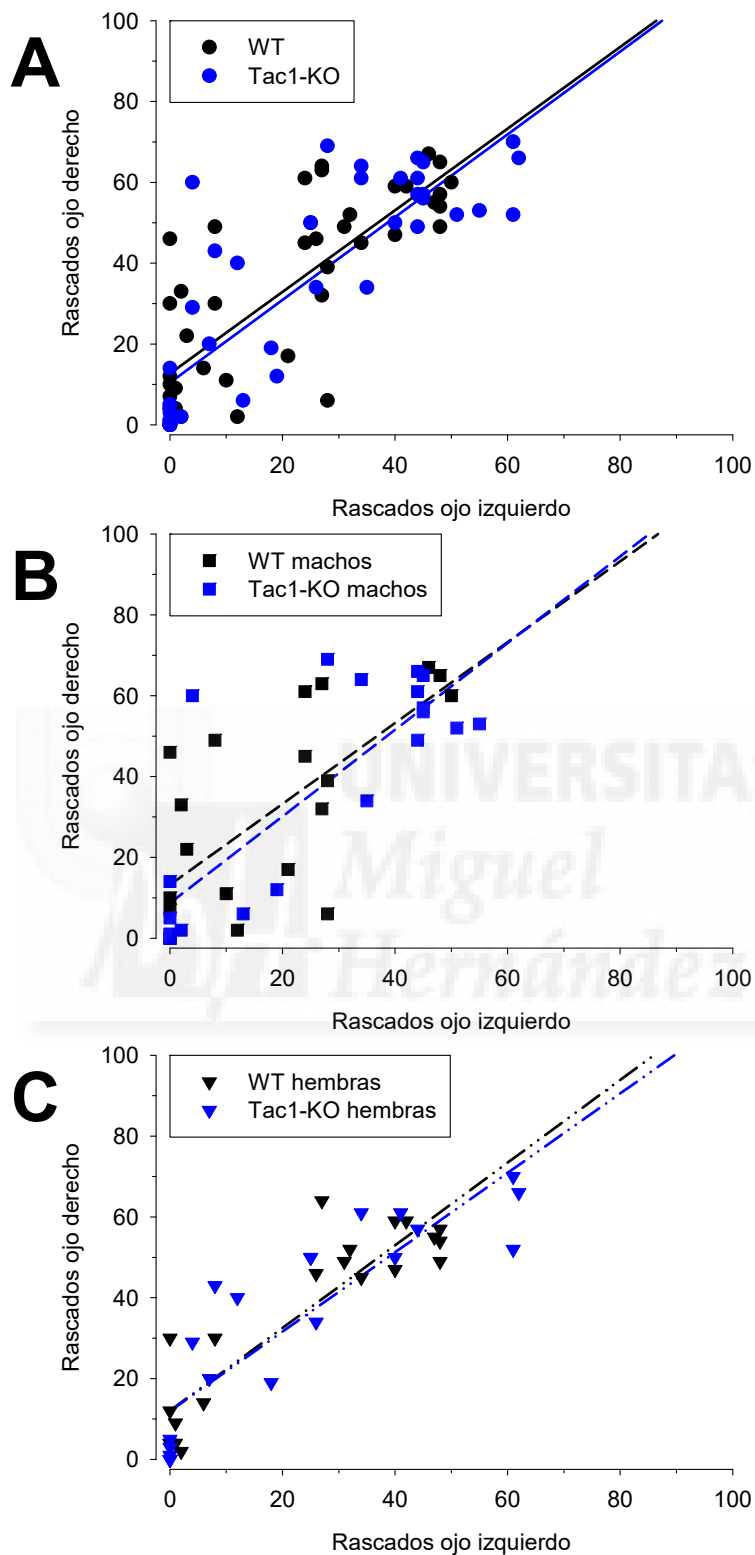


Figura 19. Correlación interocular en la respuesta conductual a la aplicación de capsaicina a diferentes concentraciones en los animales Tac1-KO y sus correspondientes controles.

A: Correlación interocular en ambas cepas ($n = 6$ animales por cepa). B: correlación interocular en los machos de cada cepa ($n = 3$ por cepa). C: correlación interocular en las hembras de cada cepa ($n = 3$ por cepa). Las rectas representan la función de regresión lineal para el conjunto de datos correspondiente.

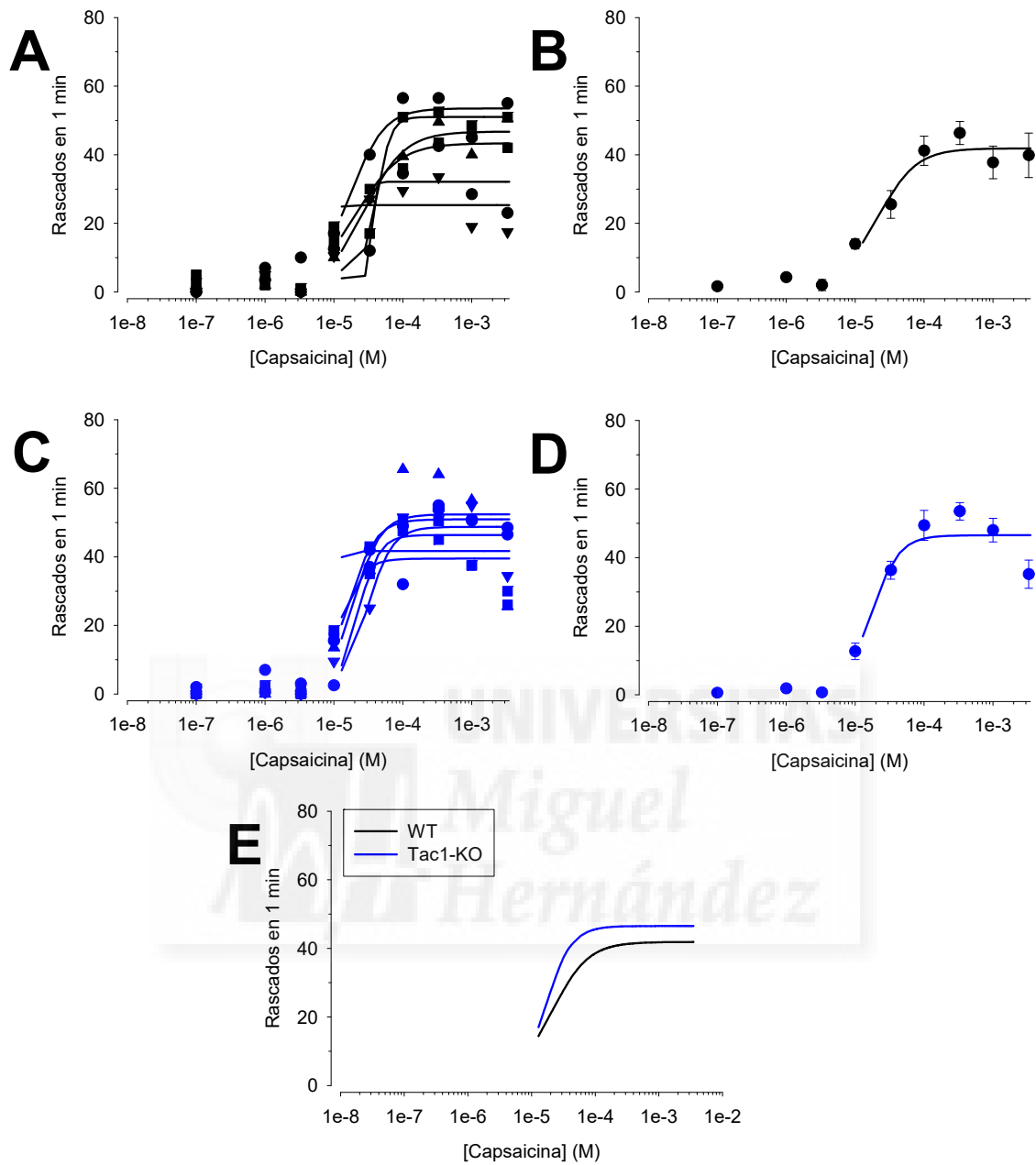


Figura 20. Ajuste de las curvas dosis-respuesta en los animales Tac1-KO y sus controles.

A: Ajuste individual de la respuesta de cada uno de los animales WT a una función cuatrimétrica; B: ajuste global de las respuestas de todos los animales WT a una función cuatrimétrica. Los símbolos representan la media \pm error estándar de la media, para cada concentración. C y D: ídem a A y B, pero para los datos de los animales Tac1-KO. E: comparación de las funciones de ajuste mostradas en B y D.

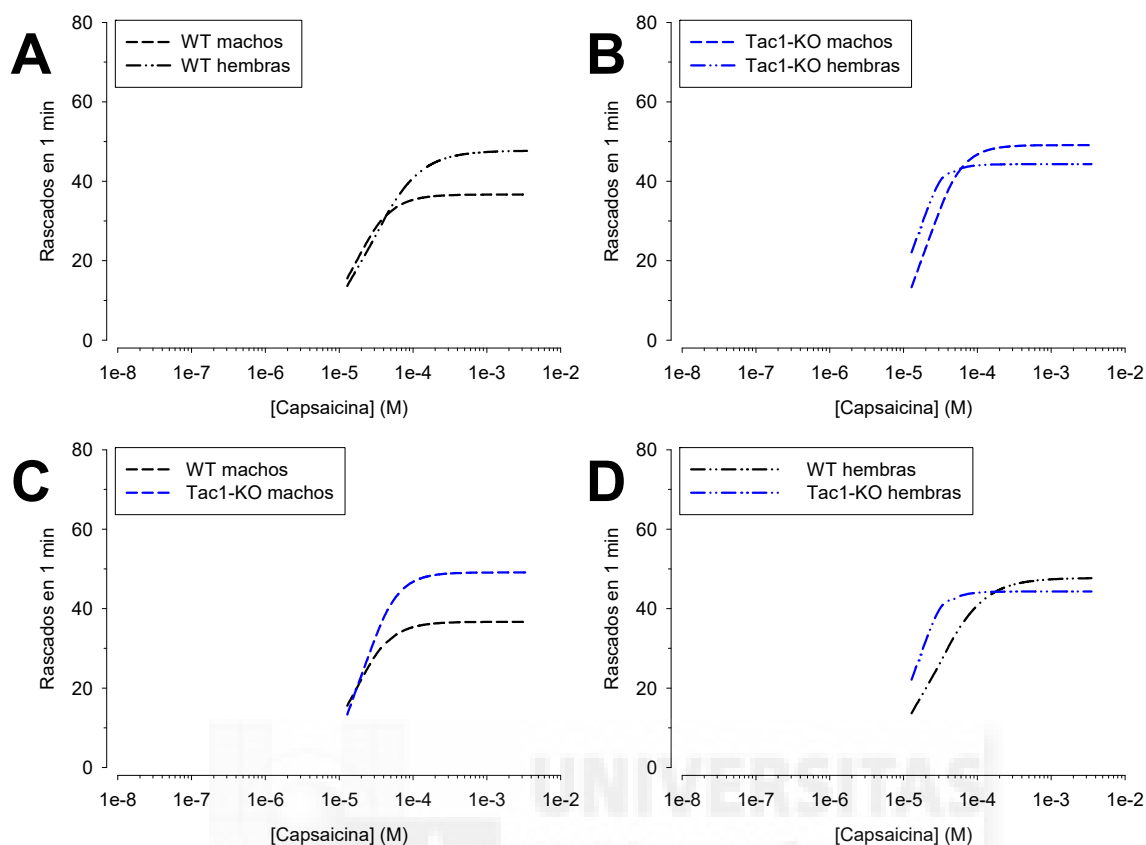


Figura 21. Ajuste de las curvas dosis-respuesta en los animales Tac1-KO y sus controles: comparación por sexos.

A: Comparación de la función ajustada entre machos y hembras WT ($n = 3$ por sexo). B: ídem a A, en los animales Tac1-KO; C: comparación de la función de ajuste entre los machos de ambas cepas ($n = 3$ por cepa). D: ídem a C, comparando entre las hembras de cada cepa. Los machos WT mostraron una tendencia, no significativa, a presentar una menor respuesta que el resto de los subgrupos.

4.2.2 Respuestas en la cepa α CGRP-KO.

De manera análoga a lo observado en los animales Tac1-KO, tanto los animales α CGRP-KO como sus correspondientes controles respondieron a la administración ocular tópica de capsaicina incrementando la frecuencia de movimientos de rascado dirigidos al ojo a medida que aumentaba la concentración de esta. En ambos grupos la respuesta mostró una alta correlación interocular ($y = 0.93 \cdot x + 3.3$, $r = 0.887$; α CGRP-KO: $y = 0.87 \cdot x + 2.1$, $r = 0.835$; $p < 0.001$, Pearson, en ambas cepas; figura 22, A). La correlación interocular fue similar en ambos sexos de cada cepa (figura 22, B y C).

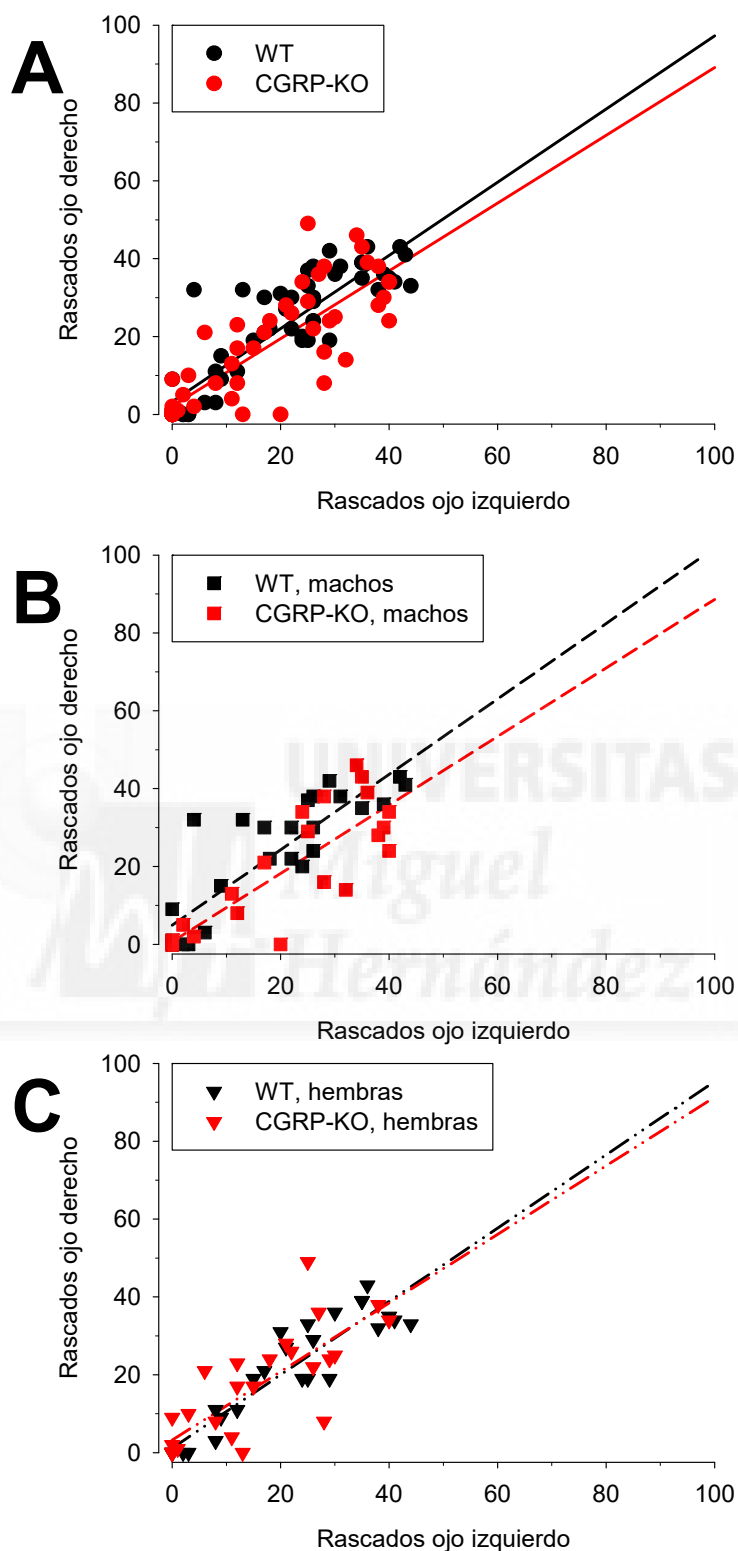


Figura 22. Correlación interocular en la respuesta conductual a la aplicación de capsaicina a diferentes concentraciones en los animales α CGRP-KO y sus controles.

A: Correlación interocular en ambas cepas ($n = 6$ animales por cepa). B: correlación interocular en los machos de cada cepa ($n = 3$ por cepa). C: correlación interocular en las hembras de cada cepa ($n = 3$). Las rectas representan la función de regresión lineal para el conjunto de datos correspondiente.

La curva dosis-respuesta ajustó al modelo propuesto con $r^2 = 0.804$ (WT) y $r^2 = 0.662$ (α CGRP-KO), con los siguientes parámetros: WT: mínimo = 0.7 ± 1.9 rascados·min⁻¹, máximo = 30.4 ± 1.2 rascados·min⁻¹, EC₅₀ = 7.7 ± 1.4 μ M y coeficiente de Hill = 2.2 ± 0.8 ; α CGRP-KO: mínimo = 0.7 ± 2.1 rascados·min⁻¹, máximo = 25.8 ± 1.6 rascados·min⁻¹; EC₅₀ = 10.9 ± 2.9 μ M y coeficiente de Hill = 4.1 ± 10.4 0.74 ± 2.1 (figura 23, E). Exceptuando el valor del coeficiente de Hill de la función del grupo de los KO, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos parámetros entre ambas cepas (tabla 3). La comparación de las correspondientes funciones estimadas por cepas y sexos se muestra en la figura 24.

Tabla 3: Comparación de los parámetros de las funciones de ajuste de la respuesta conductual a la aplicación ocular tópica de capsaicina en los animales α CGRP-KO y sus correspondientes controles.

	WT			α CGRP-KO		
	Global (n=6)	Machos (n=3)	Hembras (n=3)	Global (n=6)	Machos (n=3)	Hembras (n=3)
Min (rascados·min ⁻¹)	0.46 ± 0.4	0.49 ± 0.7	0.42 ± 0.5	0.25 ± 0.2	0.20 ± 0.1	0.28 ± 0.4
Max (rascados·min ⁻¹)	30.8 ± 2.4	31.6 ± 2.1	30.1 ± 4.9	26.1 ± 1.9	29.1 ± 1.6	23.1 ± 2.8
EC₅₀ (μ M)	8.5 ± 1.5	11.2 ± 1.9	5.9 ± 1.2	12.3 ± 2.9	17.4 ± 3.7	7.2 ± 1.5
Hill	2.5 ± 0.2	2 ± 0.4	2.4 ± 0.2	7.9 ± 3.1*	8.2 ± 4.9	10.4 ± 7.8

Min: mínimo número de rascados en un minuto estimado por la función de ajuste; Max: máximo número de rascados en un minuto estimado por la función de ajuste; EC₅₀: concentración efectiva 50, en μ M, estimada por la función de ajuste; Hill: coeficiente de Hill estimado por la función de ajuste. Los datos globales se compararon entre cepas con la t de Student (* $p < 0.05$, Mann -Whitney). Los datos por sexo y cepa se compararon con un ANOVA.

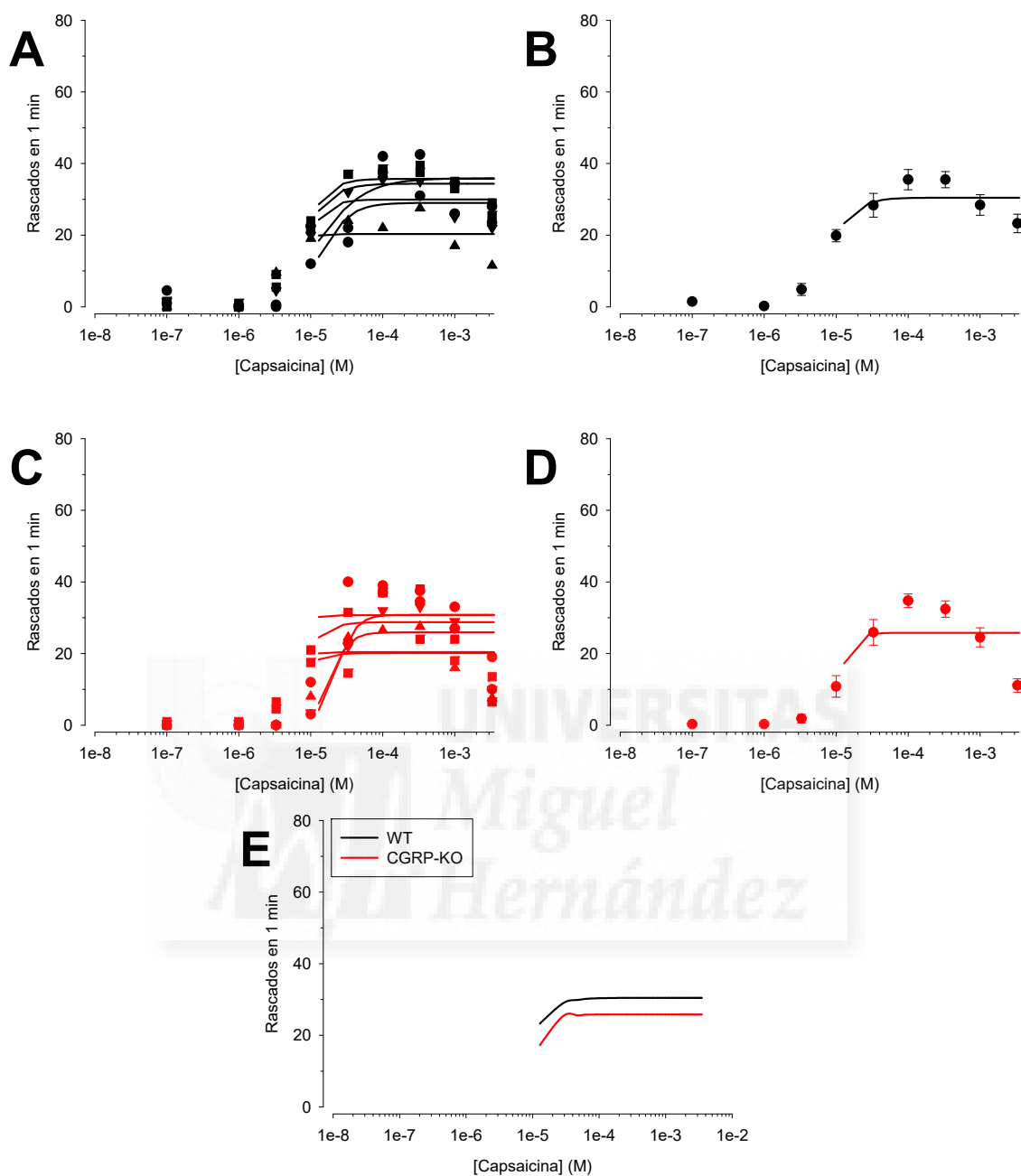


Figura 23. Ajuste de las curvas dosis-respuesta en los animales CGRP-KO y sus controles.

A: Ajuste individual de la respuesta de cada uno de los animales WT a una función cuatrimétrica; B: ajuste global de las respuestas de todos los animales WT a una función cuatrimétrica. Los símbolos representan la media \pm eem, para cada concentración. C y D: ídem a A y B, pero para los datos de los animales α CGRP-KO. E: comparación de las funciones de ajuste mostradas en B y D.

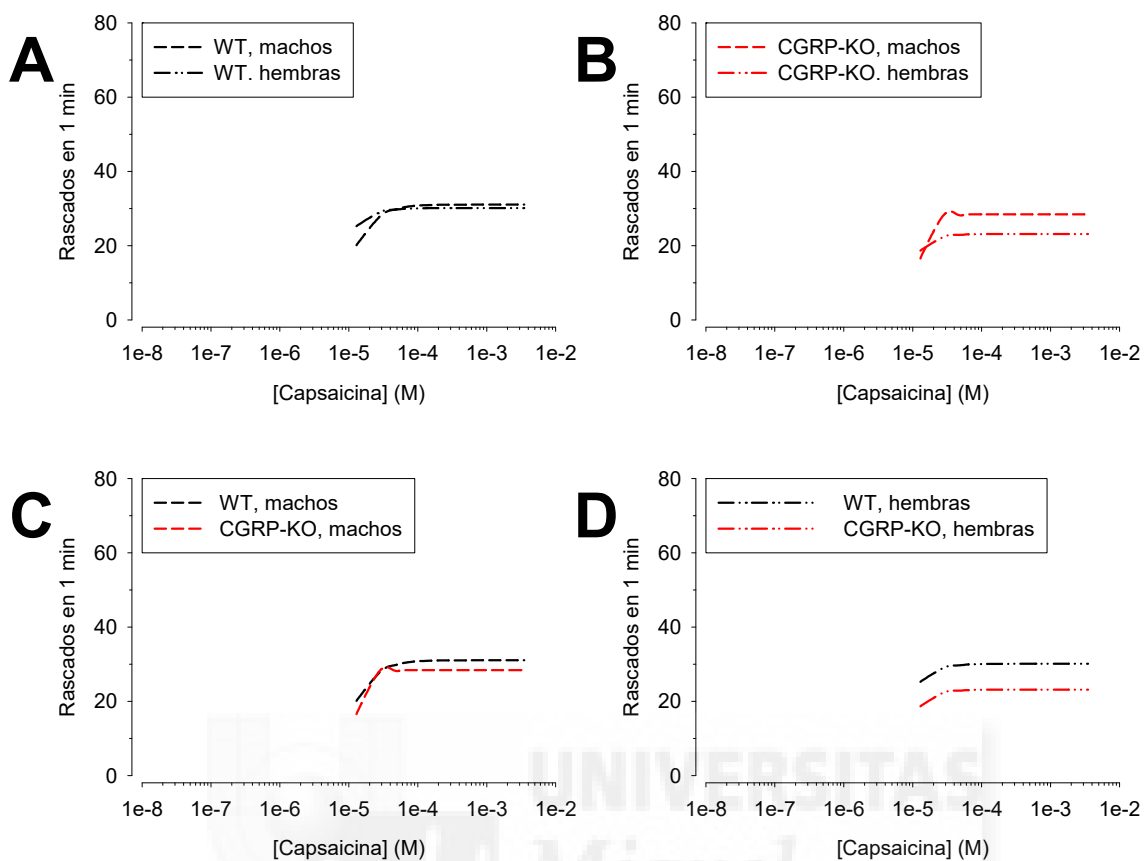


Figura 24. Ajuste de las curvas dosis-respuesta en los animales α CGRP-KO y sus controles: comparación por sexos.

A: Comparación de la función ajustada entre machos y hembras WT ($n = 3$ por sexo). B: ídem a A, en los animales α CGRP-KO; C: comparación de la función de ajuste entre los machos de ambas cepas ($n = 3$ por cepa). D: ídem a C, comparando entre las hembras de cada cepa.

4.3 Producción basal de lágrima en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.

La producción lacrimal basal y el efecto sobre la misma de la estimulación mecánica nociva de la córnea se estudió en ambos ojos de siete animales de cada cepa. No se encontraron diferencias en la producción lacrimal basal en los animales Tac1-KO y los α CGRP-KO, en comparación con los WT (figura 25, A). Sin embargo, al realizar un análisis correlacional entre la producción lacrimal de ambos ojos del mismo animal se observó que mientras en los animales WT existía una alta correlación interocular ($r = 0.984$, $p < 0.001$, Pearson; figura 25, B), esta no existía en ninguna de las dos cepas KO ($r = 0.280$, Tac1-KO; $r = 0.358$, α CGRP-KO; figura 25, C y D). No se observaron diferencias en la correlación interocular de producción lacrimal por sexos en ninguna de las cepas estudiadas (figura 26).

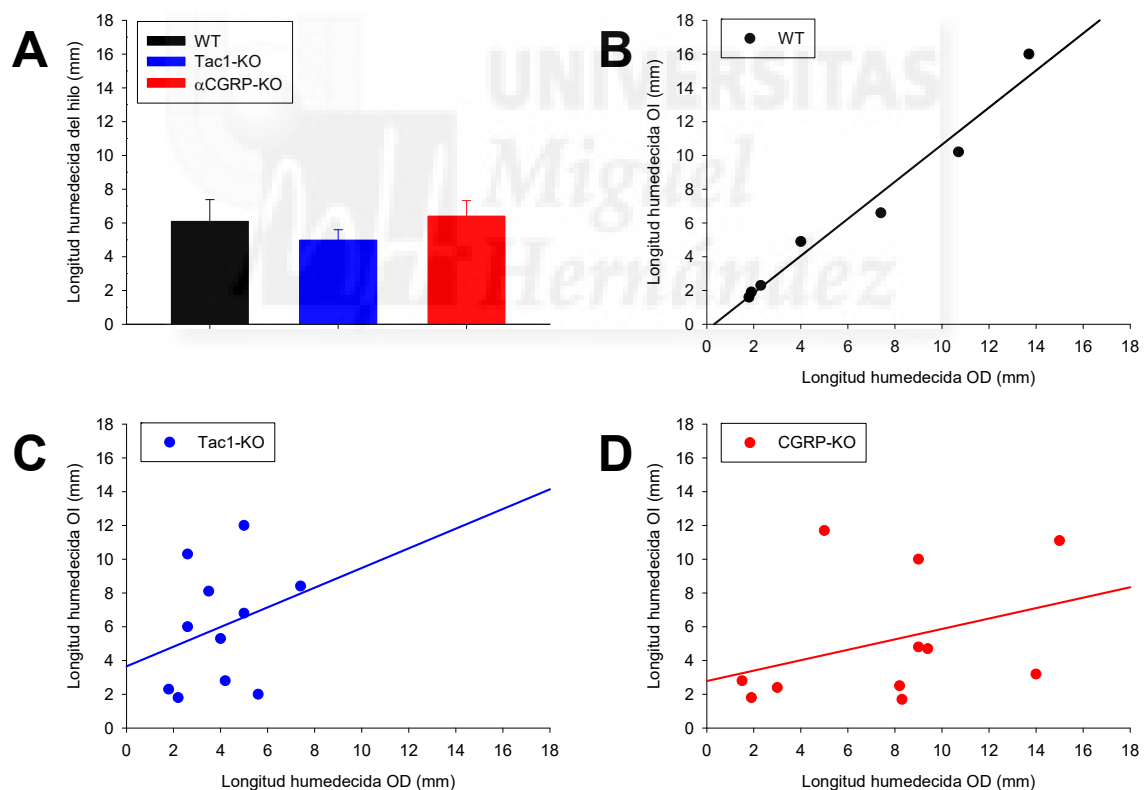


Figura 25. Producción lacrimal basal en ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.

A: no se encontraron diferencias en la producción lacrimal basal en ninguna de las cepas estudiadas ($n = 14$ ojos, WT; $n = 22$ ojos en cada grupo de KO; $p = 0.471$, ANOVA). B-D: correlación interocular de la producción lacrimal basal en cada uno de los grupos. Se muestra la línea de regresión para cada conjunto de datos. Se puede observar que mientras en el grupo WT existió una fuerte correlación en la producción lacrimal entre ambos ojos (B), dicha correlación no existía en las cepas KO (C, D).

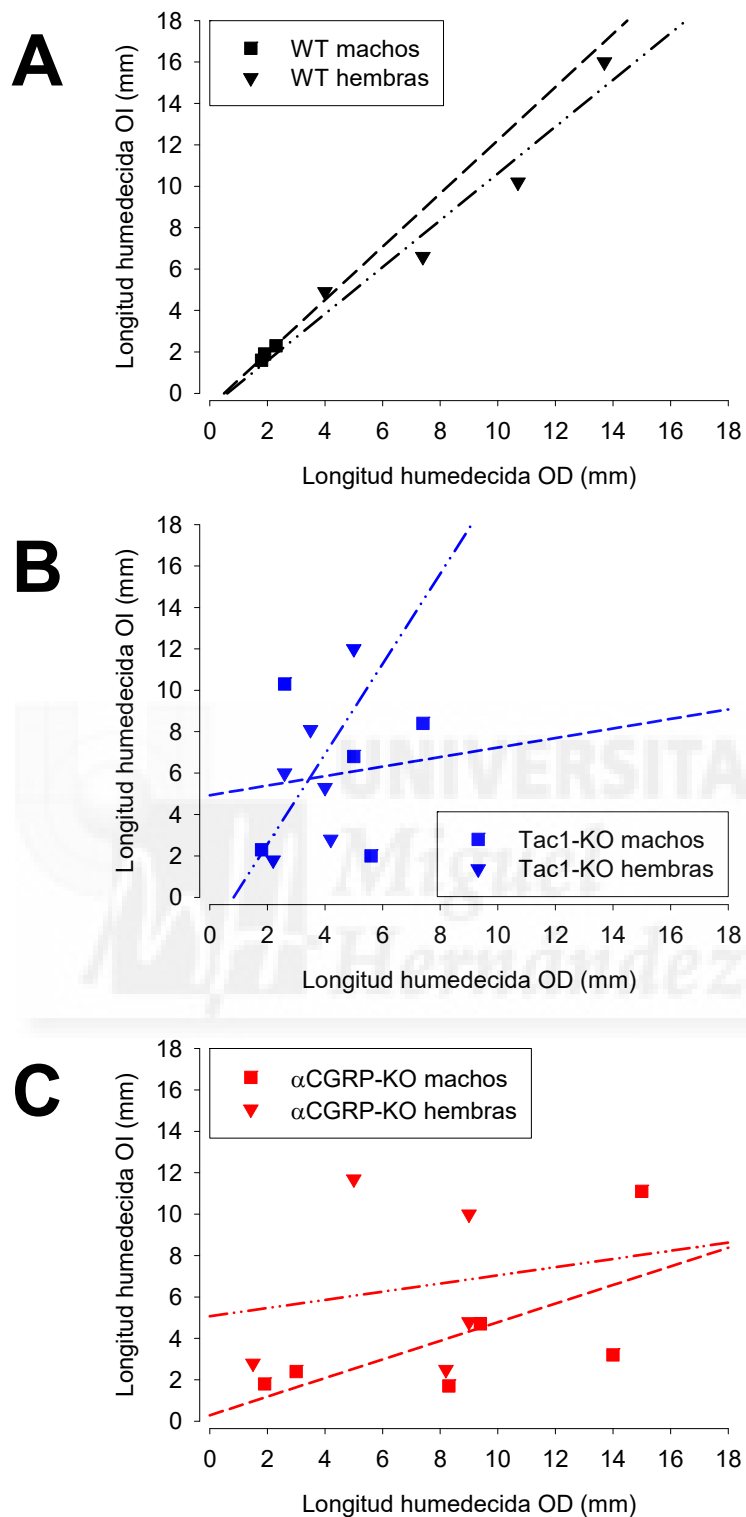


Figura 26. Correlación interocular de la producción lacrimal basal en las distintas cepas estudiadas: comparación por sexos.

A: Correlación interocular de la producción lacrimal basal en los animales WT. Las líneas rayadas representan la recta de regresión lineal correspondientes a los datos de los machos, y las líneas rayadas y punteadas a la recta de regresión lineal correspondiente a los datos de las hembras. B y C: ídem para los datos de los animales tac2-KO y α CGRP-KO, respectivamente.

La producción lacrimal basal de los ratones macho WT fue significativamente menor que la de las hembras WT (figura 27, A). No se encontraron diferencias entre sexos dentro de las cepas de animales KO, ni en la producción lacrimal basal, ni tras la estimulación mecánica nociva de la córnea (figura 27, A y B). Los machos WT presentaron una menor producción lacrimal basal que los machos α CGRP-KO (figura 27, A y C). Tras la estimulación mecánica nociva de la córnea la producción lacrimal basal fue significativamente mayor en los machos α CGRP-KO, que en los machos de las otras dos cepas (figura 27, C). Ninguna de estas diferencias pudo observarse en el caso de las hembras (figura 27, D).

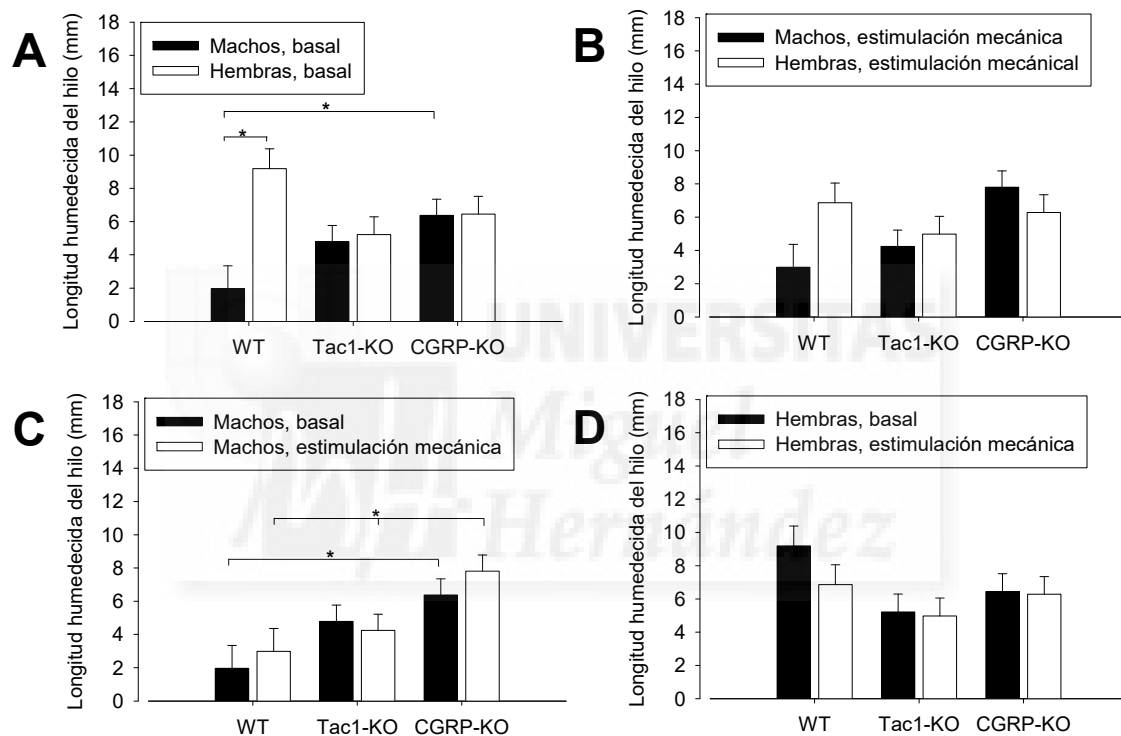


Figura 27. Producción lacrimal basal y en respuesta a la estimulación mecánica de la córnea en ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.

A: Producción lacrimal basal en machos y hembras de cada cepa (* $p < 0.05$, ANOVA bifactorial). B: Producción lacrimal tras la estimulación mecánica nociva de la córnea en machos y hembras de cada cepa. C: comparación del efecto de la estimulación mecánica de la córnea sobre la secreción lacrimal en los machos estudiados (* $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas). D: comparación del efecto de la estimulación mecánica de la córnea sobre la secreción lacrimal en las hembras estudiadas. WT, $n = 14$ ojos de 7 animales (3 machos y 4 hembras); Tac1-KO, $n = 22$ ojos de 11 animales (6 machos y 5 hembras); α CGRP-KO, $n = 22$ ojos de 11 animales (6 machos y 5 hembras).

4.4 Liberación de neuropéptidos desde las terminales nociceptivas de la córnea, estimulada por capsaicina.

4.4.1 Liberación de NKA desde la córnea de ratones Tac1-KO.

En el modelo de liberación de neuropéptidos propuesto en este trabajo no pudo determinarse si la capsaicina libera o no NKA desde las terminales nerviosas corneales debido a que las concentraciones de este péptido medidas en las soluciones a las que se expuso secuencialmente la córnea estuvieron por debajo del nivel de sensibilidad del ELISA utilizado para la medición (figura 28, A). Tan sólo en un único caso, tras la estimulación de una córnea WT con capsaicina se observó un aumento de la concentración del péptido que alcanzó valores dentro del rango de sensibilidad del kit. Por ello, aunque se realizaron las transformaciones a liberación por peso del tejido (figura 28, B-D), y se realizaron las comparaciones estadísticas correspondientes, se considera que todos estos datos no aportan información significativa.

4.4.2 Liberación de CGRP desde la córnea de ratones α CGRP-KO.

La exposición aguda al vehículo de la capsaicina no consiguió incrementar la liberación del péptido desde las córneas, independientemente de la cepa de origen (figura 29, A y B). Por el contrario, tras la exposición de las córneas WT a la capsaicina se incrementó la liberación del α CGRP desde las mismas, fenómeno que no pudo replicarse en las córneas α CGRP-KO (figura 29 C y D). En este caso, las concentraciones de CGRP fueron significativamente mayores en el grupo WT, en comparación con el α CGRP-KO en todas las mediciones (figura 29, C; BASAL: 89.1 ± 7.4 vs 56.6 ± 2.0 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$; EST: 165.8 ± 12.2 vs. 54.4 ± 1.3 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$; POST5: 100.1 ± 10.9 vs. 52.1 ± 0.8 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$; POST10: 75.1 ± 6.6 vs. 47.9 ± 0.9 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$; WT vs. α CGRP-KO, $p < 0.001$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas, Holm-Sidak). Del mismo modo, la liberación de CGRP por unidad de masa de tejido corneal fue significativamente mayor en las córneas WT en comparación con las α CGRP-KO, en situación basal, durante la estimulación con capsaicina, y 5 minutos tras la finalización de la misma (figura 29, D; BASAL: 36.9 ± 4.3 vs 22.8 ± 1.9 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$; EST: 68.5 ± 8.1 vs. 23.7 ± 2.2 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$; POST5: 40.6 ± 4.3 vs. 22.2 ± 2.0 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$; POST10: 31.1 ± 3.6 vs. 20.5 ± 1.9 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$; WT vs. α CGRP-KO, $p < 0.001$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas; Holm-Sidak)

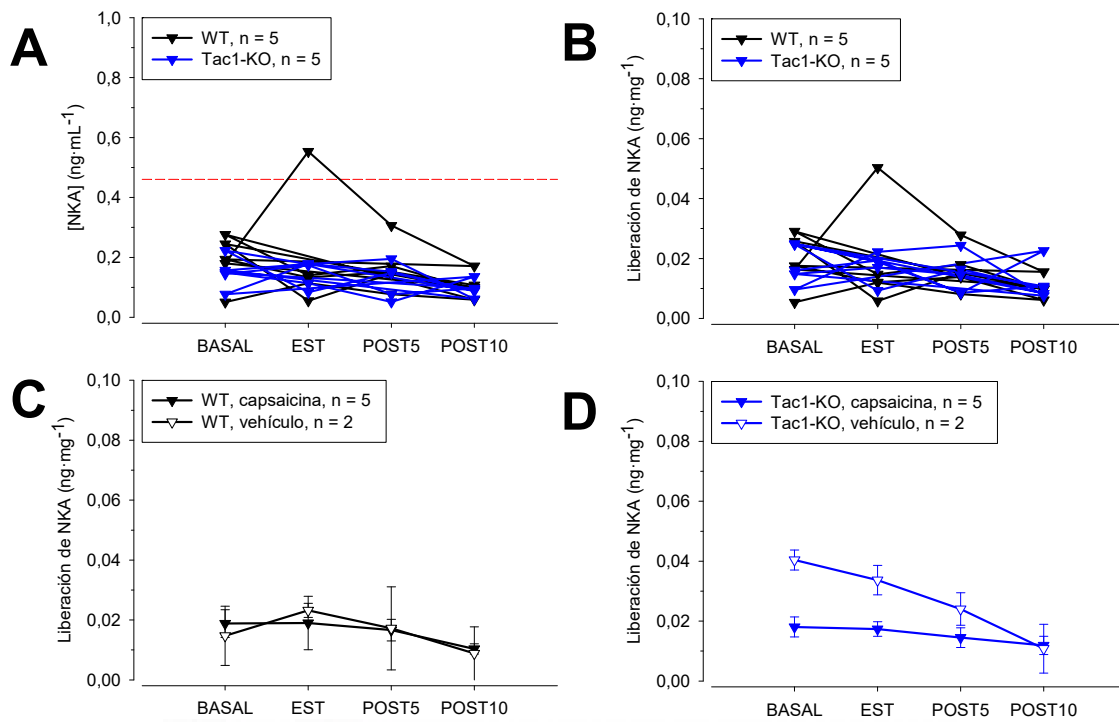


Figura 28. Liberación de NKA inducida por la exposición de la córnea a la capsaicina.

A: Concentración de NKA en el medio al que se exponía secuencialmente cada córnea. La línea roja discontinua marca el límite de sensibilidad del kit de medida. B: Liberación de NKA expresada en función del peso de la córnea. C: liberación de NKA inducida por la exposición de la córnea de animales WT a la capsaicina o su vehículo. D. liberación de NKA por la exposición de la córnea de animales tac1-KO a la capsaicina o su vehículo. BAS: basal; EST: estímulo (capsaicina 33 mM o vehículo); POST5 Y POST10: mediciones a los 5 o 10 min post-estímulo.

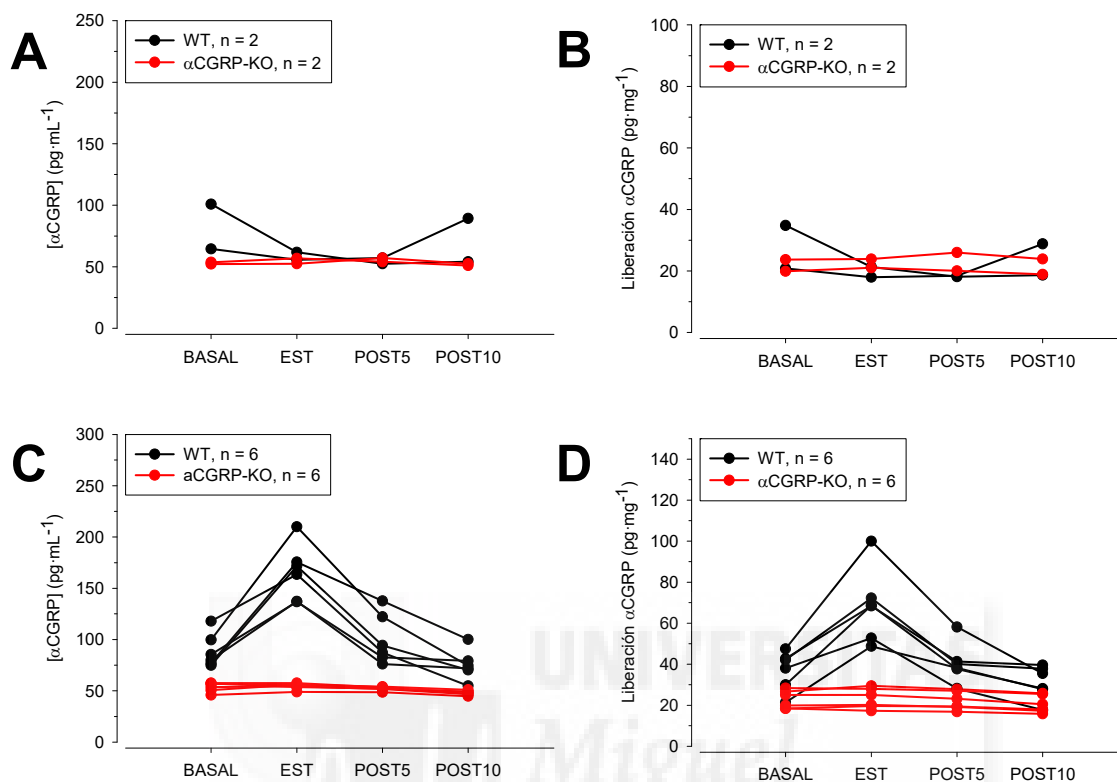


Figura 29. Liberación de α CGRP inducida por la exposición de la córnea a la capsaicina.

A: Concentración de α CGRP en las soluciones en las que fue colocada la córnea cuando fue expuesta al vehículo (negro = WT; rojo = α CGRP-KO; $n = 2$ por cepa). B: Liberación de α CGRP al exponer la córnea al vehículo (negro = WT; rojo = α CGRP-KO; $n = 2$ por cepa). C: Concentración de α CGRP en las soluciones en las que fue colocada la córnea cuando fue expuesta a la capsaicina (negro = WT; rojo = α CGRP-KO; $n = 6$ por cepa). D: Liberación de α CGRP al exponer la córnea a la capsaicina (negro = WT; rojo = α CGRP-KO; $n = 6$ por cepa). Los valores de las comparaciones estadísticas pueden encontrarse en el texto. BAS: basal; EST: estímulo (capsaicina 33 mM o vehículo); POST5 Y POST10: mediciones a los 5 o 10 min post-estímulo.

4.5 Efecto del co-cultivo de células del trigémino sobre la cicatrización *in vitro* de HCEC.

En el modelo de cicatrización *in vitro*, no se redujo el área de las lesiones realizadas en monocapas de HCEC cultivadas en ausencia de FBS (figura 30, columna derecha) a lo largo del periodo de estudio. Por el contrario, en los pocillos cultivados en presencia de FBS (figura 30, columna de la izquierda), al área desepitelizada volvió a cubrirse de células por completo en dicho tiempo. Por su parte, en los pocillos en los que las células fueron co-cultivadas con células trigeminales las lesiones también tendieron a cicatrizar (figura 30, columnas centrales), aunque la cinética de este proceso fue más lenta.

La reducción del área de las lesiones a lo largo del tiempo pudo ajustarse a un modelo logístico cuatrimétrico. En comparación con lo observado en los pocillos tratados con FBS (figura 31, A) o co-cultivados con células trigeminales procedentes de ratones WT (figura 31, B), en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de animales KO ($n = 4$, por cepa), el ajuste presentó mucha mayor variabilidad (figura 31, B-D). Los parámetros de las funciones de ajuste global (figura 31, E) fueron los siguientes: FBS: min = -5.4 ± 3.3 % área, máx = 99.6 ± 2.9 % área, $t_{50} = 18.0 \pm 0.93$ h, coeficiente de Hill = -2.5 ± 0.3 ; $r^2 = 0.962$; WT: min = -16.1 ± 11.6 % área, máx = 98.9 ± 3.83 % área, $t_{50} = 37.6 \pm 3.4$ h, coeficiente de Hill = -2.9 ± 0.6 , $r^2 = 0.945$; Tac1-KO: min = -10.2 ± 19.8 % área, máx = 96.4 ± 6.7 % área, $t_{50} = 38.7 \pm 5.9$ h, coeficiente de Hill = -3.2 ± 1.3 , $r^2 = 0.853$; α CGRP-KO: min = -69.8 ± 176.2 % área, máx = 98.7 ± 8.8 % área, $t_{50} = 66.6 \pm 81.2$ h, coeficiente de Hill = -1.7 ± 1.1 , $r^2 = 0.762$.

Por su parte, el ajuste a una función gaussiana (figura 32) permitió observar que el tiempo al que se alcanzaba la máxima velocidad de reducción del área de las desepitelizaciones (t_{max}) fue menor en los pocillos cultivados en presencia de FBS que en los restantes (tabla 4). Para cada una de las condiciones experimentales, estos parámetros (figura 32, E) fueron los siguientes: FBS: $v_{max} = -3.2 \pm 0.2 \Delta$ % área \cdot h $^{-1}$, $t_{max} = 24.5 \pm 0.9$ h, $r^2 = 0.822$; WT: $v_{max} = -2.4 \pm 0.2 \Delta$ % área \cdot h $^{-1}$, $t_{max} = 40.5 \pm 1.9$ h, $r^2 = 0.598$; Tac1-KO: $v_{max} = -2.3 \pm 0.4 \Delta$ % área \cdot h $^{-1}$, $t_{max} = 42.8 \pm 3.0$ h, $r^2 = 0.353$; α CGRP-KO: $v_{max} = -1.7 \pm 0.2 \Delta$ % área \cdot h $^{-1}$, $t_{max} = 44.6 \pm 3.3$ h, $r^2 = 0.383$. Como se puede observar, el ajuste fue muy bueno para los pocillos considerados controles positivos, no así para las distintas condiciones experimentales de co-cultivo. La tabla 4 resume la comparación estadística de la media de los parámetros de ajuste para estas funciones para cada serie de datos individuales.

Por último, el análisis de la reducción del tamaño de la lesión durante la fase lineal de la misma no encontró diferencias en la velocidad media de reducción del área durante dicha fase lineal (figura 33, A), aunque se observó una tendencia no significativa a que el tiempo estimado de cicatrización fuese mayor en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de animales KO de ambas cepas (figura 33, B).

Tabla 4: Comparación de los parámetros de las funciones de ajuste de la cicatrización de lesiones realizadas en monocapas de HCEC.

	FBS (n = 6)	WT (n = 5)	Tac1-KO (n = 3) ^a	α CGRP-KO (n=3) ^a
Función logística cuatrimétrica				
Min (% área)	-5.2 ± 1.1	-16.5 ± 13.2	-2.1 ± 1.6	-6.8 ± 6.8
Max^b (% área)	-	-	-	-
t₅₀ (h)	18.4 ± 1.4*	39.2 ± 5.8	34.5 ± 3.3	34.9.3 ± 5.9
Hill	-2.8 ± 0.2	-3.5 ± 0.5	-5.7 ± 0.8*	-3.1 ± 0.3
Función gaussiana				
v_{max} (Δ % área·h⁻¹)	-3.4 ± 0.2	-2.6 ± 0.3	-3.2 ± 0.5	-2.1 ± 0.2
t_{max} (h)	24.7 ± 1.6*	41.7 ± 2.8	42.5 ± 2.2	42.0 ± 4.6

Min: área mínima (en porcentaje sobre la inicial); Max: área máxima inicial (en porcentaje sobre la inicial); t₅₀: tiempo, en horas, hasta alcanzar el 50% del área inicial; Hill: coeficiente de Hill estimado por la función de ajuste; v_{max}: máxima reducción del área por unidad de tiempo (% área·h⁻¹); t_{max}: momento estimado en el que se alcanzó v_{max} (en horas desde la realización de la lesión). * p < 0.05 respecto al resto de los grupos, ANOVA unifactorial, Holm-Sidak. ^a Se usaron tres series de datos, puesto que el ajuste de la cuarta proporcionaba valores anormales. ^b Este parámetro se fijó como compartido entre los diferentes ajustes, puesto que el área inicial de todas las lesiones era del 100%.

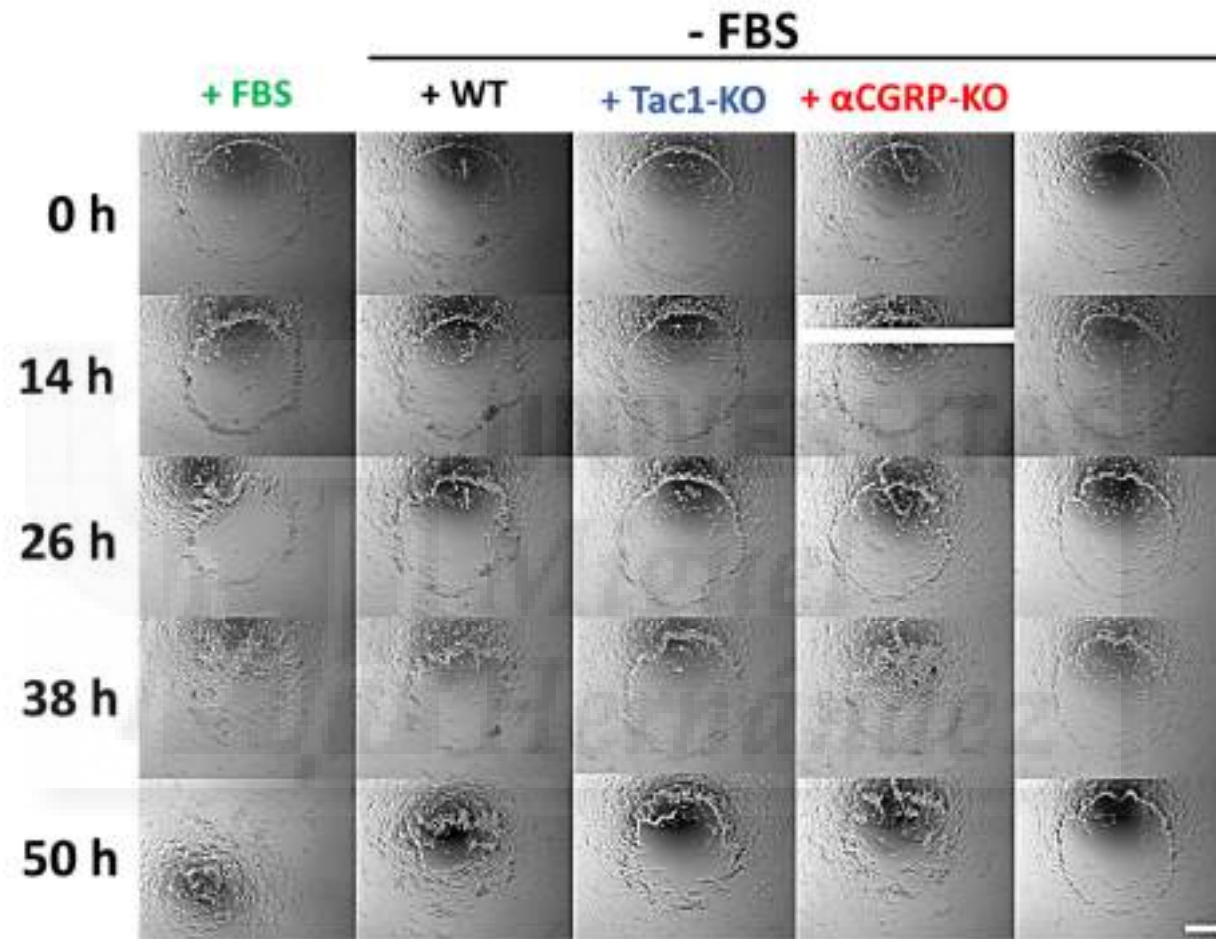


Figura 30. Efecto del co-cultivo de HCEC con células del trigémino en el modelo de cicatrización *in vitro*.

Ejemplos representativos del curso temporal de la cicatrización en los pocillos en los que las HCEC fueron cultivadas en presencia de suero bovino fetal (+FBS, controles positivos) o en su ausencia (-FBS). Dentro de estos últimos, aquellos que se cultivaron sin ninguna otra intervención se consideraron los controles negativos (columna derecha), mientras que en otros las HCEC se co-cultivaron con células disociadas de trigéminos provenientes de ratones WT, Tac1-KO o α CGRP-KO (columnas centrales). Escala: 500 μ m.

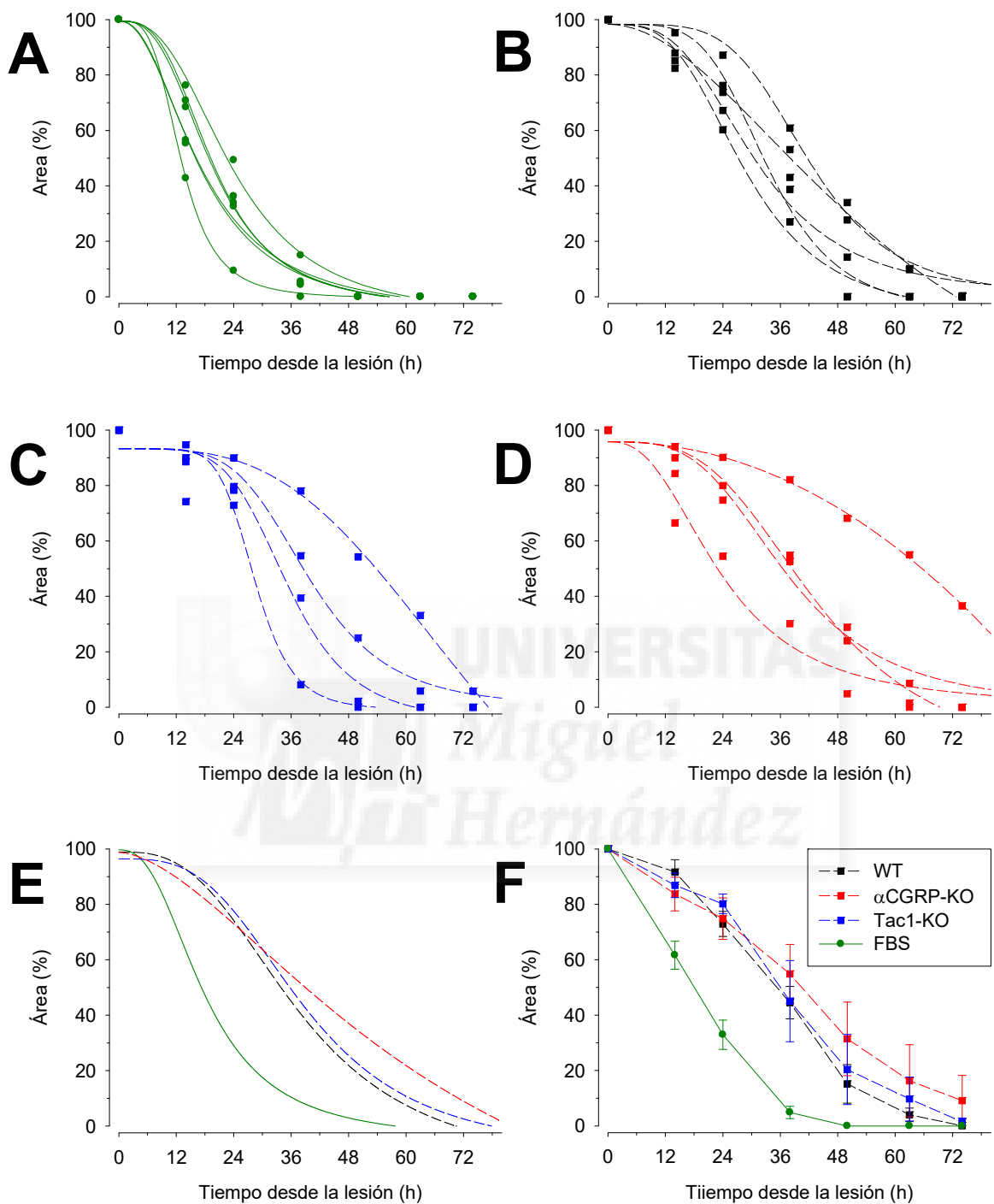


Figura 31. Cinética de la cicatrización en cada una de las condiciones experimentales *in vitro*.

A: Ajuste de las series de datos individuales a la función indicada, en los pocillos cultivados en presencia de FBS. B: ídem, en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de machos WT; C: ídem, en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de machos Tac1-KO; D: ídem, en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de machos α CGRP-KO; E: comparación de las funciones de ajuste global de los datos de cada condición experimental; F: representación de los valores del área (media \pm error estándar de la media) a los tiempos indicados. Los datos presentados como cuadrados y líneas discontinuas representan que las células trigeminales que se co-cultivaron con las HCEC se obtuvieron de animales macho.

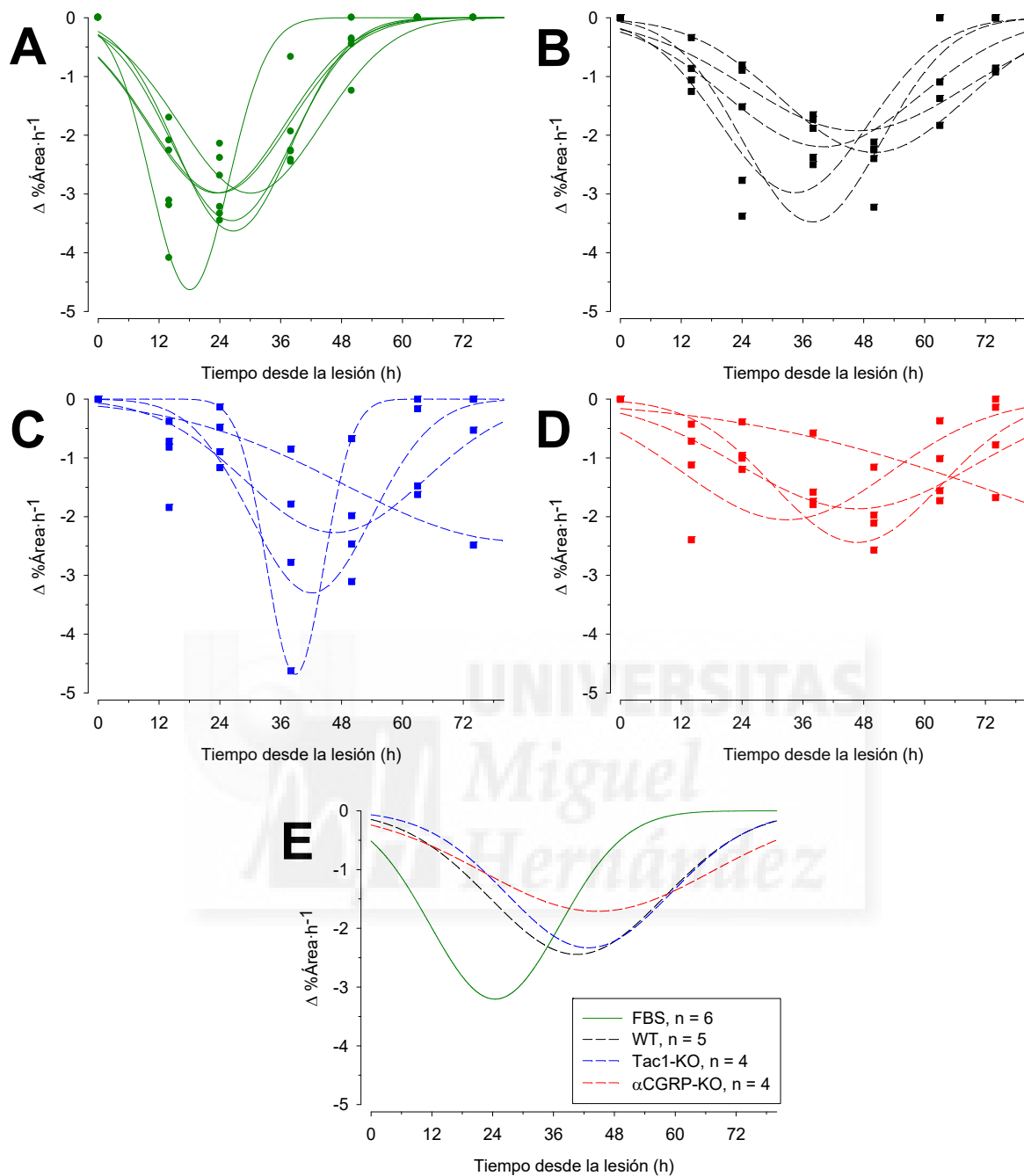


Figura 32. Determinación de v_{max} y t_{max} en cada una de las condiciones experimentales *in vitro*.

A: Ajuste de las series de datos individuales a la función indicada en el texto, en los pocillos cultivados en presencia de FBS. B: ídem, en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de machos WT; C: ídem, en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de machos Tac1-KO; D: ídem, en los pocillos co-cultivados con células trigeminales de machos α CGRP-KO; E: comparación de las funciones de ajuste global de los datos de cada condición experimental.

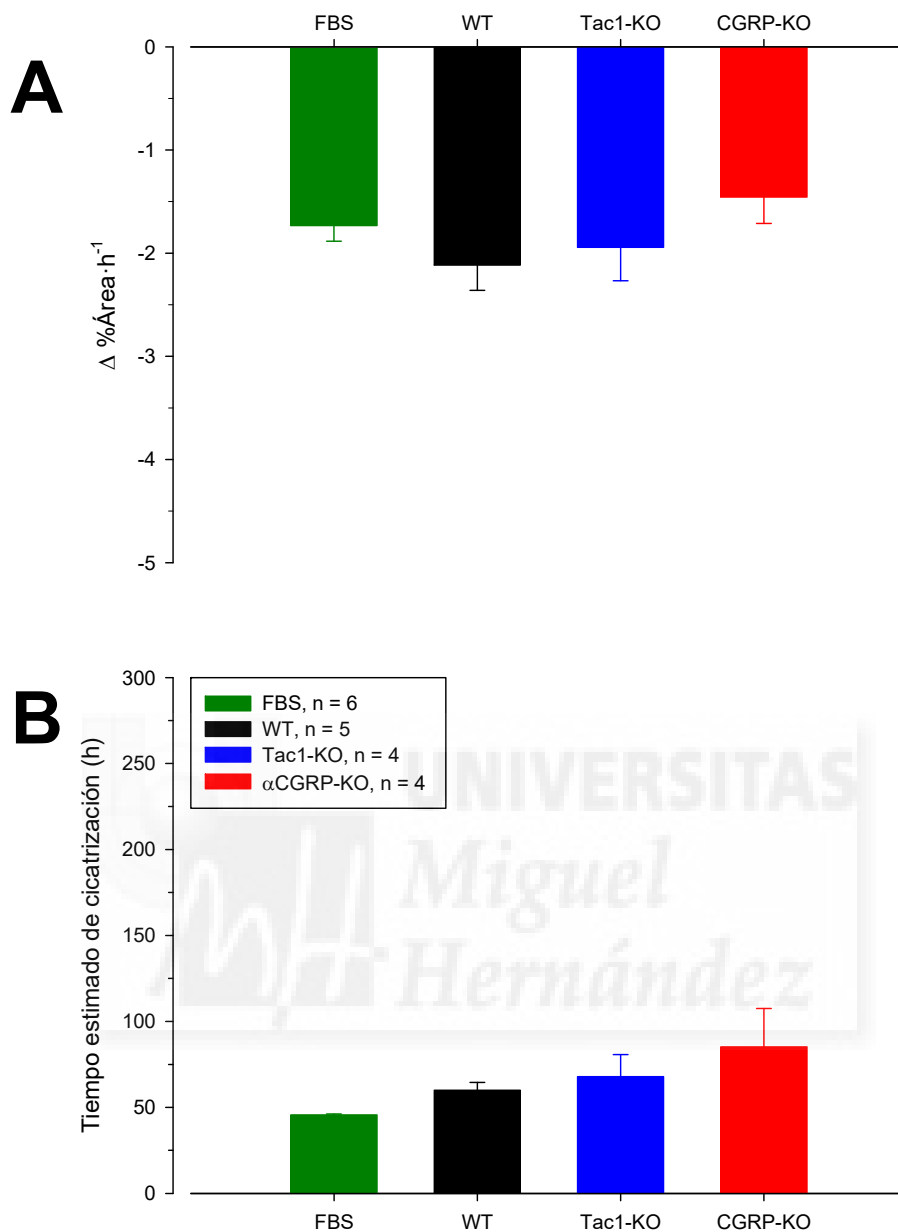


Figura 33. Velocidad de reducción del área de las lesiones durante la fase lineal de la cicatrización, y tiempo estimado de cicatrización.

A: Velocidad de cicatrización durante la fase lineal de la misma (entre las 16 y las 50 horas tras la lesión). B: tiempo estimado de cicatrización, calculado a partir del ajuste de cada serie de datos individual a una función lineal. Para ninguna de estas variables se observaron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA unifactorial).

4.6 Efecto del CGRP sobre la cicatrización *in vitro* de HCEC.

En la serie de experimentos en la que se probó el efecto de añadir directamente α CGRP humano al medio de cultivo de las HCEC, éste se añadió a pocillos en los que las células se cultivaban en ausencia de FBS. Una serie de pocillos se cultivaron en presencia de FBS (figura 34, columna izquierda) y se consideraron los controles positivos, mientras que otros se cultivaron en ausencia de FBS (figura 34, segunda columna) y se consideraron los controles negativos.

Como puede observarse en dicha figura, la adición al medio de α CGRP humano a concentraciones hasta 10^{-12} M no estimuló la cicatrización de las lesiones realizadas en las monocapas de HCEC. Por el contrario, desde la primera adición de α CGRP a 10^{-10} M, las HCEC se despegaron del pocillo, y fueron arrastradas durante los lavados de este. Dicho efecto se observó en todos los pocillos en los que las HCEC se cultivaron en esta condición.

Debido a la ausencia de efecto del α CGRP sobre la cicatrización no pudo modelarse matemáticamente la misma.



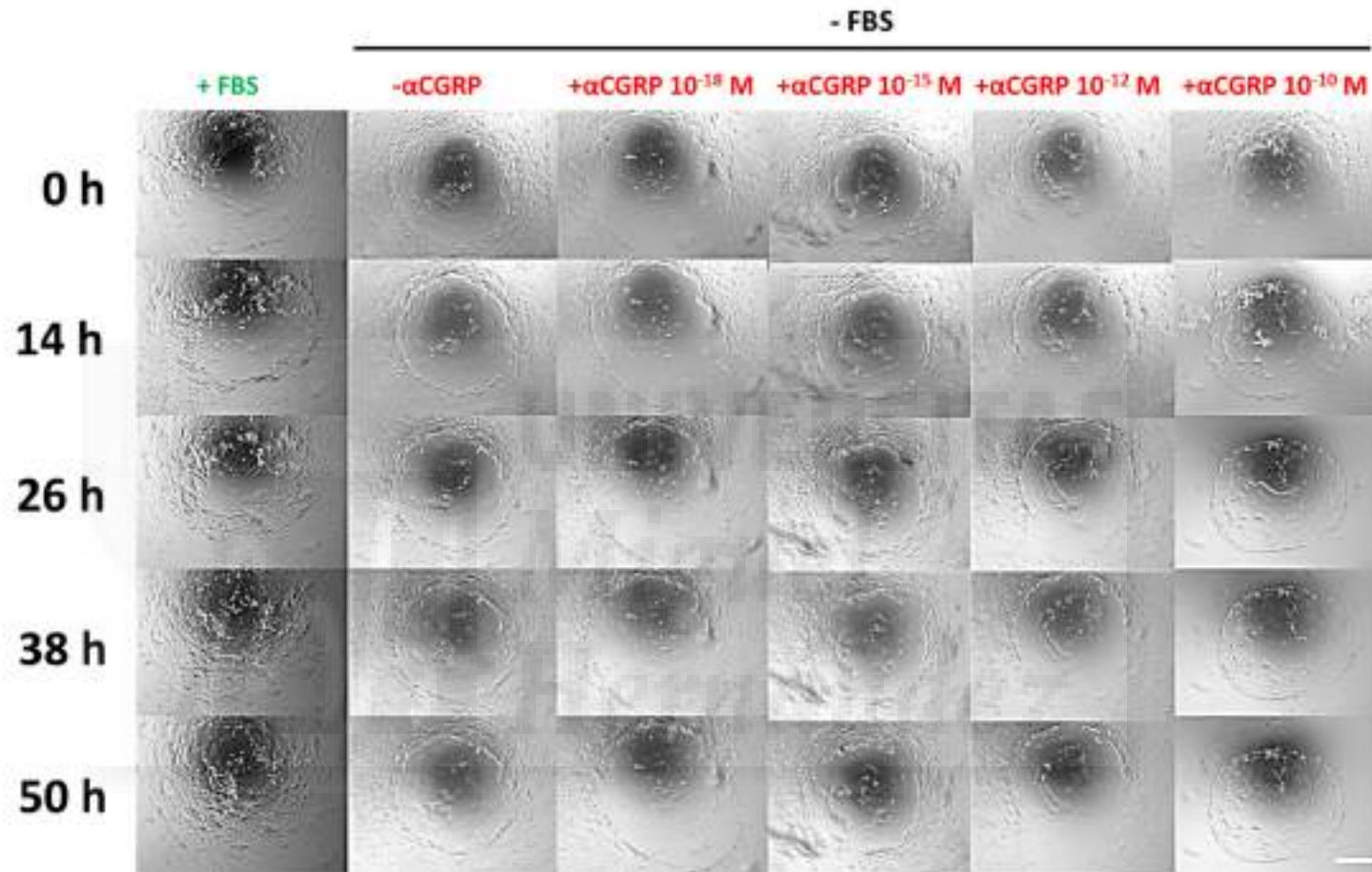


Figura 34. Efecto de la adición de CGRP humano al medio de cultivo de HCEC en el modelo de cicatrización *in vitro*.

En los pocillos cultivados en presencia de FBS (primera columna, controles positivos), la cicatrización ocurrió en las primeras 50 horas tras la lesión de las monocapas. Por el contrario, en los pocillos cultivados en ausencia de FBS y α CGRP (segunda columna, controles negativos), el área de las lesiones no varió significativamente a lo largo de este mismo tiempo. Lo mismo se observó en los pocillos cultivados en presencia de concentraciones de α CGRP entre 10^{-18} y 10^{-12} M. En los pocillos en los que el α CGRP se añadió al medio de cultivo a una concentración 10^{-10} M, las células se despegaron del pocillo desde la primera administración del neuropéptido (columna de la derecha). Escala: 500 μ m

4.7 Cicatrización de lesiones del epitelio corneal *in vivo* en los ratones Tac1-KO y α CGRP-KO.

En las tres cepas el área de las lesiones comenzó a reducirse tras una latencia de 12 h tras su realización (figura 35). A partir de ese momento, el proceso de cicatrización comenzó a desarrollarse de manera distinta en las diferentes cepas y en función del sexo de los animales.

En las cepas WT y α CGRP-KO las lesiones realizadas en animales de ambos sexos redujeron su área a partir de ese momento de un modo similar (figura 36 A y C). Sin embargo, en las hembras WT las lesiones tendieron a recidivar a partir de las 60 h (figura 36 A). Por su parte, en los animales Tac1-KO las lesiones tendieron a reducirse también, pero con una cinética mucho menor que en los otros dos grupos (figura 36 B), sin diferencias entre ambos sexos. Sin embargo, al comparar el área media de las lesiones entre animales del mismo sexo de las distintas cepas (figura 36 D y E), pudo observarse que el área media de las lesiones realizadas en las córneas de las hembras Tac1-KO fue mayor que las de las otras dos cepas a lo largo de todo el periodo de estudio (figura 36 E). Este factor fue determinante para explicar que el área media del conjunto global de los animales Tac1-KO fuese significativamente mayor que la de las restantes cepas a las 24, 60 y 72 h tras la lesión (figura 36 F).

El ajuste individual de los datos de los animales de las distintas cepas y sexos al modelo propuesto mostró que en las hembras de las cepas WT y Tac1-KO la variabilidad en el proceso de cicatrización era mayor que en las hembras α CGRP-KO (figura 37). Del mismo modo, en ambos sexos de animales Tac1-KO la dispersión en el proceso de cicatrización fue mayor que en los animales del resto de las cepas (figura 37, B y E). La figura 38 muestra el ajuste global de cada serie de datos al modelo propuesto. Las bondades del ajuste para cada cepa y sexo fueron las siguientes: WT hembras: $r^2 = 0.639$; WT machos: $r^2 = 0.893$; Tac1-KO hembras: $r^2 = 0.238$; Tac1-KO machos: $r^2 = 0.333$; α CGRP-KO hembras: $r^2 = 0.812$; α CGRP-KO machos: $r^2 = 0.793$. En el ajuste global de los datos de cada cepa al modelo, independientemente del sexo de animal (figura 38, E) las bondades de ajuste fueron de $r^2 = 0.723$ (WT), 0.300 (Tac1-KO), y 0.793 (α CGRP-KO). La comparación estadística de los parámetros que definían cada una de las curvas de ajuste global entre cepas mostró una tendencia a que el área mínima fuese mayor en el grupo Tac1-KO en comparación con los otros dos grupos: 36.7 ± 7.0 % área inicial, vs. 15.1 ± 8.2 (WT) y 17.6 ± 4.8 (α CGRP-KO), $p = 0.068$, ANOVA unifactorial.

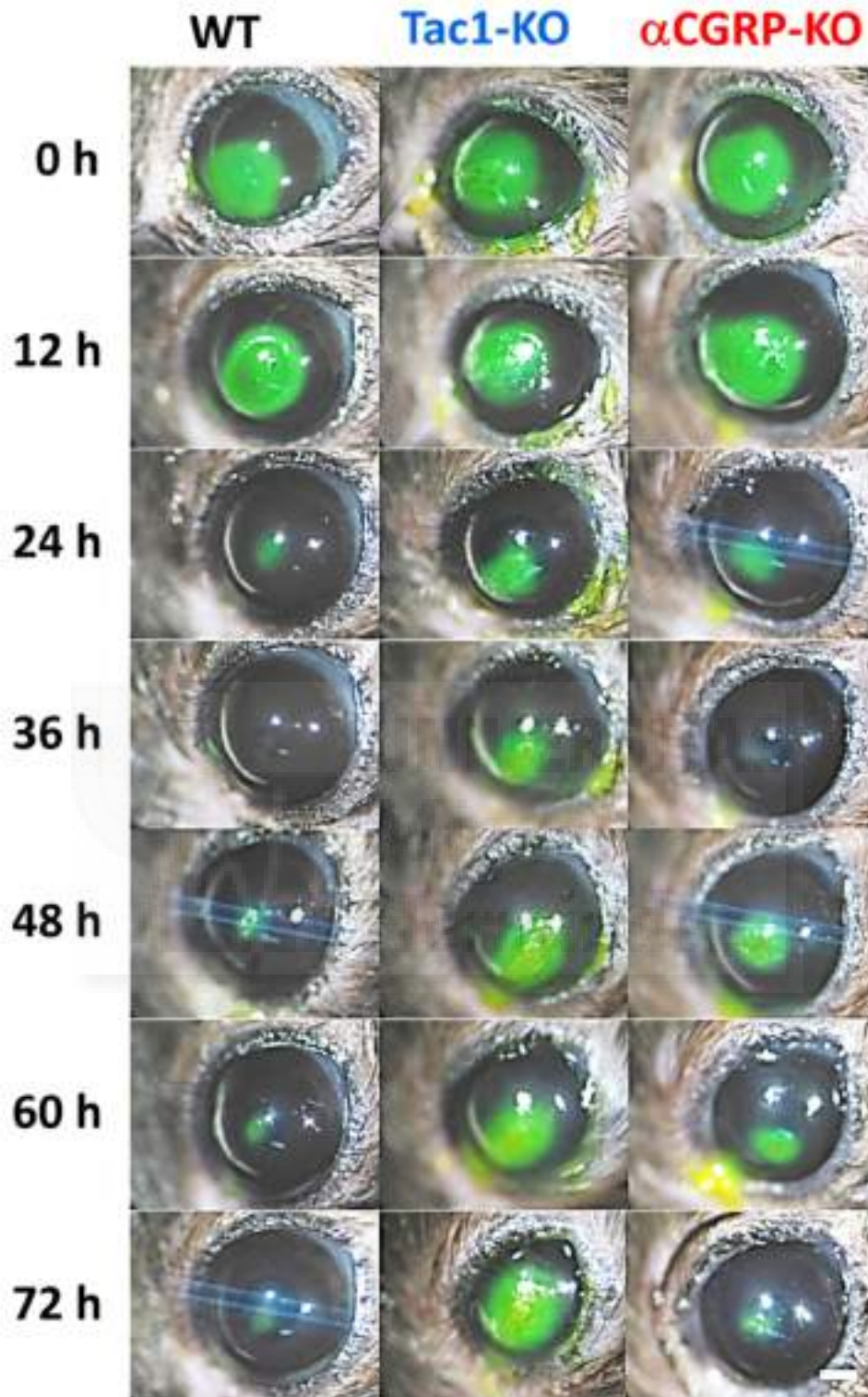


Figura 35. Cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo*.

Ejemplos representativos de la evolución del área de las lesiones epiteliales de la córnea, realizadas con n-heptanol, en las tres cepas estudiadas. En los animales WT la cicatrización epitelial ocurrió entre las primeras 24-36 horas tras la lesión, mientras que en los animales Tac1-KO las lesiones fueron mucho más persistentes, especialmente en las hembras. Del mismo modo, en los animales α CGRP-KO las lesiones tendieron a curar en las primeras 24-36 horas, pero ocasionalmente recidivaron con posterioridad.

La figura 39 muestra el ajuste a una función de Weibull de los diferentes conjuntos de datos. Los animales WT tendieron a alcanzar su v_{\max} de manera más temprana, tanto al considerarlos por sexos (figura 39, D y E), como al considerarlos en su conjunto (figura 39, F). El ajuste de los datos globales por cepa a dicha función mostró bondades de ajuste de $r^2 = 0.631, 0.210$ y 0.626 para los WT, Tac1-KO y α CGRP-KO, respectivamente. Para los WT, la v_{\max} fue de -9.6 ± 7.7 % del área inicial $\cdot h^{-1}$, y se alcanzó a una t_{\max} de 21.3 ± 2.5 h. Por su parte, para los Tac1-KO, la v_{\max} fue de -3.4 ± 3.5 % del área inicial $\cdot h^{-1}$, y se alcanzó a una t_{\max} de 28.8 ± 9.3 h. Por último, para los CGRP-KO, la v_{\max} fue de -6.3 ± 21.9 % del área inicial $\cdot h^{-1}$, y se alcanzó a una t_{\max} de 27.6 ± 30.5 h.

El estudio de la cinética de la fase lineal de la cicatrización no encontró diferencias entre las distintas cepas estudiadas en la velocidad de reducción de área de las lesiones, ni al compararlas entre sí de manera global, ni al separar a los animales por sexo (figura 40). Tampoco pudieron encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los animales de distinto sexo dentro de cada cepa. El tiempo estimado de cicatrización mostró una tendencia no significativa a ser mayor en los animales Tac1-KO (figura 40, D-F).



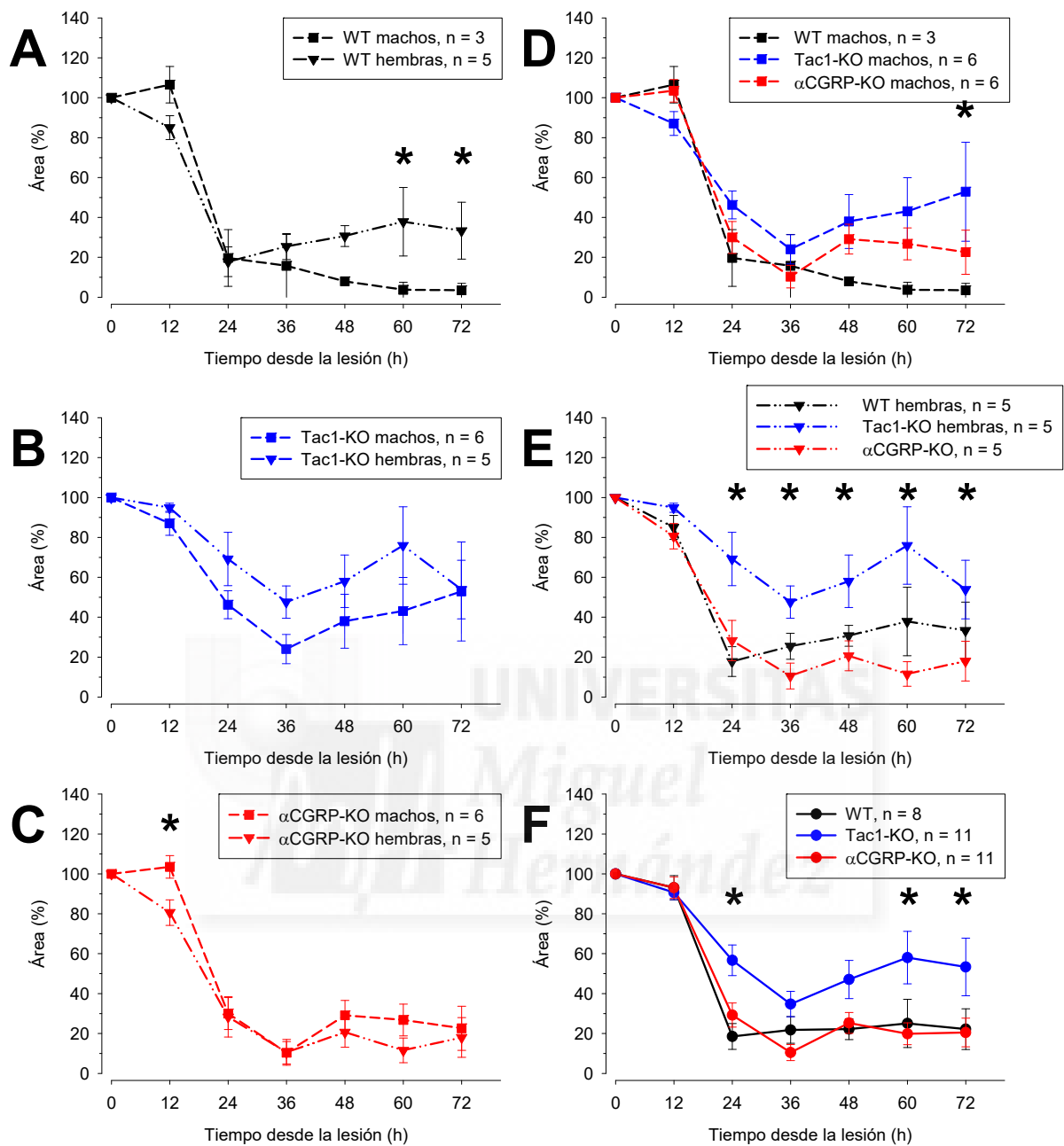


Figura 36. Evolución del área de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo* en animales Tac1-KO, α CGRP-KO y sus controles.

A: Evolución del área de las lesiones a lo largo del periodo de estudio en los animales WT, en función de su sexo; * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas. B: ídem, en los animales Tac1-KO. C: ídem, en los animales CGRP-KO; * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas. D: Evolución del área de las lesiones en los machos de las distintas cepas; * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas, Tac1-KO vs el resto. E: ídem, en las hembras de las distintas cepas; * $p < 0.05$ ANOVA bifactorial de medidas repetidas, Tac1-KO vs. el resto a las 24 y 60 h, y vs. los α CGRP-KO a las 24, 36 y 72 h. F: evolución del área media de las lesiones en las diferentes cepas a lo largo del tiempo; * $p < 0.05$ ANOVA bifactorial de medidas repetidas, Tac1-KO vs. el resto.

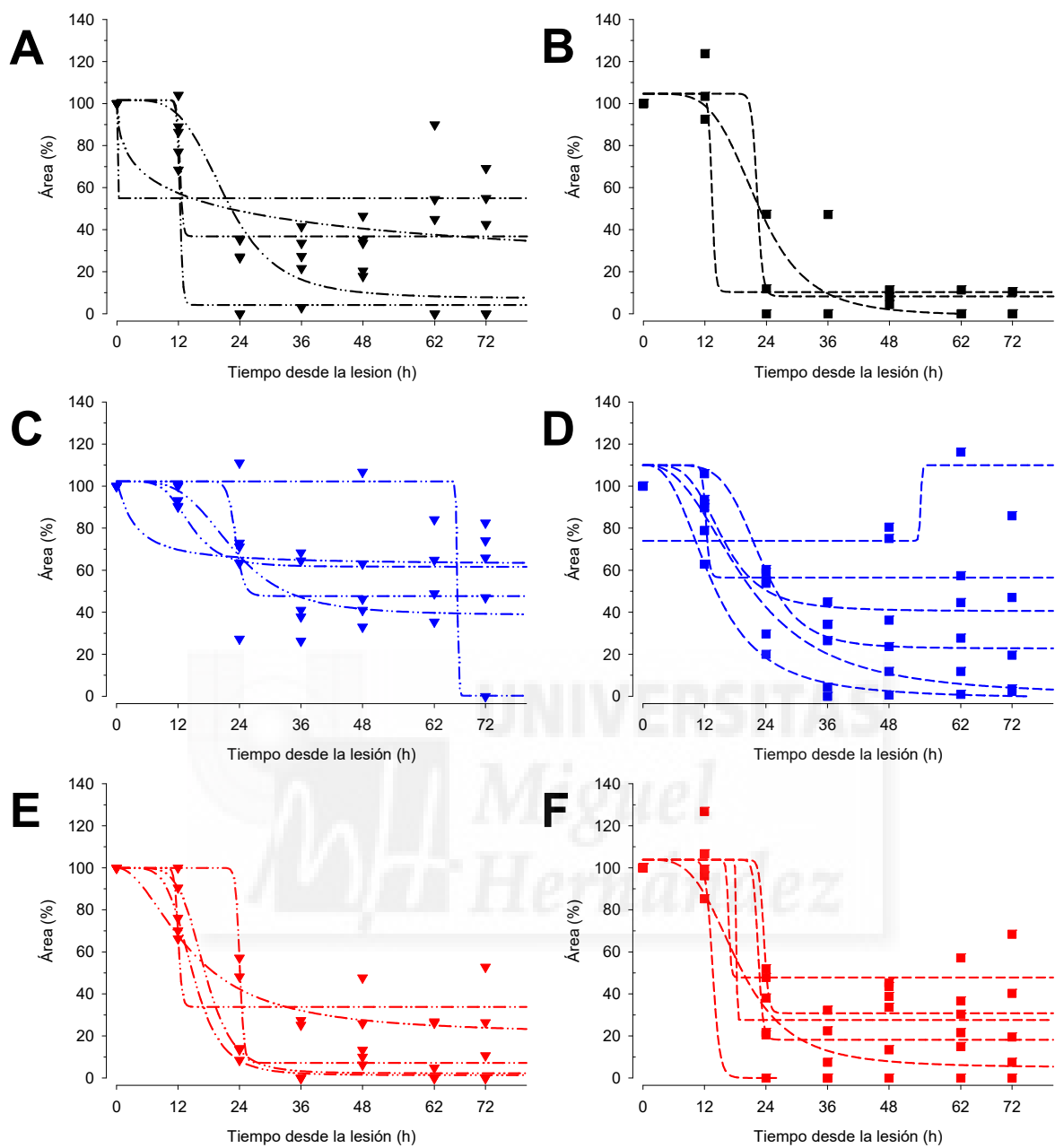


Figura 37. Ajuste individual de la cinética del proceso de cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo* al modelo propuesto, en función del sexo de los animales estudiados.

A: ajuste individual de las series de datos de las hembras WT al modelo propuesto. B: ajuste individual de las series de datos de los machos WT al modelo propuesto. C y D: ídem a A y B, pero en los animales Tac1-KO; E y F: ídem a A y B, pero en los animales α CGRP-KO. Los triángulos y las líneas punteadas representan a las hembras, mientras que los cuadrados y las líneas discontinuas representan a los machos.

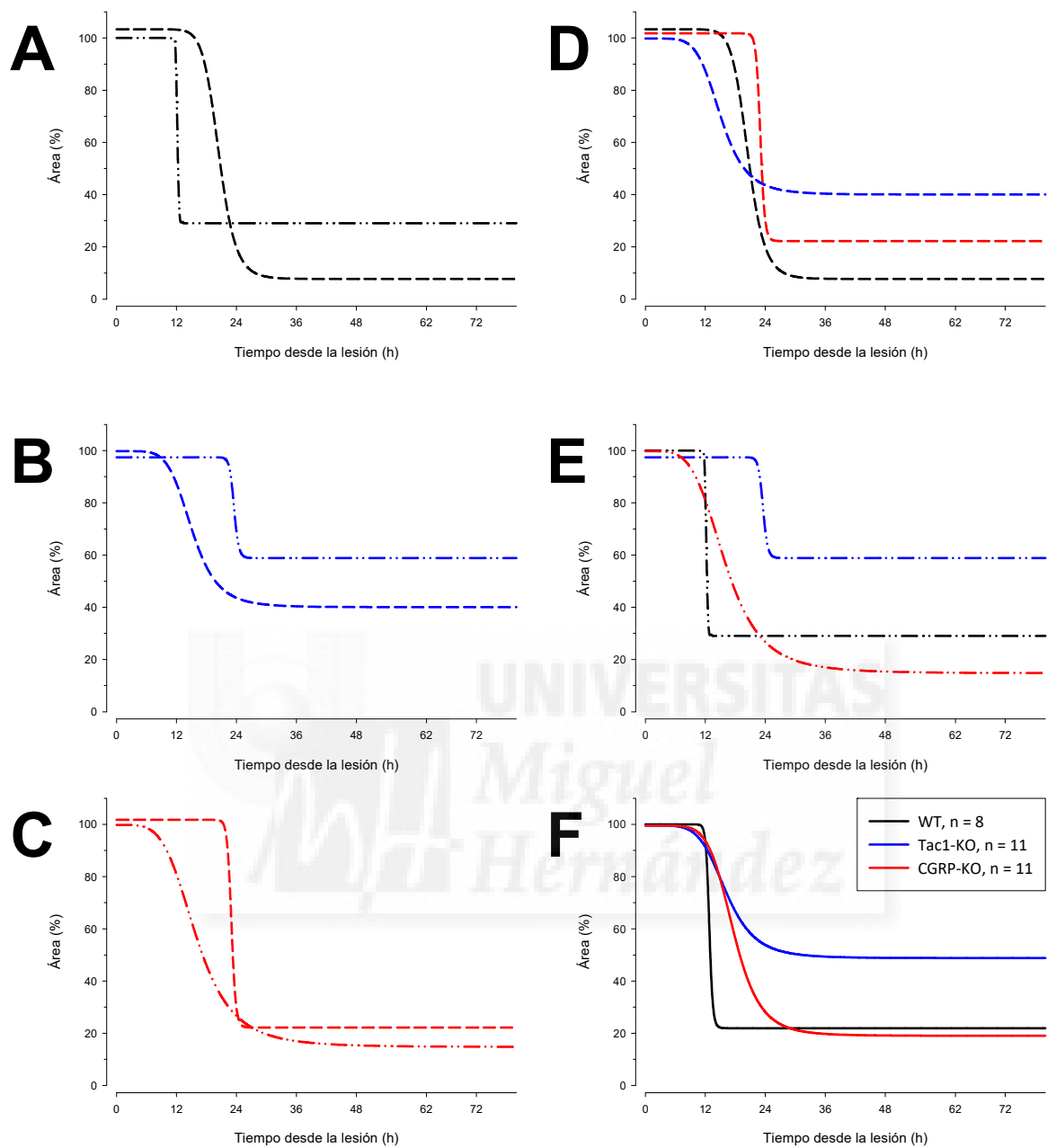


Figura 38. Ajuste global de la cinética del proceso de cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo* al modelo propuesto, en función del sexo de los animales estudiados.

A: ajuste global en machos (líneas rayadas, $n = 3$) y hembras (líneas rayadas y punteadas, $n = 5$) WT. B y C: ídem, pero en los animales Tac1-KO y CGRP-KO, respectivamente ($n = 5$ machos y 6 hembras, en cada caso). D: comparación de las funciones de ajuste de los machos de las distintas cepas entre sí. E: ídem, pero de las hembras. F: comparación de las funciones de ajuste globales para cada cepa, incluyendo a los animales de ambas cepas. Las líneas rayadas representan datos obtenidos de los machos, mientras que las punteadas, datos obtenidos de hembras.

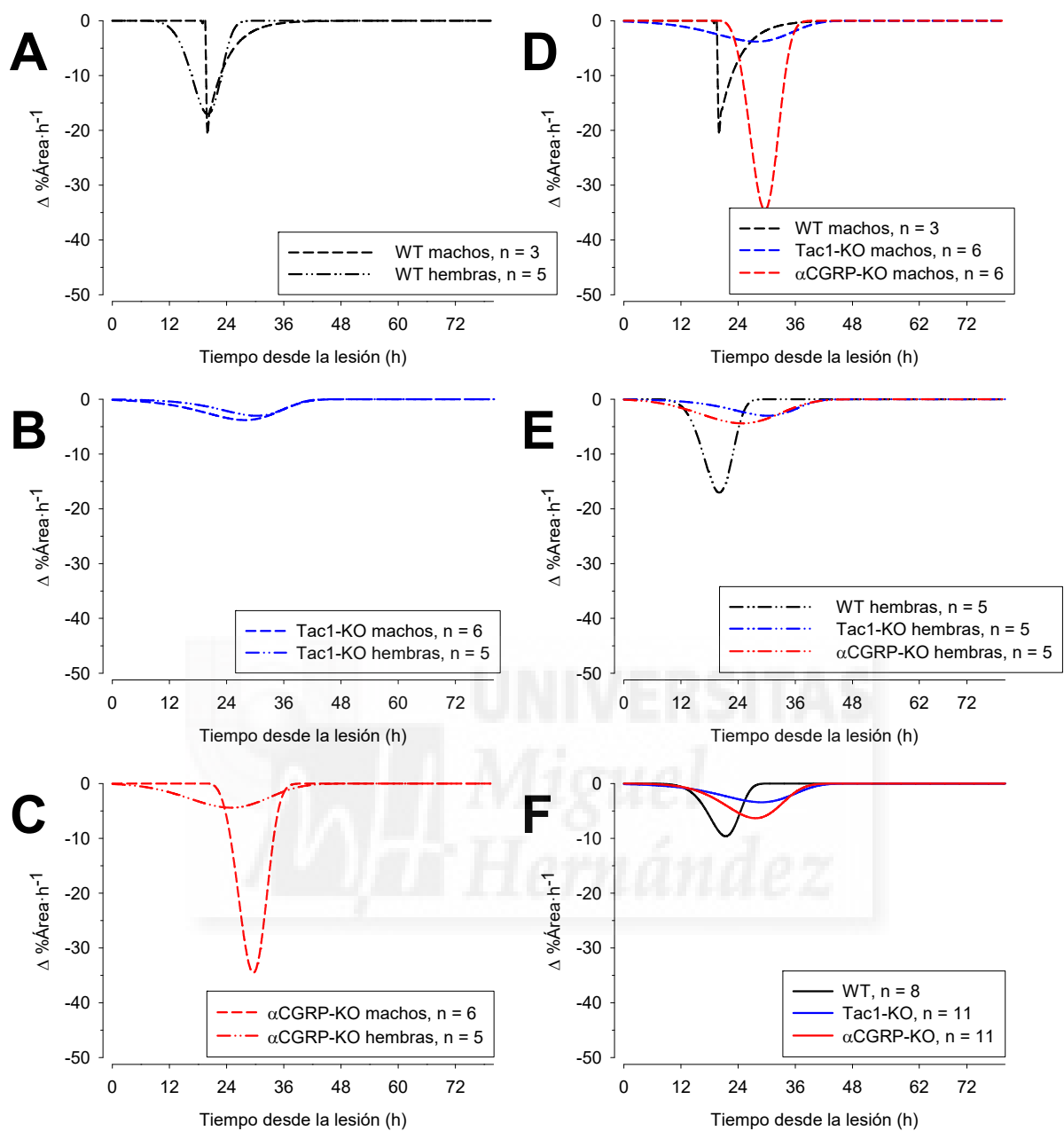


Figura 39. Determinación de v_{max} y t_{max} durante la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo*, en las distintas cepas.

A: Comparación de v_{max} y t_{max} entre machos y hembras WT. B y C: ídem, pero en animales Tac1-KO y αCGRP-KO, respectivamente. D: comparación de v_{max} y t_{max} en los machos de las tres cepas estudiadas. E: ídem, pero en las hembras. F: v_{max} y t_{max} entre cepas, incluyendo los animales de ambos sexos.

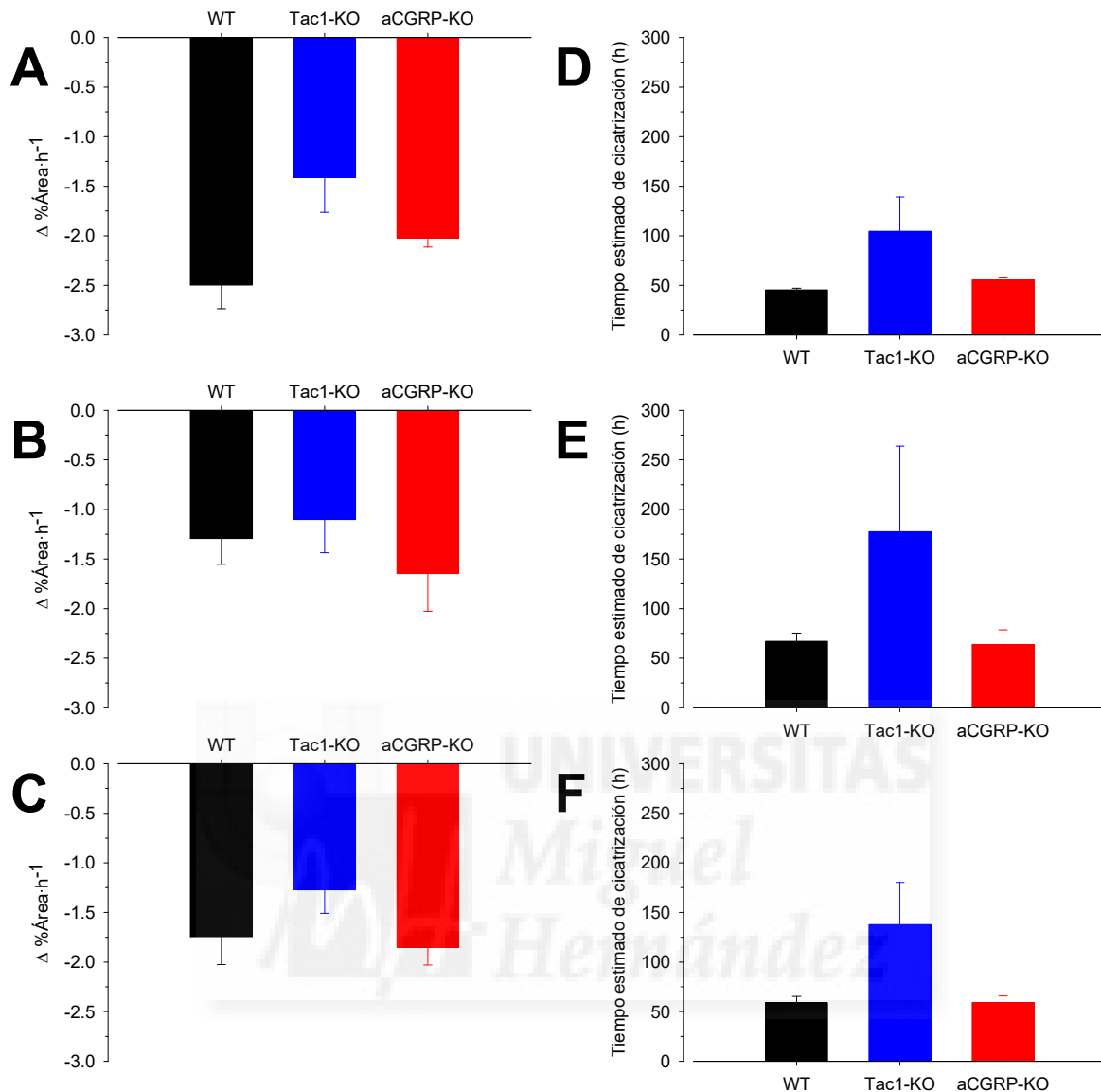


Figura 40. Velocidad de reducción del área y tiempo estimado de cicatrización durante la fase lineal de la curación de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo* en los animales Tac1-KO, $\alpha\text{CGRP-KO}$ y sus controles.

A: velocidad de reducción del área de las lesiones durante la fase lineal, en los animales macho de cada cepa. B: ídem, pero en los animales hembra de cada cepa. C: ídem, tomando todos los animales de cada cepa en conjunto. D: tiempo estimado de cicatrización durante la fase lineal, en los animales macho de cada cepa. E: ídem, pero en las hembras de cada cepa. F: ídem, tomando todos los animales de cada cepa en conjunto. No se observaron diferencias significativas en ninguna de estas variables ni entre cepas, ni entre sexos dentro de cada cepa (ANOVA bifactorial).

4.8 Cicatrización epitelial de la córnea en ratones NK1-KO.

En un experimento se comparó la cicatrización corneal en ratones hembra de la cepa carente de la expresión del receptor de la sustancia P (NK1-KO), con la de ratones WT. Las lesiones se realizaron de manera bilateral y en las figuras y para los cálculos se utilizaron los datos de sendos ojos de cada animal. Inicialmente el experimento tuvo un diseño pareado, pero dos de los animales NK1-KO murieron entre las 24 y las 36 horas de seguimiento, por lo que sus datos se excluyeron de los análisis. En los animales fallecidos no se observaron modificaciones del tamaño del área de sus lesiones a lo largo del periodo en que pudieron ser estudiados.

Tanto en las hembras NK1-KO como en sus controles la cicatrización siguió un patrón comparable (figura 41), y se pudo ajustar a una función cuatrimétrica, aunque en los animales NK1-KO se observó más variabilidad en el proceso que en los WT. Las curvas de ajuste global de los datos (figura 41, paneles B, D y E) presentaron los siguientes parámetros: WT: $\min = 5.4 \pm 4.7\% \text{ área} \cdot \text{h}^{-1}$, $\max = 99.5 \pm 3.7\% \text{ área} \cdot \text{h}^{-1}$, $t_{50} = 20.4 \pm 1.2 \text{ h}$, coeficiente de Hill = -4.1 ± 0.8 , $r^2 = 0.912$; NK1-KO: $\min = 10.1 \pm 17.7\% \text{ área} \cdot \text{h}^{-1}$, $\max = 100.2 \pm 8.9\% \text{ área} \cdot \text{h}^{-1}$, $t_{50} = 22.5 \pm 4.1 \text{ h}$, coeficiente de Hill = -3.4 ± 2.1 , $r^2 = 0.695$. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros al compararlos entre cepas con la t de Student.

Por su parte, el ajuste global de los datos de cada cepa a una función de Weibull (figura 42), permitió obtener una v_{\max} de $-4.3 \pm 0.5\% \text{ área} \cdot \text{h}^{-1}$ en los animales WT y de $-3.6 \pm 2.3\% \text{ área} \cdot \text{h}^{-1}$ en los animales NK1-KO, así como un t_{\max} de $26.1 \pm 3.1 \text{ h}$ en los animales WT y de $20.8 \pm 22.5 \text{ h}$ en los animales NK1-KO. Aunque no se observaron diferencias en dichos valores entre cepas (t de Student), los datos de los animales WT ajustaron al modelo con una $r^2 = 0.665$, mientras que los de los animales NK1-KO lo hicieron con una $r^2 = 0.141$. Del mismo modo, no se observaron diferencias en la velocidad de cicatrización ni en el tiempo estimado de cicatrización de ambas cepas, durante la fase lineal del proceso (figura 43), aunque esta última tendió a ser mayor en los animales NK1-KO.

Por último, se comparó el proceso de cicatrización de los animales Tac1-KO con el de los NK1-KO. Se tomaron los datos de las hembras Tac1-KO y sus controles, y los de las hembras NK1-KO y sus controles (figuras 36 E y 41 F), y se compararon entre sí mediante un ANOVA bifactorial de medidas repetidas. No se encontraron diferencias en el área media de las lesiones a los distintos tiempos estudiados entre los animales de los grupos WT de ambos experimentos. Del mismo modo, exceptuando el dato a las 48 tras la lesión (figura 44), no se encontraron diferencias en el área media de ambas cepas de animales KO.

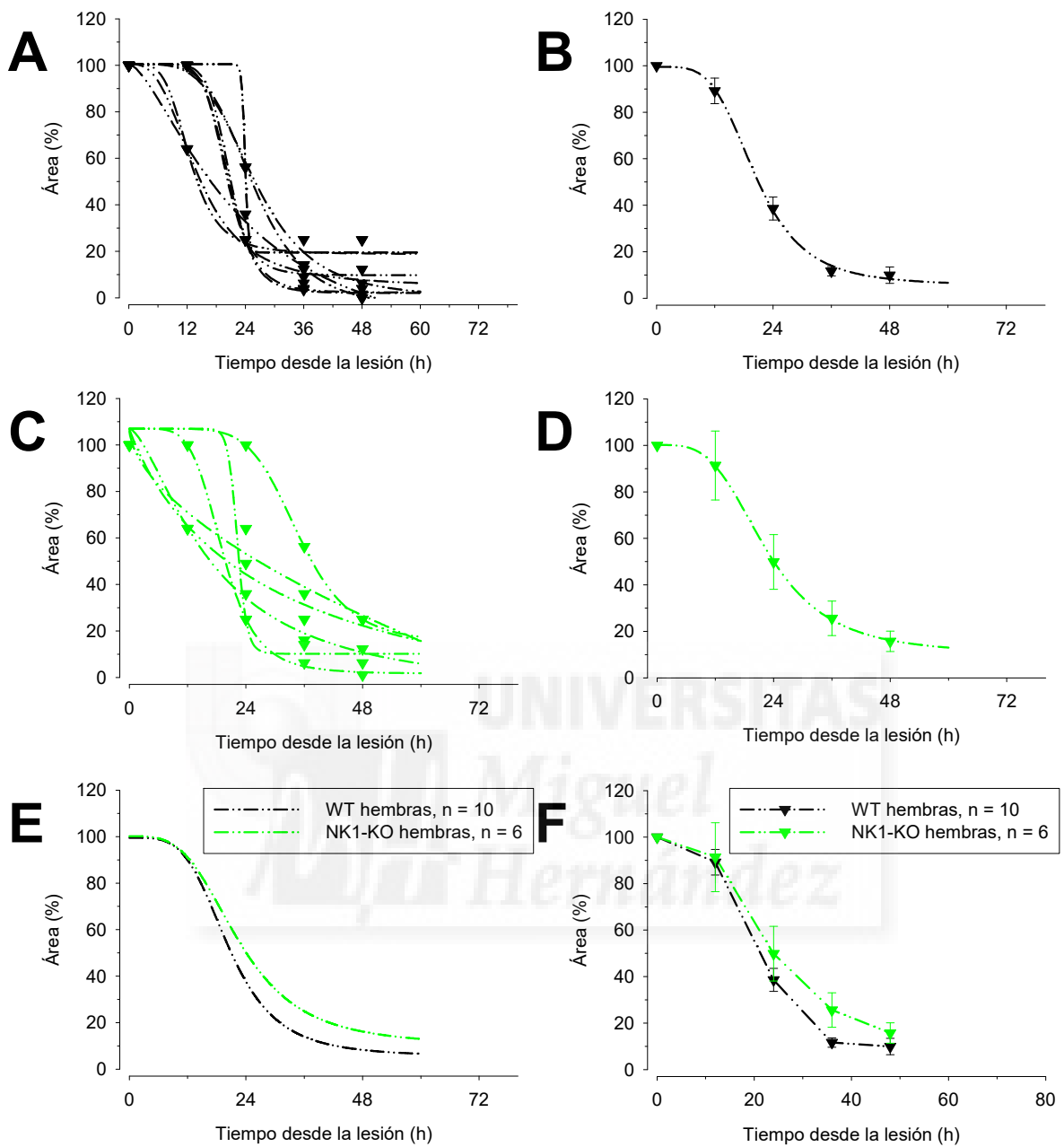


Figura 41. Cinética de la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo* en hembras NK1-KO y sus controles.

A: Ajuste individual de los datos de los animales WT a la función propuesta. B: ajuste global de los datos de los animales WT a la función propuesta. Los puntos representan la media \pm error estándar de la media. C y D: ídem, pero con los datos de los animales NK1-KO. E: comparación de las curvas de ajuste para cada cepa, mostradas en los paneles B y D. F: representación de los valores del área (media \pm error estándar de la media) a los tiempos indicados. Los triángulos y las líneas punteadas indican que los animales utilizados era hembras. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cepas.

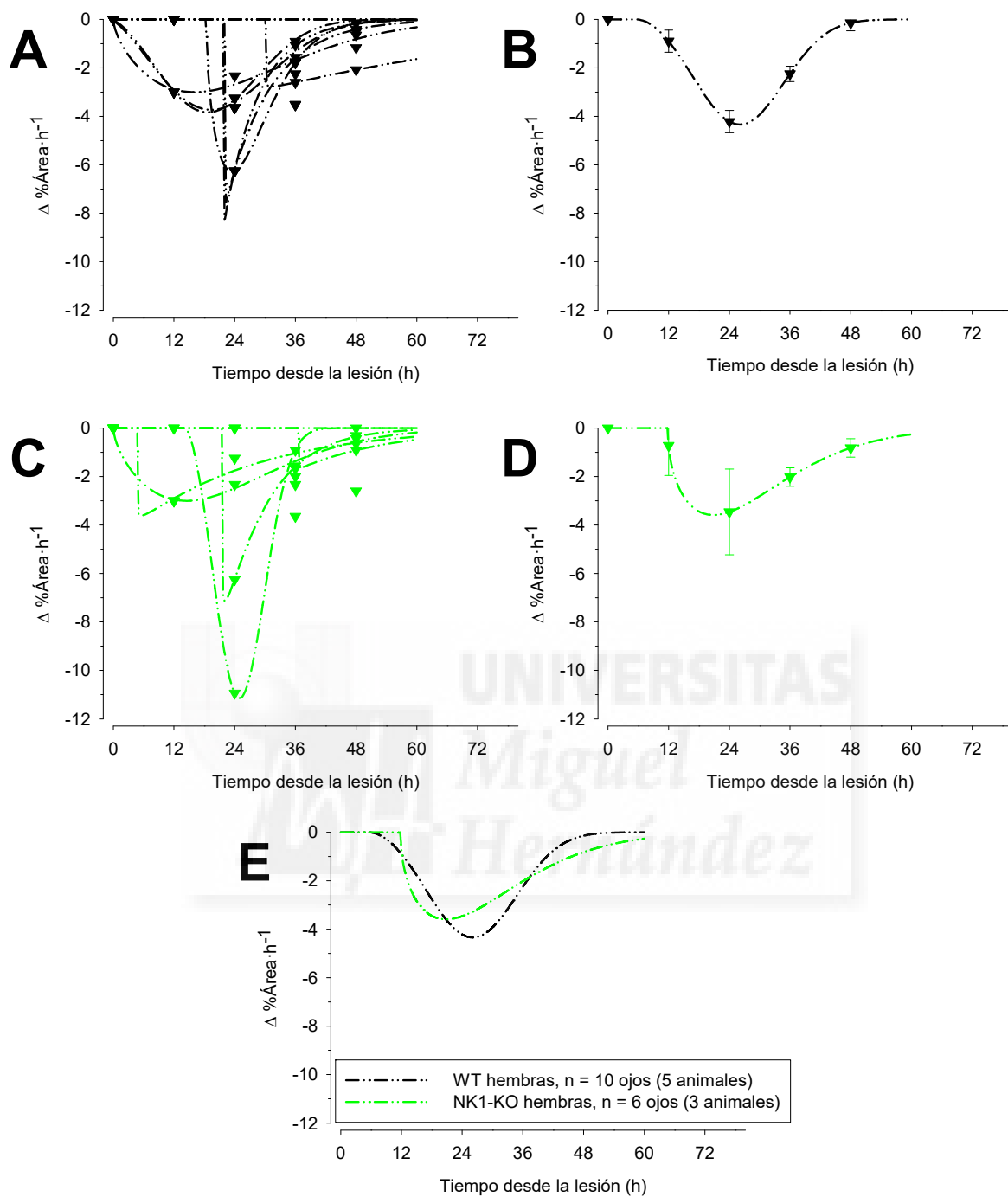


Figura 42. Determinación de v_{\max} y t_{\max} durante la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo*, en los animales NK1-KO y sus controles.

A: ajuste individual de las series de datos de los ratones WT a una función de Weibull. B: ajuste global de los datos de todos los animales WT a dicha función. C y D: ídem a A y B, pero referido a los animales NK1-KO. E: comparación de las funciones de ajuste de ambas cepas. Los triángulos y las líneas punteadas indican que los animales eran hembras. En los paneles B y D se representa la media \pm error estándar de la media.

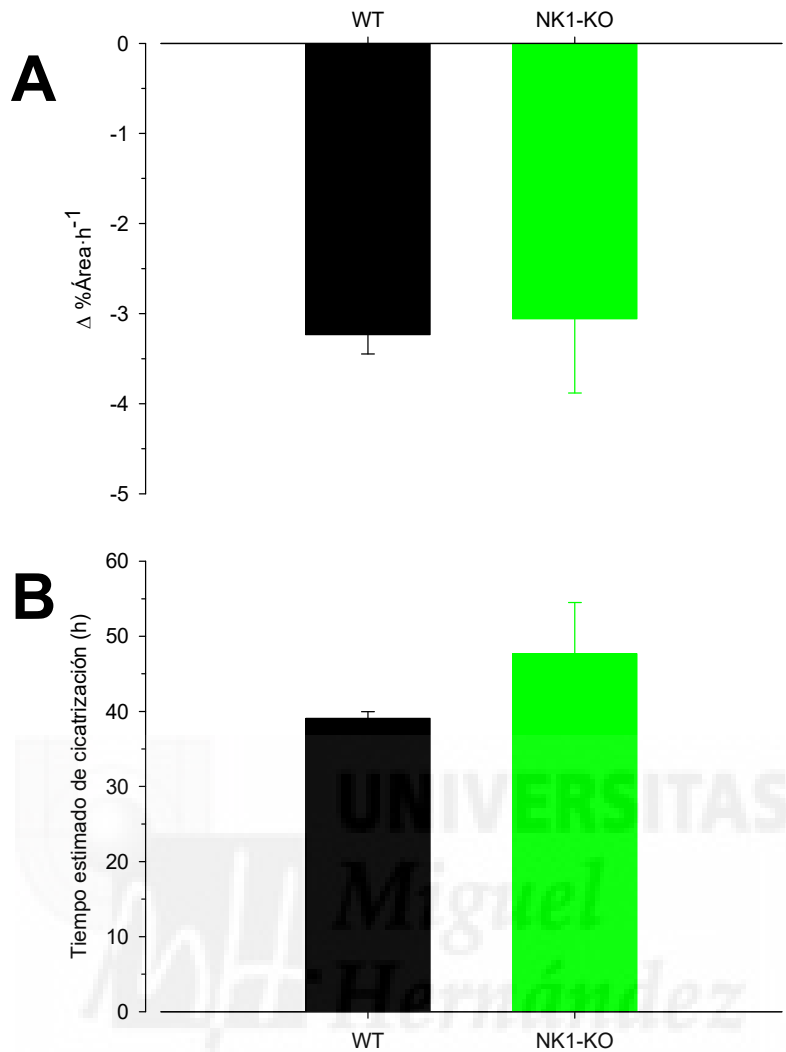


Figura 43. Velocidad de reducción del área y tiempo estimado de cicatrización durante la fase lineal de la curación de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo* en los animales NK1-KO y sus controles.

A: velocidad de reducción del área de las lesiones durante la fase lineal de la cicatrización. B: Tiempo estimado de cicatrización. No se encontraron diferencias entre cepas (ANOVA unifactorial). Las columnas representan la media \pm error estándar de la media.

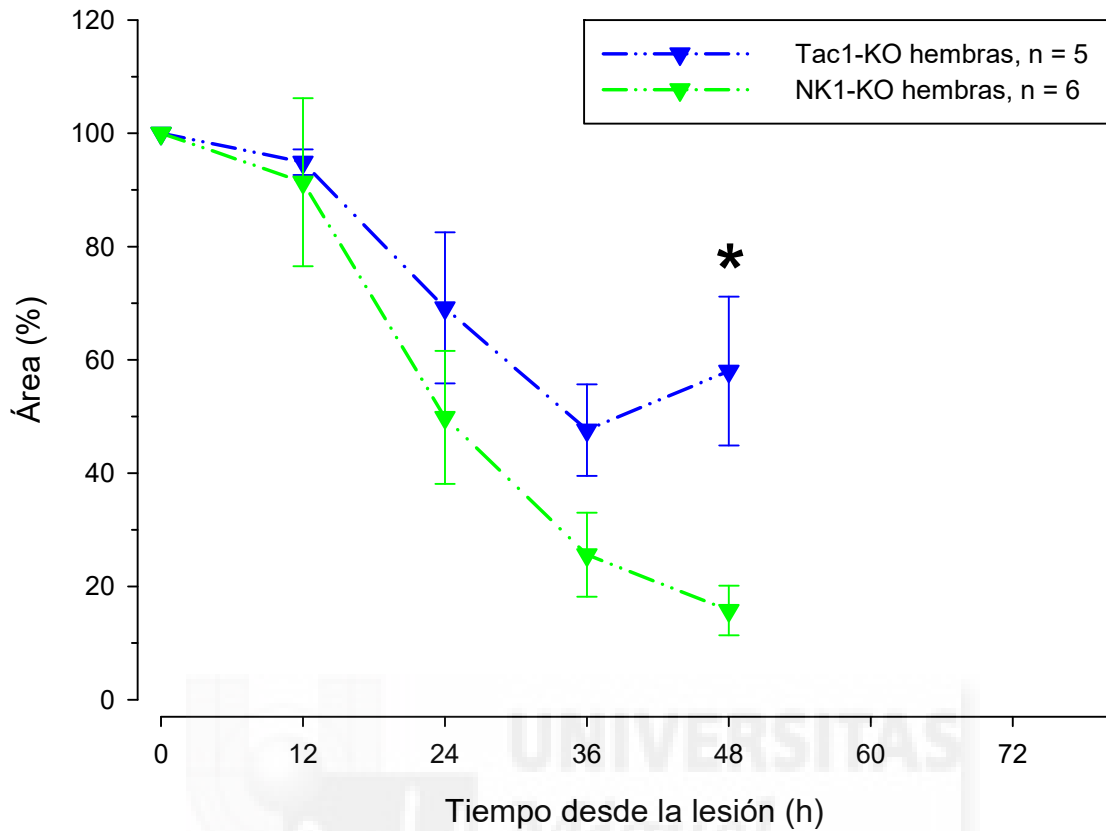


Figura 44. Comparación de la cicatrización de lesiones experimentales del epitelio corneal *in vivo*, en hembras Tac1-KO y NK1-KO.

La cicatrización del epitelio corneal en hembras Tac1-KO y NK1-KO siguió una cinética similar en las primeras 36 horas. A partir de ese momento, el tamaño de las lesiones comenzó a incrementarse en los animales Tac1-KO, mientras que no lo hizo en los animales NK1-KO. Los datos son los mismos que los mostrados en las figuras 36 E, y 41 F para los animales Tac1-KO y NK1-KO, respectivamente. * $p < 0.05$ ANOVA bifactorial de medidas repetidas.

4.9 Efecto del CGRP sobre la cicatrización de lesiones epiteliales de la córnea en ratones α CGRP-KO.

La administración unilateral de α CGRP $1.3 \cdot 10^{-10}$ M cada tres horas tras la realización de lesiones experimentales del epitelio corneal retrasó la cicatrización en los ojos que recibieron dicho tratamiento respecto a los contralaterales, que recibieron BSS, tanto en hembras como en machos WT (figura 45, A y B). En el caso de las hembras α CGRP-KO, la cicatrización siguió un patrón muy heterogéneo, tanto en los ojos que recibieron el tratamiento con el neuropéptido, como en los contralaterales (figura 45, C). En los ojos que recibieron el α CGRP el área a las 24, 36 y 48 horas tras la lesión fue mayor que en los contralaterales. En el caso de los machos α CGRP-KO, no se observaron diferencias en el área media a diferentes tiempos tras la lesión en los ojos tratados respecto a los contralaterales (figura 45, D).

Por su parte, al analizar el efecto de cada tratamiento sobre animales de distinta cepa, se pudo observar que el área de las lesiones realizadas en los ojos de las hembras α CGRP-KO tratadas con el vehículo tendió a ser mayor que las de las hembras WT a lo largo de todo el periodo estudiado, alcanzando diferencia estadística a partir de las 60 h tras la lesión (figura 46, A). Un efecto similar pudo observarse en el caso de los machos de ambas cepas (figura 46, B). Por su parte, en las córneas de las hembras α CGRP-KO tratadas con α CGRP el área tendió a ser mayor que en las de las WT, alcanzando diferencia estadística a las 72 h tras la lesión (figura 46, C). No se observaron diferencias en el área media de las lesiones realizadas en los ojos tratados con el péptido entre los machos de ambas cepas (figura 46, D).

La administración del péptido produjo una aparente opacificación corneal en los ojos de los animales WT que lo recibieron, en comparación con los contralaterales (figura 47, A y B). Por su parte, en los animales α CGRP-KO se desarrolló una opacificación corneal en ambos ojos, que tendió a ser mayor en los ojos tratados con el α CGRP, en comparación con los ojos contralaterales (figura 47, C y D). La opacificación desarrollada en los ojos tratados con el vehículo tendió a ser mayor en los animales α CGRP-KO, en comparación con los WT (figura 48, A y B).

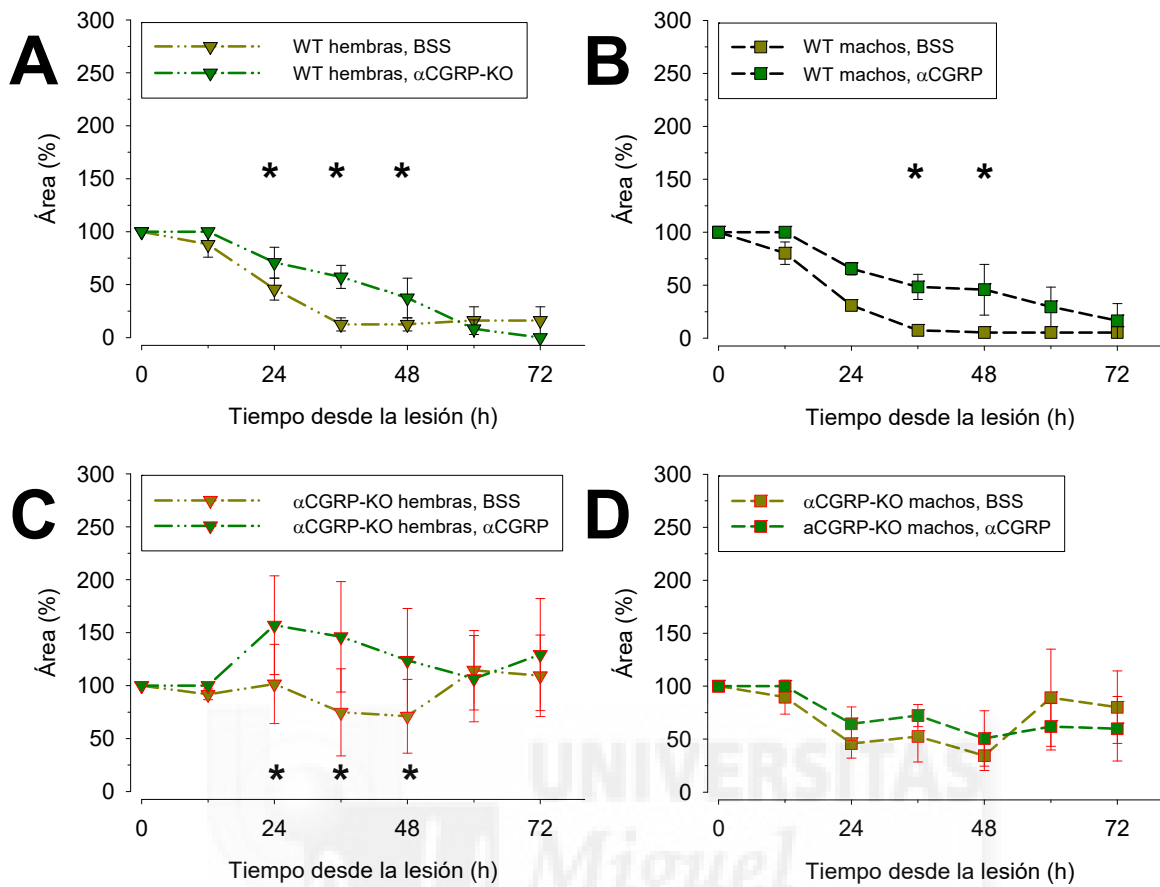


Figura 45.- Efecto del α CGRP sobre la cicatrización epitelial: comparación intra-grupo.

A: Evolución del área de las lesiones realizadas en el lado tratado con α CGRP $1.3 \cdot 10^{-10}$ M y en el contralateral, en hembras WT. B: ídem, pero en machos WT. C y D: ídem a A y B, pero en hembras y machos α CGRP-KO, respectivamente. * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas, lado tratado vs. lado contralateral para el tiempo indicado; $n = 6$ y 8 , WT y KO, respectivamente.

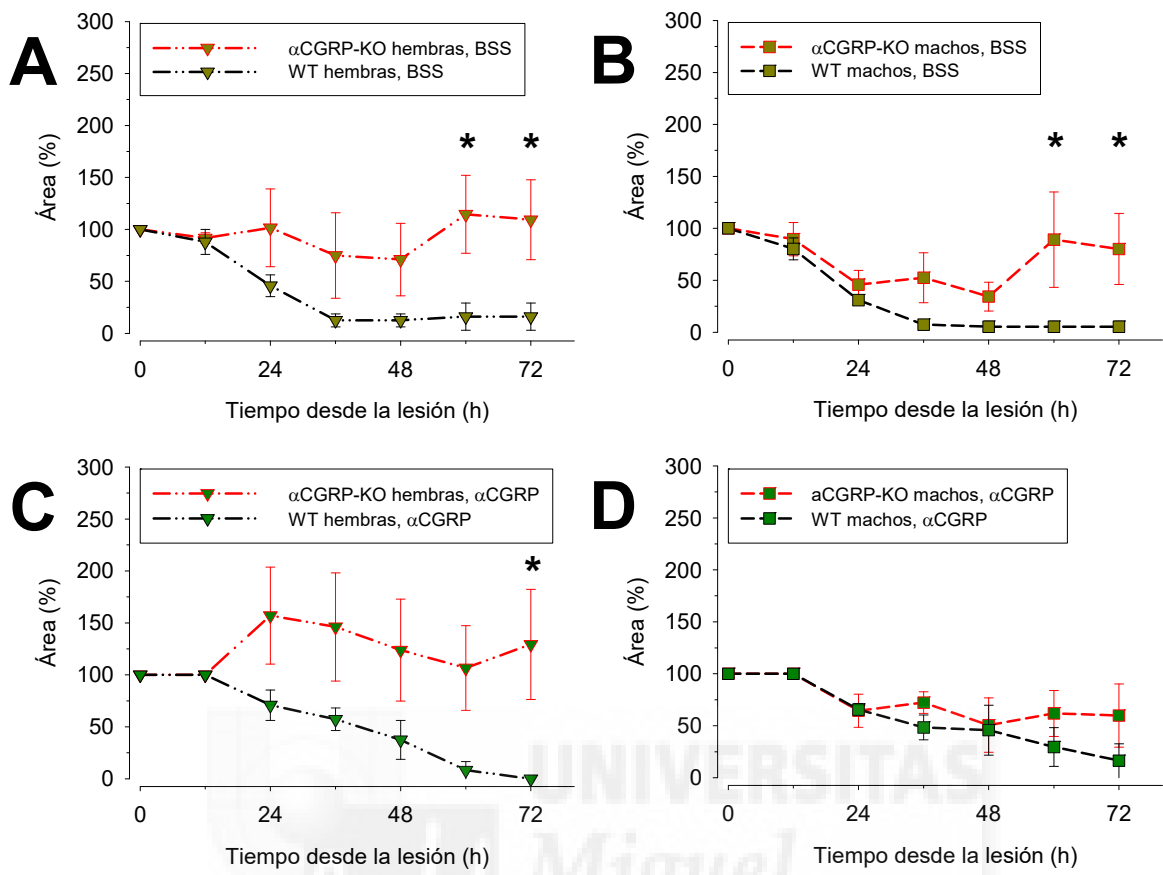


Figura 46.- Efecto del α CGRP sobre la cicatrización epitelial: comparación entre cepas.

A: Evolución del área de las lesiones realizadas las hembras de ambas cepas tratadas con el vehículo. B: ídem, pero en los machos. C y D: ídem a A y B, pero en el lado tratado con α CGRP $1.3 \cdot 10^{-10}$ M, en hembras y machos, respectivamente. * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas, WT vs. α CGRP-KO para el tiempo indicado; $n = 6$ y 8 , WT y KO, respectivamente.

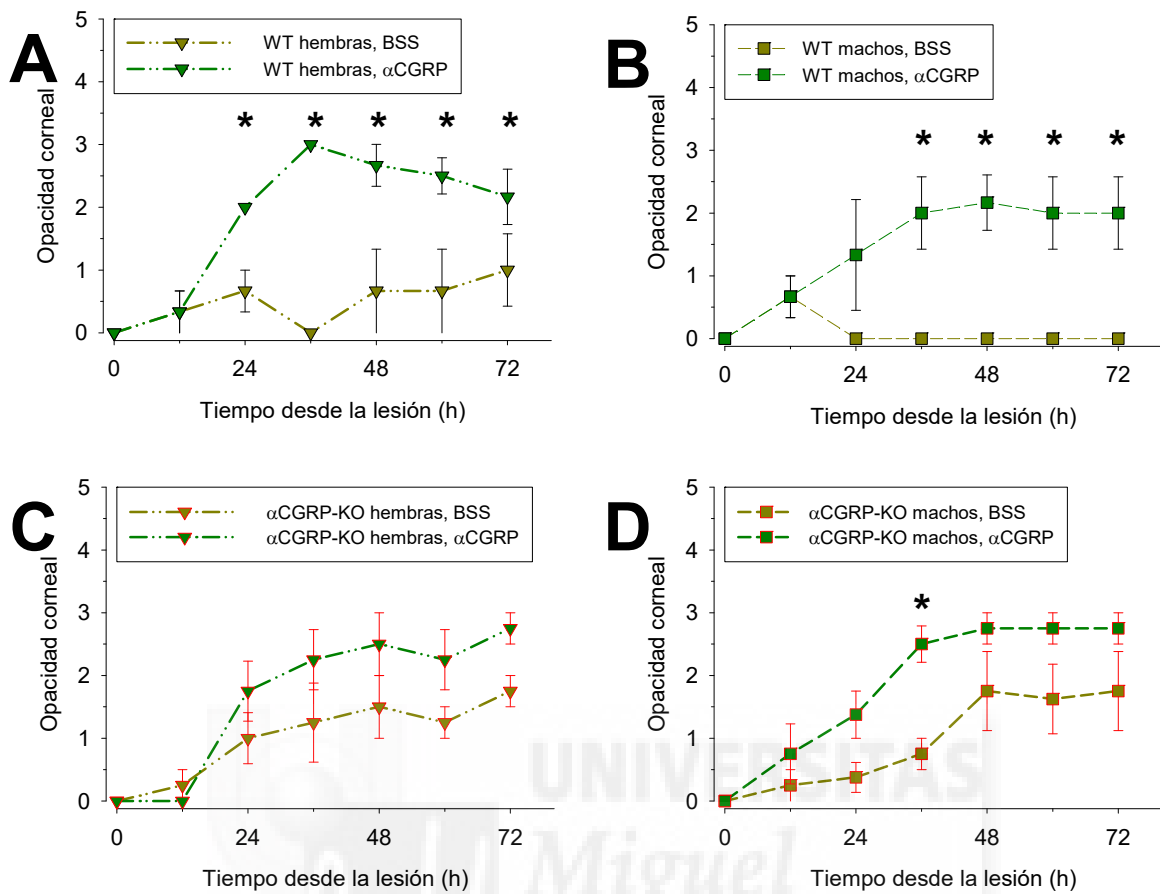


Figura 47.- Efecto del α CGRP sobre la aparición de opacidad corneal: comparación intra-grupo.

A: Evolución de la aparición de opacidad corneal en el lado tratado con α CGRP $1.3 \cdot 10^{-10}$ M y en el contralateral, en hembras WT. B: ídem, pero en machos WT. C y D: ídem a A y B, pero en hembras y machos α CGRP-KO, respectivamente. * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas, lado tratado vs. lado contralateral para el tiempo indicado; $n = 6$ y 8 , WT y KO, respectivamente.

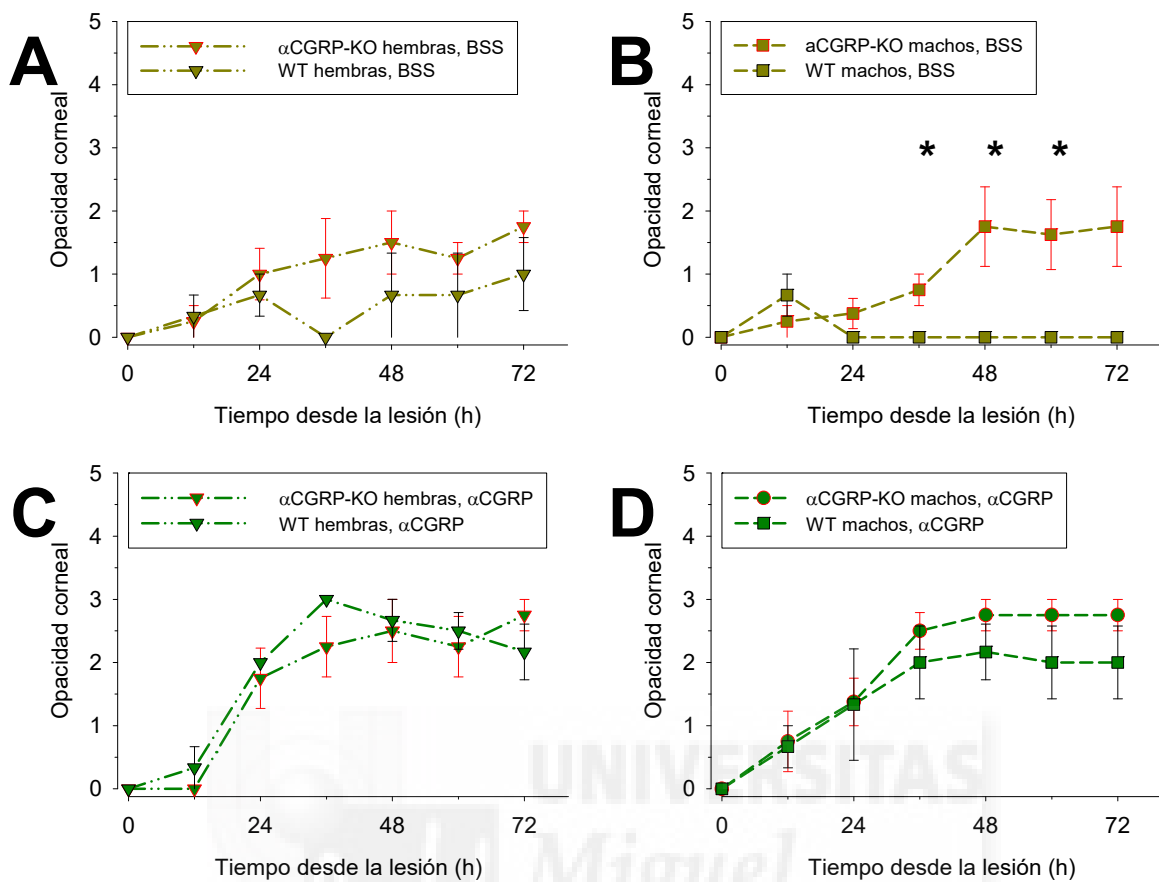


Figura 48.-.- Efecto del α CGRP sobre la opacificación corneal: comparación entre cepas.

A: Evolución de la aparición de opacificación corneal en las hembras de ambas cepas tratadas con el vehículo. B: ídem, pero en los machos. C y D: ídem a A y B, pero en el lado tratado con α CGRP $1.3 \cdot 10^{-10}$ M, en hembras y machos, respectivamente. * $p < 0.05$, ANOVA bifactorial de medidas repetidas, WT vs. α CGRP-KO para el tiempo indicado; $n = 6$ y 8 , WT y KO, respectivamente.

5. DISCUSIÓN

MH Miguel
Hernández



5.2 Ausencia de fenotipo espontáneo en los animales Tac1-KO y α CGRP-KO.

Desde las observaciones iniciales de Magendie se considera que las neuronas del trigémino pueden ejercer algún efecto trófico sobre el epitelio corneal (Georgette, 1983), cuya identidad molecular sigue sin haber sido identificada. Debido a la expresión de los neuropéptidos codificados los genes Tac1 (sustancia P y neuroquinina A) y Calca (α CGRP) en las neuronas sensoriales del trigémino con campo receptor corneal, se ha considerado que los mismos podrían ser candidatos para explicar estos efectos. Por ello, sería esperable que la eliminación de su expresión produjese alteraciones del desarrollo del epitelio corneal en los animales Tac1-KO y α CGRP-KO, en comparación con los animales que expresan dichas moléculas. Sin embargo, en nuestros estudios no se han encontrado diferencias aparentes en el desarrollo de las estructuras oculares de las cepas de ratones carentes de la expresión de estos neuropéptidos, incluyendo el epitelio corneal, lo que sugiere que estas moléculas no juegan un papel relevante durante el desarrollo ocular ni durante el mantenimiento basal de la homeostasis de los tejidos corneales.

Observaciones independientes coinciden en que la ablación de la expresión del gen Tac1 (Barbariga, Fonteyne, et al., 2018) no altera el desarrollo ocular en general, ni el del epitelio corneal, en particular. Sin embargo, en una cepa de animales NK1-KO diferente a la usada en este trabajo, se han descrito algunas modificaciones de la ultraestructura del epitelio corneal, como una mayor densidad de células en el centro de la córnea, con mayor descamación de las mismas en los animales NK1-KO, así como la presencia de células BrdU(+) en el epitelio de estos animales, que no estaban presentes en los animales WT (Gaddipati et al., 2016). Los autores interpretaron estos hallazgos como que la SP favorecía la adhesión de las células epiteliales, por lo que, en su ausencia, estas se descamaban en mayor medida y para mantener la densidad epitelial se estimulaba la proliferación celular desde las células basales de manera compensatoria. En nuestro caso, no se ha estudiado la ultraestructura del epitelio corneal de los ratones NK1-KO. De todos modos, coincidiendo con otros autores (Pal-Ghosh et al., 2008) nosotros hemos podido observar células BrdU(+), tanto en la cepa WT como en las otras dos cepas KO. Asimismo, el número de capas de núcleos teñidos con DAPI pareció similar en las tres cepas. Por ello, aunque no se realizó un estudio histológico sistemático y profundo, estos hallazgos permiten sugerir que la homeostasis de la celularidad epitelial corneal estaba conservada en ambas cepas de KO, en comparación con los animales usados como control, excluyendo, por tanto, un papel de los neuropéptidos SP, NKA y α CGRP en el mantenimiento basal del epitelio corneal.

Hasta el momento, el papel de la eliminación de la expresión constitutiva y selectiva del α CGRP sobre el desarrollo y el mantenimiento basal de los tejidos oculares, incluyendo el epitelio corneal, no se ha descrito en la literatura. Por lo tanto, nuestras observaciones podrían ser consideradas las primeras en este sentido. Como se ha mencionado, en los animales α CGRP-KO no se observaron alteraciones significativas de la estructura ocular, ni del epitelio corneal en particular. Sí llamó la atención, sin embargo, la reducción del número de puntos de penetración de los nervios estromales hacia el plexo subbasal en los animales α CGRP-KO en comparación con las otras dos cepas. Esto podría deberse a la mayor edad de estos animales (7 meses vs. 2 meses en las otras dos cepas), dado que es sabido que se produce una reducción de la densidad de la inervación sensorial corneal durante el proceso de envejecimiento (C. Wang et al., 2012) en el ratón, a partir de los 2 meses de edad. Sin embargo, es de destacar que en nuestro caso se contó, simplemente, el número de puntos de penetración de los nervios del estroma anterior en el plexo subbasal, sin cuantificarse el número de ramas dentro de cada «leash», ni la densidad de terminales nerviosas por unidad de superficie corneal. Por ello, puesto que en los estudios de percepción nociceptiva realizados en los animales α CGRP-KO no se observaron diferencias en la respuesta de estos animales a la capsaicina, en comparación con sus controles, del hallazgo morfológico de que en esta cepa parece existir una menor densidad de puntos de penetración que en otras, no puede extraerse una consecuencia funcional.

Por tanto, de todos estos estudios puede concluirse que la ablación experimental de la expresión de la SP, la NKA y el α CGRP no se asocia a alteraciones estructurales significativas del epitelio corneal, por lo que estas moléculas parecen no tener ningún papel relevante en el desarrollo y el mantenimiento del funcionamiento basal del mismo.

5.3 Ausencia de alteraciones sobre la percepción de estímulos dolorosos.

En nuestros experimentos no se observaron diferencias entre ninguna de las cepas KO y sus correspondientes controles en la respuesta nociceptiva evocada por la administración ocular tópica de capsaicina. Una posible limitación del método de estudio pudo ser que el número de movimientos de rascado se registró simplemente tras su observación directa durante un minuto. Ello impide, por ejemplo, conocer si existe algún patrón temporal en la respuesta dentro de dicha ventana temporal, o analizar más en detalle aspectos de esta (frecuencia máxima, momento a la que esta se alcanza, etc.) que pudieran ser distintos entre cepas. Por ello, en el futuro, sería

conveniente mejorar esta técnica mediante registro videográfico que permita el análisis *off-line* de la respuesta aversiva a la aplicación tópica ocular de capsaicina.

Tanto en los animales Tac-1 KO y α CGRP-KO, como en sus controles, las respuestas nociceptivas correlacionaron bilateralmente, y codificaron la intensidad del estímulo para rangos de concentración de capsaicina entre 1 y $100 \cdot 10^{-6}$ M. Aunque la EC_{50} para los animales α CGRP-KO fue aparentemente menor que para los Tac1-KO y la respuesta máxima fue mayor en estos últimos que en los primeros, dado que estos hallazgos se observaron también para sus correspondientes controles, se considera que la diferencia pudo deberse a alguna variable experimental no controlada, como, por ejemplo, el haber utilizado diferentes stocks de capsaicina en cada uno de los experimentos. Por tanto, no se considera una diferencia real entre ambas cepas de KO. Adicionalmente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras, ni en las cepas KO ni en sus correspondientes controles.

En otros estudios (Barbariga, Rabiolo, et al., 2018) utilizando otra cepa de animales Tac1-KO distinta a la usada en este trabajo, se ha concluido que los animales KO tienen una respuesta nociceptiva ocular reducida. Sin embargo, estos autores utilizaron como estímulo nociceptivo la aplicación de 10 μ L de NaCl 5M. En nuestra experiencia, dicho volumen es excesivo por lo que es posible que tras su aplicación el volumen de líquido no quede restringido a la superficie ocular. Por otro lado, es posible que la solución hiperosmolar esté activando la población de termorreceptores de frío corneal, puesto que el receptor TRPM8 es, también, osmorreceptor (Andres Parra, Gonzalez-Gonzalez, Gallar, & Belmonte, 2014). Como se ha indicado previamente, los neuropéptidos parecen expresarse, fundamentalmente, en neuronas TRPV1(+). Por ello, la capsaicina parece un mejor estímulo para estudiar el papel de los neuropéptidos en la nocicepción corneal que la solución hiperosmótica utilizada en este otro trabajo. Es posible, por tanto, que las diferencias observadas entre nuestros resultados y los de este estudio puedan deberse a la diferente cepa y/o al diferente estímulo nociceptivo usado en cada caso. En todo caso, nuestros resultados parecen coincidir con las observaciones en otras especies, como el conejo (Bynke, Håkanson, & Sundler, 1984), en el cual la respuesta conductual a la capsaicina tópica ocular no disminuyó con la depleción de neuropéptidos inducida por la inyección retrobulbar de capsaicina, mientras que sí lo hizo cuando se aplicaron anestésicos tópicos sobre la superficie ocular.

Un fenómeno que pudo observarse más claramente en ambas cepas de animales KO, aunque también pudo observarse en los animales WT, fue la aparición de una desensibilización de la respuesta a las concentraciones más altas de capsaicina. Como se indica en la metodología,

en la validación de este modelo experimental pudo comprobarse que este comportamiento parece ser atribuible al fondo genético C57BL6 puesto que no se observó en hembras de ratón OF-1. Esta desensibilización pareció ser mayor en los animales α CGRP-KO que en los Tac1-KO. *In vitro* se ha comprobado que hasta un 30% de las neuronas de los ganglios raquídeos expresan receptores funcionales para el α CGRP y que la exposición de las mismas al péptido las despolariza (Segond von Banchet et al., 2002). Del mismo modo, el α CGRP parece necesario para mantener la expresión del receptor para la capsaicina (TRPV1) en la membrana de estas mismas células (Devesa et al., 2014). Sin embargo, no existen en la literatura evidencias de que estos mecanismos tengan una repercusión funcional *in vivo*. Por ello, nuestros resultados podrían ser considerados una primera evidencia de que el α CGRP puede contribuir a mantener el estado funcional de la vía nociceptiva, evitando la desensibilización de esta ante la estimulación repetitiva de los nociceptores polimodales. De ser así, nuestros resultados también sugieren un papel para los neuropéptidos codificados en el gen Tac1 en este proceso. De todos modos, no pueden excluirse otras hipótesis, como que las manipulaciones e inmovilizaciones repetidas del animal cada vez que se le había de aplicar la capsaicina pudieran haber contribuido a generar un cierto grado de analgesia inducida por estrés (Butler & Finn, 2009). De confirmarse este hecho, la desensibilización de la respuesta aversiva a la capsaicina observada en los animales KO podría implicar, por tanto, un papel inhibitorio de los correspondientes neuropéptidos sobre el desarrollo de la analgesia inducida por estrés.

5.4 Ausencia de alteraciones en la producción lacrimal en los animales Tac1-KO y α CGRP-KO.

La comprensión de los mecanismos de control de la producción lacrimal en el ratón es todavía limitada debido a múltiples factores, fundamentalmente de tipo metodológico. Por ejemplo, en el ratón la producción lacrimal se explora habitualmente con el test del hilo de rojo fenol (PRT) aunque en algún trabajo se ha medido el volumen de lágrima producida mediante microcapilares de vidrio (Moore et al., 2000). En los casos en los que se usa el test del hilo de rojo fenol, habitualmente este se mantiene en contacto con el saco conjuntival durante 30 s. Sin embargo, no se han podido localizar estudios de validación que indiquen por qué ese tiempo es el más adecuado para este fin. Cuando se usa este test, generalmente los valores de producción lacrimal se expresan como milímetros de longitud del hilo humedecido, aunque recientemente se han presentado resultados en los que se normaliza este valor en función del peso del animal

(Pham et al., 2018). Para medir la secreción lacrimal los animales suelen estar anestesiados, habitualmente con una mezcla de ketamina y xilacina. Del mismo modo, no se suele indicar si los animales anestesiados están bajo el control homeostático de su temperatura corporal. Este dato es importante, puesto que la anestesia general produce hipotermia y se ha relacionado a los termorreceptores de frío corneales con la producción «basal» de lágrima (Andrés Parra et al., 2010). Sería pues deseable desarrollar en el futuro modelos que permitan la medición de la producción lacrimal en el ratón en los que se soslayen todas estas limitaciones.

Por último, ni en los estudios en animales ni en los estudios clínicos humanos suelen mostrarse los valores de correlación interocular de aquellas variables estudiadas en ambos ojos. Esta práctica no ha variado en las publicaciones de las dos últimas décadas (Zhang & Ying, 2018), por lo que sería deseable en el futuro que se aportasen los datos de ambos ojos de las variables medidas bilateralmente.

En nuestro caso, intentamos solventar algunas de estas limitaciones metodológicas. Por ejemplo, dado que no nos fue posible utilizar hilos de rojo fenol se optó por usar un método análogo, que se intentó validar como se ha indicado en el apartado de metodología. Además de estudiar la producción lacrimal «basal», y su correlación bilateral, se intentó estudiar la producción lacrimal evocada por la estimulación mecánica nociva de la córnea. No se estudió, sin embargo, el efecto de anestésicar la superficie corneal estando los animales, además, anestesiados centralmente, algo que debería hacerse en el futuro.

En nuestros experimentos hemos podido observar que, tomados en conjunto los datos de los animales de ambos sexos, no se observaron diferencias en la producción lacrimal «basal». Sin embargo, al separar los datos en función del sexo del animal los machos WT mostraron una menor producción lacrimal que las hembras, fenómeno que no se observó entre los animales de distinto sexo de ambas cepas KO. Estudiando animales despiertos de ambos sexos de distinto bagaje genético mediante la aplicación de hilos de rojo fenol en el saco conjuntival durante 15 s, recientemente se ha determinado que los animales de bagaje genético C57BL/6 son los que presentan menor producción lacrimal, expresada ésta en mm de hilo de rojo fenol normalizados por el peso del animal, que animales de otros fondos genéticos comunes, como BALB/c (Pham et al., 2018). Dentro de los animales C57BL/6 no se encontraron diferencias estadísticas en la producción lacrimal media de los machos y las hembras, aunque las segundas mostraron mayor dispersión que los primeros en esta variable. Por ello, no puede excluirse que exista un dimorfismo sexual en la producción lacrimal en el ratón. En caso de confirmarse éste en el futuro en los animales WT, la ausencia de diferencias entre animales de distinto sexo de ambas cepas

KO estudiadas en nuestro caso sugeriría que la SP, la NKA y el α CGRP podrían estar entre los mediadores moleculares de dicho dimorfismo sexual.

En la misma línea argumental, en contraste con la alta correlación bilateral en la producción lacrimal «basal» en los animales WT, en ambas cepas KO no pudo observarse dicha correlación, independientemente del sexo del animal. Por ello, este podría ser un primer indicio de que la SP, la NKA y el α CGRP pueden estar involucrados en la coordinación bilateral de la producción lacrimal. Del mismo modo, al estimular la córnea con estímulos mecánicos de intensidad nociva la producción lacrimal permaneció inalterada respecto a la producción «basal» en cada una de las tres cepas estudiadas, tanto en los machos como en las hembras. Al estar los animales bajo anestesia central, este resultado sugiere que el incremento de la producción lacrimal que acompaña la estimulación corneal depende de un mecanismo de control localizado en niveles superiores al tronco del encéfalo. Como se ha indicado anteriormente, las proyecciones centrales de las neuronas con campo receptor corneal se dirigen a dos zonas troncoencefálicas, principalmente: la zona Vi/Vc y la zona Vc/C1. Las neuronas de segundo orden de la zona Vi/Vc se consideran involucradas en el mantenimiento de las respuestas reflejas que mantienen la homeostasis corneal, mientras que las de la zona Vc/C1 proyectan a regiones superiores. En algunos estudios previos (Bereiter, Bereiter, Tonnessen, & Maclean, 1998) se ha podido comprobar que, en la rata, en respuesta a la estimulación unilateral de la córnea con aceite de mostaza, la expresión de c-Fos aparece tanto en el lado ipsilateral como en el contralateral en ambas regiones, siendo siempre mayor en el lado ipsilateral. Sin embargo, el pretratamiento de los animales con antagonistas tanto para los receptores NK1 (CP99,994) como NK2 (MEN10,376) redujo la expresión de c-Fos en la zona Vc/C1 ipsilateral a la córnea estimulada, de forma dosis-dependiente (Bereiter et al., 1998). Adicionalmente, midiendo la producción lacrimal en ratones despiertos con hilos de rojo fenol aplicados durante 30 s en el saco conjuntival de ratones NK1-KO se ha podido comprobar que presentan menor producción lacrimal que sus correspondientes controles (Gaddipati et al., 2016). Todo ello sugiere que las taquiquininas podrían estar involucradas en el control de la lacrimación mediada por centros nerviosos superiores al tronco del encéfalo.

Por ello, en el futuro sería interesante medir con métodos validados, protocolos estandarizados, y en animales despiertos de ambas cepas KO la producción lacrimal, tanto «basal» como tras la estimulación de la córnea, con la finalidad de aclarar la contribución de estos neuropéptidos al control de la producción lacrimal, tanto en situaciones fisiológicas, como en otras situaciones inflamatorias, como la conjuntivitis alérgica (M Carmen Acosta et al., 2016) o el incremento de lacrimación que se observa durante el envejecimiento (Gallar et al., 2015).

5.5 Liberación de neuropéptidos desde las terminaciones periféricas.

Con la finalidad de comprobar si los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 se liberaban desde las terminaciones periféricas de la córnea, se midió la liberación de NKA desde la córnea aislada, evocada por su exposición aguda a la capsaicina. El contenido de NKA de la córnea humana parece ser hasta diez veces superior que el de la sustancia P (Schmid et al., 2005), y en el ganglio trigémino de la rata la cantidad de este neuropéptido se reduce en hasta un 75% por el tratamiento neonatal de los animales con inyecciones sistémicas de capsaicina (Schmid et al., 2005). Esta intervención también causa reducciones de más del 80% y del 60 % de la cantidad de SP y CGRP en este mismo tejido (Schmid et al., 2005). Aunque no existen datos para el ratón, en la rata la cantidad de NKA en la córnea ronda los $7.5 \text{ fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ de peso húmedo del tejido (Schmid et al., 2005), dato que se desconocía en el momento en el que se realizaron los experimentos de liberación de NKA presentados en esta memoria. Por ello, debido al rango de detección del kit de ELISA usado en nuestros experimentos ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) no se pudo determinar si la capsaicina evocaba la liberación de este péptido desde las terminaciones periféricas de las neuronas nociceptivas primarias, tras su estimulación con capsaicina. Para comprobarlo, por tanto, sería necesario repetir estos experimentos usando otros sistemas de medida con mayor sensibilidad y precisión. Del mismo modo, convendría medir directamente la liberación de sustancia P, aunque existen evidencias indirectas de que la estimulación retrógrada del trigémino libera este neuropéptido sobre la superficie ocular (Kovács et al., 2005), causando un incremento de las fases acuosa y mucosa de la película lacrimal, así como una disminución del número de células caliciformes conjuntivales.

En el caso de la liberación del CGRP, nuestros experimentos sí permitieron comprobar que este neuropéptido no se liberaba desde las córneas aisladas provenientes de animales $\alpha\text{CGRP-KO}$ en respuesta a su exposición aguda a la capsaicina. Sin embargo, en las soluciones en las que fueron colocadas dichas córneas pudo observarse una inmunorreactividad basal, que podría deberse a la interacción del anticuerpo del kit de ELISA con otros epítomos inespecíficos, insensibles al efecto de la capsaicina. Esta inmunorreactividad basal en los animales $\alpha\text{CGRP-KO}$ ya fue descrita por sus creadores (Salmon et al., 1999). Por el contrario, el CGRP se liberó desde las córneas de los animales WT cuando estas fueron expuestas a la capsaicina, fenómeno que se prolongó durante unos minutos, antes de volver a los niveles basales. Otros experimentos realizados por nuestro grupo (C. Belmonte, Luna, & Gallar, 2003) han mostrado que el CGRP no

se libera cuando la córnea es expuesta a agonistas de los receptores TRPM8, como el frío o el mentol, lo que permite sugerir que la fuente de CGRP son los nociceptores polimodales corneales.

Aunque en nuestros experimentos se incluyeron córneas provenientes de animales de ambos sexos, no se determinó si esta variable podría estar relacionada con una mayor o menor liberación del péptido, por lo que esta relación debería estudiarse sistemáticamente en futuros estudios, puesto que se ha comprobado que si bien la expresión basal de α CGRP en el trigémino es similar en ratones machos y hembras C57BL, la inyección de «sopa inflamatoria» en la piel del territorio facial incrementa la expresión de este neuropéptido en el trigémino significativamente más en las hembras que en los machos (Kuzawińska, Lis, Cudna, & Bałkowiec-Iskra, 2014).

Por último, se podría pensar que en nuestro modelo de córnea aislada la liberación de este neuropéptido se realizaría desde las terminaciones libres intraepiteliales. Sin embargo, el CGRP parece poder liberarse también a lo largo del axón neuronal (Spitzer, Reeh, & Sauer, 2008; Weller, Reeh, & Sauer, 2011). Debido a que en la córnea aislada se encuentran los axones intraestromales y el plexo subbasal, sería interesante conocer en el futuro si el CGRP se libera tan sólo desde las terminales nociceptivas intraepiteliales y realiza sus efectos de manera restringida sobre el epitelio corneal, o si, por el contrario, se libera también a lo largo del recorrido axonal en todo el plexo subbasal, el tercio anterior del estroma o el limbo, por ejemplo, involucrando por tanto en sus efectos a otros tejidos corneales.

5.6 Efectos sobre la cicatrización *in vitro* e *in vivo*.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de los neuropéptidos sobre la cicatrización del epitelio corneal tanto *in vitro* como *in vivo*.

El modelo *in vitro* se utilizó con la finalidad de conocer el efecto directo que pudieran tener los neuropéptidos sobre la capacidad de las células epiteliales para recubrir zonas desepitelizadas experimentalmente. Las células epiteliales eran de una línea inmortalizada humana, por lo que sus propiedades funcionales pueden no ser exactamente las mismas que las de las células epiteliales corneales *in situ* o en cultivo primario. Este hecho podría, por tanto, limitar la extrapolación de los resultados obtenidos en nuestro modelo *in vitro* a contextos *in vivo*.

Por otro lado, aunque para sincronizar a las células en cultivo es una práctica común el privar el medio de cultivo de suero durante 24 horas antes de comenzar los ensayos funcionales con las mismas -algo que hicimos-, en esta línea en concreto se ha sugerido que esta maniobra podría no ser suficiente para conseguir dicha sincronización (Liliensiek, Schell, Howard, Nealey, &

Murphy, 2006). Sin embargo, tanto en los pocillos en los que las HCEC se cultivaron en presencia de FBS o se co-cultivaron con células disociadas del trigémino de animales WT, se observó una escasa variabilidad en la cinética de la cicatrización, por lo que se considera que la privación de suero durante 24 h consiguió sincronizar adecuadamente las células.

Algunas otras limitaciones de nuestro modelo de cicatrización *in vitro* derivan de que las HCEC se co-cultivaron con agregados celulares de ganglios trigéminos tras su disociación aguda, es decir, no se separaron selectivamente las neuronas trigeminales propiamente dichas, ni se las cultivó de manera primaria hasta su diferenciación morfológica neuronal. Tampoco se comprobó si estos agregados celulares seguían vivos tras el período en cultivo, ni se midió la concentración de neuropéptidos que estos agregados celulares liberaron al medio de cultivo de las HCEC.

Podría argüirse, por tanto, que la ausencia de efecto sobre la cicatrización *in vitro* que hemos observado en nuestros experimentos podría obedecer a alguna de estas limitaciones experimentales. Sin embargo, para conocer el efecto directo de estos neuropéptidos, en el presente trabajo añadimos directamente al medio de cultivo α CGRP a concentraciones hasta $1 \cdot 10^{-10}$ M. Del mismo modo, en colaboración con el Dr. Carlos Alonso-Ron, en el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Oviedo, España), se replicó este mismo experimento añadiendo al medio SP a concentraciones entre 1 y $40 \cdot 10^{-6}$ M. De modo similar a lo observado en los co-cultivos de HCEC y agregados celulares del trigémino, la adición de estos neuropéptidos a dichas concentraciones directamente al medio de cultivo tampoco consiguió estimular la cicatrización de las lesiones realizadas en monocapas de HCEC. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Kaoru Araki-Sasaki et al., 2000; Garcia-Hirschfeld, Lopez-Briones, & Belmonte, 1994a; Masatsugu Nakamura et al., 1997). Por tanto, de la suma de todas estas observaciones puede sugerirse que estos neuropéptidos no estimulan directamente la cicatrización de las HCEC en cultivo.

El único hallazgo reseñable de los experimentos *in vitro* fue que al administrar el α CGRP a concentraciones $1 \cdot 10^{-10}$ M, las HCEC se despegaron del fondo del pocillo y se arrastraron con los lavados de este. Estos resultados son coincidentes con los de otros autores (Garcia-Hirschfeld et al., 1994a). En paralelo a dicha observación, cuando este neuropéptido se administró a esta misma concentración cada tres horas en el modelo de cicatrización *in vivo*, la cicatrización en los ojos que recibieron el péptido se retrasó respecto a los ojos contralaterales, que recibieron el vehículo en el que éste iba disuelto. Este efecto ocurrió tanto en los machos como en las hembras WT, así como en las hembras de los animales α CGRP-KO. La administración del péptido se acompañó del desarrollo de una importante opacificación corneal en los ojos que lo recibieron,

respecto a los contralaterales. Todo ello sugiere que concentraciones elevadas de α CGRP y/o su presencia continuada sobre la superficie ocular pueden tener efectos deletéreos sobre la cicatrización de lesiones del epitelio corneal, que podrían explicarse, al menos parcialmente, por la alteración de los mecanismos de adhesión de las células epiteliales entre sí o a la membrana basal.

De modo análogo, la cicatrización de las lesiones epiteliales corneales *in vivo* estuvo afectada en los animales Tac1-KO, especialmente en las hembras, pero ni el co-cultivo de la HCEC con células disociadas de trigéminos Tac1-KO, ni la adición al medio de SP ejercieron ningún efecto directo sobre la cicatrización *in vitro*, lo que sugiere que estos efectos no son debidos a la acción directa de las taquiquinas sobre las células epiteliales, sino sobre otros tipos celulares presentes en la córnea completa.

En los experimentos de cicatrización *in vivo* se observaron dos hallazgos principales. En primer lugar, un dimorfismo sexual en el proceso de cicatrización en los animales WT. Este fenómeno ha sido descrito previamente *in vivo*: en las hembras, la cicatrización ocurre más lentamente que en los machos. El momento de aparición de esta divergencia en el proceso parece depender de la cepa. Así, en ratones BALBc las diferencias entre sexos comienzan a ser aparentes a partir de las 24 h tras la lesión (S. B. Wang et al., 2012), mientras que en los ratones C57BL6 las diferencias comienzan a partir de las 32 h (Pham et al., 2018; S. B. Wang et al., 2012). En nuestras observaciones, efectivamente, el área de las lesiones comenzó a divergir entre los machos y las hembras WT a partir de las 36 h de la lesión. Esta divergencia entre sexos se pudo apreciar también en los animales Tac1-KO, y no así en los α CGRP-KO.

En segundo lugar, se pudo observar que la cicatrización epitelial corneal está alterada en los animales Tac1-KO, en comparación con las otras dos cepas. Al estudiar separadamente a los animales por sexos, se pudo comprobar que este fenómeno se daba, fundamentalmente, en las hembras Tac1-KO. No se observaron diferencias en el proceso de cicatrización en hembras NK1-KO al compararlo con el de las hembras Tac1-KO durante las primeras 36 horas tras la lesión, por lo que se puede sugerir que la alteración de la cicatrización observada en las hembras Tac1-KO durante ese tiempo puede deberse a la ausencia del efecto de la SP en estas últimas.

5.7 Propuestas de futuro.

Nuestras observaciones *in vivo* e *in vitro* pueden integrarse en un modelo hipotético explicativo a modo de resumen final, que precisaría de futuras comprobaciones experimentales.

Este modelo hipotético parte de que tanto en nuestras observaciones *in vitro* como *in vivo* la adición del α CGRP parece tener efectos deletéreos para el proceso de cicatrización epitelial de la córnea. Del mismo modo, el proceso de cicatrización en los animales α CGRP-KO no está alterado, mientras que, por el contrario, en las otras dos cepas, en las que este neuropéptido sí se está expresando, la cicatrización epitelial está alterada. Por ello, se podría pensar que en estas dos cepas el α CGRP endógeno estaría contribuyendo a la alteración de la cicatrización del epitelio corneal.

La alteración de la cicatrización epitelial de la córnea *in vivo* se da especialmente en los animales Tac1-KO. Sin embargo, la SP no parece tener efectos directos sobre la proliferación o la migración de células epiteliales. Por ello, podría hipotetizarse que: a) la SP actúe de modo indirecto sobre la cicatrización *in vivo*, para lo que sería necesario, por ejemplo, el concurso de otras células; y b) que, sin excluir otros mecanismos, uno de los efectos de la liberación de la SP *in vivo* fuese limitar el efecto biológico del α CGRP. En este sentido, es de destacar que en la piel la SP limita el efecto vasodilatador del α CGRP en un proceso mediado por la activación de los mastocitos (Brain & Williams, 1988). La SP estimula la degranulación de los mastocitos (Bauer & Razin, 2000; Kulka, Sheen, Tancowny, Grammer, & Schleimer, 2008), quienes liberan diversas proteasas, como la triptasa (Walls et al., 1992), que destruye el α CGRP (Tam & Caughey, 1990) limitando sus efectos. Por lo tanto, de manera análoga, la ausencia de la SP en los animales Tac1-KO podría conllevar que el α CGRP no se eliminase adecuadamente de la córnea, elevándose, por tanto, su concentración y/o manteniéndose por más tiempo en el tejido sus efectos biológicos.

La presencia de mastocitos en la superficie ocular es conocida desde hace tiempo. En la córnea humana estas células se localizan en el limbo (Iwamoto & Smelser, 1965), y en el conejo se han descrito, también, en el párpado (Levene, 1962). En mastocitos aislados desde la médula ósea del ratón se ha podido comprobar que la expresión del receptor NK1 en dichas células está regulada por la molécula de señalización intercelular, *stem cell factor* (van der Kleij et al., 2003). El epitelio corneal del ratón produce *stem cell factor* (Miyamoto et al., 2012), y, curiosamente, los animales en los que se abolió la expresión del mismo o de su receptor (c-kit) presentaron un enlentecimiento de la cicatrización corneal epitelial. Por tanto, se podría hipotetizar que la alteración de la cicatrización observada en los animales Tac1-KO podría no deberse a un efecto directo de las taquiquinas sobre las células epiteliales corneales, sino al efecto del exceso de α CGRP que podrían presentar estos animales. Para sostener esta hipótesis es necesario medir la expresión y la liberación de α CGRP en la cepa Tac1-KO, así como comprobar si esta se afecta al modificar el funcionamiento de los mastocitos.

En nuestros experimentos *in vitro*, la adición de CGRP a $1 \cdot 10^{-10}$ M causó el despegamiento de las HCEC de los pocillos en las que estaban siendo cultivadas. Ello podría ser la explicación del retraso en la cicatrización observado al administrar esta misma concentración en nuestros experimentos *in vivo*. Sin embargo, otras posibles explicaciones podrían también ser tenidas en cuenta.

Por ejemplo, durante el proceso de cicatrización corneal del ratón se produce una invasión del epitelio por neutrófilos (Li, Burns, & Smith, 2006). Estas células llegan al epitelio en dos oleadas: una primera entre las 12 y las 18 h tras la lesión, y otra alrededor de las 30 h tras la misma. Al inducir a los animales una neutropenia, la cicatrización de epitelio corneal se enlentece y comienza a presentar mucha mayor variabilidad. Por ello, se considera que la invasión leucocitaria de la córnea en los momentos posteriores a la lesión es necesaria para que la cicatrización se dé correctamente. Más recientemente se ha propuesto que el reclutamiento de los neutrófilos tras la lesión de la córnea puede comenzar en la primera hora tras la misma, y que la activación mastocitaria desempeña un papel en la amplificación de dicho reclutamiento (Sahu et al., 2018). Aunque los neutrófilos se han considerado clásicamente como células de defensa inmune, actualmente se está comenzando a considerar su papel en los procesos de reparación tisular (J. Wang, 2018). Otras células inmunes, como los linfocitos T $\gamma\delta$, parecen necesarios para que se produzca el fenómeno de reclutamiento de los neutrófilos, así como para que la cicatrización corneal en el ratón se dé correctamente (Li, Burns, Rumbaut, & Smith, 2007).

Usando diferentes modelos experimentales, varios trabajos recientes han llegado a la conclusión de que el α CGRP inhibe el reclutamiento de neutrófilos por mecanismos no aclarados. Por ejemplo, en un modelo de infección cutánea por *Streptococcus pyogenes* (Pinho-Ribeiro et al., 2018), la liberación de α CGRP desde los nociceptores de la piel inhibió el reclutamiento de neutrófilos a la zona afectada, fenómeno que pudo ser revertido aplicando toxina botulínica o el antagonista del α CGRP, CGRP₈₋₃₇. Del mismo modo, en un modelo de neumonía bacteriana por *Staphylococcus aureus* (Baral et al., 2018), la liberación de CGRP tras la activación de los nociceptores vagales inhibió el reclutamiento de neutrófilos y de linfocitos T $\gamma\delta$, lo que contribuyó al progreso de la infección e incrementó la mortalidad de los animales. La ablación de los nociceptores polimodales TRPV1(+) o el tratamiento de los animales con CGRP₈₋₃₇ revirtieron dicho hallazgo. La inhibición del reclutamiento de neutrófilos por el α CGRP en el tejido miocárdico también ha sido observada en un modelo de infarto agudo de miocardio (Lei et al., 2016), sin participación bacteriana. Por tanto, por analogía con estos hallazgos, cabe hipotetizar que en caso de que las concentraciones de α CGRP tras la lesión de la córnea estuviesen anormalmente elevadas, este neuropéptido podría reducir el reclutamiento de neutrófilos a la misma, lo que

podría contribuir a explicar sus efectos sobre la cicatrización. Por ello, sería interesante comprobar en las cepas estudiadas si la dinámica de distintas células inmunes, como los neutrófilos y los linfocitos T $\gamma\delta$ están alteradas tras la lesión del epitelio corneal, especialmente en los animales Tac1-KO.

Además de todos estos mecanismos, en el caso de los experimentos *in vivo* cabe recordar que la superficie ocular no es estéril, sino que posee su propia flora bacteriana, cuyo papel en los modelos de cicatrización no se tiene habitualmente en cuenta. En este sentido, es de destacar que en la piel el α CGRP puede incrementar la virulencia de *S. epidermidis* (N'Diaye et al., 2016), un microorganismo también presente habitualmente en la flora de la superficie ocular (Ueta et al., 2007). Por ello, en futuros estudios debería tenerse también en cuenta este factor.

Por último, es reseñable que numerosos trabajos previos en humanos han mostrado que tras la cirugía del trigémino la prevalencia de queratitis neurotrófica en córneas anestésicas es muy baja (Adams & Cullen, 1987; Bozkurt et al., 2012; Davies, 1970; Kanpolat, Savas, Bekar, & Berk, 2001; Karkas et al., 2014; R. A. Lewis, Keltner, & Cobb, 1982; Taha, Tew, & Buncher, 1995), por lo que la anestesia corneal parece necesaria, pero no suficiente, para explicar el desarrollo de la queratitis neurotrófica. Por lo tanto, en estudios futuros será necesario considerar otros mecanismos hipotéticos que puedan relacionarse con la etiopatogenia de esta enfermedad.



6. CONCLUSIONES

*MH Miguel
Hernández*



- 1) La ablación de la expresión de los neuropéptidos codificados en los genes Tac1 (sustancia P y neuroquinina A) y Calca (α CGRP) del ratón no produce alteraciones fenotípicas oculares, lo que sugiere que estas moléculas no resultan imprescindibles para el desarrollo del ojo.
- 2) La ausencia de estos neuropéptidos no causa alteraciones corneales espontáneas, especialmente a nivel epitelial, por lo que no parecen cruciales para el mantenimiento trófico basal del epitelio corneal.
- 3) Los ratones *knockout* usados en nuestros experimentos mantienen inalteradas tanto la respuesta conductual a la aplicación ocular tópica de capsaicina como la producción basal de lágrima, constituyendo así un modelo que evita algunos sesgos experimentales de otros modelos de estudio del efecto trófico de las neuronas sensoriales oculares sobre el epitelio corneal.
- 4) En el ratón adulto parece existir un dimorfismo sexual en la cicatrización de lesiones epiteliales de la córnea, de manera que en las hembras este proceso se da más lentamente que en los machos.
- 5) *In vivo*, la cicatrización epitelial de la córnea está alterada en los animales carentes de la expresión de los neuropéptidos codificados en el gen Tac1 (sustancia P, neuroquinina A), pero no en los animales carentes de α CGRP.
- 6) Los resultados de los experimentos *in vitro* e *in vivo* en los que se administró α CGRP exógeno apoyan la idea de que las elevaciones de la concentración de α CGRP resultan deletéreas para la cicatrización epitelial de la córnea.



REFERENCIAS

- Acosta, M. C., Belmonte, C., & Gallar, J. (2001). Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *The Journal of Physiology*, 534(Pt. 2), 511–525.
- Acosta, M. C., Luna, C., Quirce, S., Aracil, A., Belmonte, C., & Gallar, J. (2016). Corneal surface temperature, and tearing and blinking rates during allergic conjunctivitis in the guinea pig. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(12), 401–401.
- Acosta, M. C., Peral, A., Luna, C., Pintor, J., Belmonte, C., & Gallar, J. (2004). Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(7), 2333–2336.
- Adams, G. G. W., & Cullen, J. F. (1987). Neuroparalytic Keratitis and the Effect of Cervical Sympathectomy following Operative Procedures for Trigeminal Neuralgia. *Scottish Medical Journal*, 32(3), 86–88. <https://doi.org/10.1177/003693308703200313>
- Alamri, A., Bron, R., Brock, J. A., & Ivanusic, J. J. (2015). Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 expressing corneal sensory neurons can be subdivided into at least three subpopulations. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9, 71. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00071>
- Alcalde, I., Íñigo-Portugués, A., González-González, O., Almaraz, L., Artime, E., Morenilla-Palao, C., ... Belmonte, C. (2018). Morphological and functional changes in TRPM8-expressing corneal cold thermoreceptor neurons during aging and their impact on tearing in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 526(11), 1859–1874. <https://doi.org/10.1002/cne.24454>
- Alexander, S. P. H., Benson, H. E., Faccenda, E., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Spedding, M., ... Harmar, A. J. (2013). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G Protein-Coupled Receptors. *British Journal of Pharmacology*, 170(8), 1459–1581. <https://doi.org/10.1111/bph.12445>
- Alper, M. G. (1975a). The anesthetic eye: an investigation of changes in the anterior ocular segment of the monkey caused by interrupting the trigeminal nerve at various levels along its course. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 73, 313.
- Alper, M. G. (1975b). The anesthetic eye: an investigation of changes in the anterior ocular

segment of the monkey caused by interrupting the trigeminal nerve at various levels along its course. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 73, 323–365.

Amara, S. G., Arriza, J. L., Leff, S. E., Swanson, L. W., Evans, R. M., & Rosenfeld, M. G. (1985).

Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science (New York, N.Y.)*, 229(4718), 1094–1097.

<https://doi.org/10.1126/science.2994212>

Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S., & Evans, R. M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298(5871), 240–244. <https://doi.org/10.1038/298240a0>

Aracil, A., Acosta, M. del C., Gallar, J., & Belmonte, C. (1999). Repetitive capsaicin application on mice eye: an in vivo model to study analgesia. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 55(3), 242.

Araki-Sasaki, K., Aizawa, S., Hiramoto, M., Nakamura, M., Iwase, O., Nakata, K., ... Tano, Y.

(2000). Substance P-induced cadherin expression and its signal transduction in a cloned human corneal epithelial cell line. *Journal of Cellular Physiology*, 182(2), 189–195.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200002\)182:2<189::AID-JCP7>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<189::AID-JCP7>3.0.CO;2-9)

Araki-Sasaki, K., Ohashi, Y., Sasabe, T., Hayashi, K., Watanabe, H., Tano, Y., & Handa, H. (1995).

An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization.

Investigative Ophthalmology & Visual Science, 36(3), 614–621.

Baker, M. D., & Bostock, H. (1997). Low-threshold, persistent sodium current in rat large dorsal root ganglion neurons in culture. *Journal of Neurophysiology*, 77(3), 1503–1513.

Baral, P., Umans, B. D., Li, L., Wallrapp, A., Bist, M., Kirschbaum, T., ... Chiu, I. M. (2018).

Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil and $\gamma\delta$ T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia. *Nature Medicine*, 24(4), 417–426.

<https://doi.org/10.1038/nm.4501>

Barbariga, M., Fonteyne, P., Ostadreza, M., Bignami, F., Rama, P., & Ferrari, G. (2018). Substance

P Modulation of Human and Murine Corneal Neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(3), 1305. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23198>

Barbariga, M., Rabiolo, A., Fonteyne, P., Bignami, F., Rama, P., & Ferrari, G. (2018). The Effect of

Aging on Nerve Morphology and Substance P Expression in Mouse and Human Corneas.

Investigative Ophthalmology & Visual Science, 59(13), 5329.

<https://doi.org/10.1167/iovs.18-24707>

- Barwell, J., Wheatley, M., Conner, A. C., Taddese, B., Vohra, S., Reynolds, C. A., & Poyner, D. R. (2013). The activation of the CGRP receptor. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 180–184. <https://doi.org/10.1042/BST20120251>
- Bates, B. D., Mitchell, K., Keller, J. M., Chan, C.-C., Swaim, W. D., Yaskovich, R., ... Iadarola, M. J. (2010). Prolonged analgesic response of cornea to topical resiniferatoxin, a potent TRPV1 agonist. *Pain*, 149(3), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.03.024>
- Bauer, O., & Razin, E. (2000). Mast Cell-Nerve Interactions. *Physiology*, 15(5), 213–218. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.5.213>
- Belmonte, C., Aracil, A., Acosta, M. C., Luna, C., & Gallar, J. (2004). Nerves and sensations from the eye surface. *The Ocular Surface*, 2(4), 248–253.
- Belmonte, C., & Gallar, J. (2011). Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(6), 3888. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-5119>
- Belmonte, C., Gallar, J., Pozo, M. A., & Rebollo, I. (1991). Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *The Journal of Physiology*, 437, 709–725.
- Belmonte, C., & Giraldez, F. (1981). Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *The Journal of Physiology*, 321(1), 355–368. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013989>
- Belmonte, C., Luna, C. L., & Gallar, J. (2003). Cgrp is Released by Selective Stimulation of Polymodal Nociceptor but Not of Cold Receptor Nerve Fibers of the Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(13), 1391.
- Belmonte, C., Nichols, J. J., Cox, S. M., Brock, J. A., Begley, C. G., Bereiter, D. A., ... Wolffsohn, J. S. (2017). TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocular Surface*, 15(3), 404–437. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.002>
- Belmonte, C., Tervo, T., & Gallar, J. (2011). Sensory innervation of the eye. In L. Levin, S. Nilsson, J. Ver Hoeve, & S. Wu (Eds.), *Adler's Physiology of the Eye*, (11th ed, pp. 363–384). Elsevier Saunders.
- Bereiter, D. A., Bereiter, D. F., Tonnessen, B. H., & Maclean, D. B. (1998). Selective blockade of substance P or neurokinin A receptors reduces the expression of c-fos in trigeminal subnucleus caudalis after corneal stimulation in the rat. *Neuroscience*, 83(2), 525–534.

[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00433-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00433-8)

- Bereiter, D. A., Hathaway, C. B., & Benetti, A. P. (1994). Caudal portions of the spinal trigeminal complex are necessary for autonomic responses and display Fos-like immunoreactivity after corneal stimulation in the cat. *Brain Research*, *657*(1–2), 73–82.
- Bignami, F., Giacomini, C., Lorusso, A., Aramini, A., Rama, P., & Ferrari, G. (2014). NK1 receptor antagonists as a new treatment for corneal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(10), 6783–6794. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14553>
- Blixt, F. W., Radziwon-Balicka, A., Edvinsson, L., & Warfvinge, K. (2017). Distribution of CGRP and its receptor components CLR and RAMP1 in the rat retina. *Experimental Eye Research*, *161*, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.06.002>
- Boada, M. D. (2013). Relationship between electrophysiological signature and defined sensory modality of trigeminal ganglion neurons in vivo. *Journal of Neurophysiology*, *109*(3), 749–757. <https://doi.org/10.1152/jn.00693.2012>
- Borbély, É., Hajna, Z., Sándor, K., Kereskai, L., Tóth, I., Pintér, E., ... Helyes, Z. (2013). Role of Tachykinin 1 and 4 Gene-Derived Neuropeptides and the Neurokinin 1 Receptor in Adjuvant-Induced Chronic Arthritis of the Mouse. *PLoS ONE*, *8*(4), e61684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061684>
- Bouvier, M. (2001). Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nature Reviews. Neuroscience*, *2*(4), 274–286. <https://doi.org/10.1038/35067575>
- Bozkurt, M., Al-Beyati, E. S. M., Ozdemir, M., Kahilogullari, G., Elhan, A. H., Savas, A., & Kanpolat, Y. (2012). Management of bilateral trigeminal neuralgia with trigeminal radiofrequency rhizotomy: A treatment strategy for the life-long disease. *Acta Neurochirurgica*, *154*(5), 785–791. <https://doi.org/10.1007/s00701-012-1311-7>
- Brain, S. D., & Williams, T. J. (1988). Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Nature*, *335*(6185), 73–75. <https://doi.org/10.1038/335073a0>
- Brock, J. A., McLachlan, E. M., & Belmonte, C. (1998). Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *The Journal of Physiology*, *512* (Pt 1), 211–217.
- Bron, R., Wood, R. J., Brock, J. A., & Ivanusic, J. J. (2014). Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, *522*(13), 2967–2979.

<https://doi.org/10.1002/cne.23560>

- Bruce, N. A. (1913). Vaso-dilator axon-reflexes. *Quat. J. Exp. Physiol*, 6(4), 339–354.
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1913.sp000144>
- Buck, R. C. (1979). Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 18(8), 767–784.
- Butler, R. K., & Finn, D. P. (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology*, 88(3), 184–202. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2009.04.003>
- Bynke, G., Håkanson, R., & Sundler, F. (1984). Is substance P necessary for corneal nociception? *European Journal of Pharmacology*, 101(3–4), 253–258. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(84\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(84)90165-1)
- Cabanes, C., Lopez de Armentia, M., Viana, F., & Belmonte, C. (2002). Postnatal Changes in Membrane Properties of Mice Trigeminal Ganglion Neurons. *J Neurophysiol*, 87(5), 2398–2407.
- Carlton, S. M. (2014). Nociceptive primary afferents: they have a mind of their own. *The Journal of Physiology*, 592(16), 3403–3411. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.269654>
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389(6653), 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>
- Chang, C.-Y., Green, C. R., McGhee, C. N. J., & Sherwin, T. (2008). Acute wound healing in the human central corneal epithelium appears to be independent of limbal stem cell influence. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(12), 5279–5286.
<https://doi.org/10.1167/iovs.07-1260>
- Chao, C., Golebiowski, B., Zhao, X., Chen, S., Zhou, S., & Stapleton, F. (2016). Long-term Effects of LASIK on Corneal Innervation and Tear Neuropeptides and the Associations With Dry Eye. *Journal of Refractive Surgery*, 32(8), 518–524. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20160603-01>
- Chao, C., Stapleton, F., Zhou, X., Chen, S., Zhou, S., & Golebiowski, B. (2015). Structural and functional changes in corneal innervation after laser in situ keratomileusis and their relationship with dry eye. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 253(11), 2029–2039. <https://doi.org/10.1007/s00417-015-3120-1>
- Chen, X., Gallar, J., Pozo, M. A., Baeza, M., & Belmonte, C. (1995). CO₂ stimulation of the

- cornea: a comparison between human sensation and nerve activity in polymodal nociceptive afferents of the cat. *The European Journal of Neuroscience*, 7(6), 1154–1163.
- Chikama, T., Fukuda, K., Morishige, N., & Nishida, T. (1998). Treatment of neurotrophic keratopathy with substance-P-derived peptide (FGLM) and insulin-like growth factor I. *The Lancet*, 351(9118), 1783–1784. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)24024-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)24024-4)
- Cintron, C., Hassinger, L., Kublin, C. L., & Friend, J. (1979). A Simple Method for the Removal of Rabbit Corneal Epithelium Utilizing n-Heptanol. *Ophthalmic Research*, 11(2), 90–96. <https://doi.org/10.1159/000264990>
- Clapham, D. E., Julius, D., Montell, C., & Schultz, G. (2005). International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 427–450. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.6>
- Close, B., Banister, K., Baumans, V., Bernoth, E. M., Bromage, N., Bunyan, J., ... Warwick, C. (1996). Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Laboratory Animals*, 30(4), 293–316. <https://doi.org/10.1258/002367796780739871>
- Corder, G., Ahanonu, B., Grewe, B. F., Wang, D., Schnitzer, M. J., & Scherrer, G. (2019). An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6424), 276–281. <https://doi.org/10.1126/science.aap8586>
- Cotsarelis, G., Cheng, S.-Z., Dong, G., Sun, T.-T., & Lavker, R. M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57(2), 201–209. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90958-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90958-6)
- Cotsarelis, G., Sun, T.-T., & Lavker, R. M. (1990). Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*, 61(7), 1329–1337. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90696-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90696-C)
- Danjo, Y., & Gipson, I. K. (1998). Actin “purse string” filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. *Journal of Cell Science*, 111 (Pt 2), 3323–3332.
- Dartt, D. A. (2009). Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 28(3), 155–177. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.04.003>

- Davies, M. (1970). Corneal anesthesia after alcohol injection of the trigeminal sensory root. *British Journal of Ophthalmology*, 54(1970), 577–586.
- Dawson, D. G., Ubels, J. L., & Edelhauser, H. F. (2011). Cornea and sclera. In L. Levin, S. Nilsson, J. Ver Hoeve, & S. Wu (Eds.), *Adler's Physiology of the Eye* (11th ed, pp. 71–130). Elsevier Saunders.
- de Castro, F., Silos-Santiago, I., de Armentia, M. L., Barbacid, M., & Belmonte, C. (1998). Corneal innervation and sensitivity to noxious stimuli in trk A knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, 10(1), 146–152. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00037.x>
- De Felipe, C., & Belmonte, C. (1999). c-Jun expression after axotomy of corneal trigeminal ganglion neurons is dependent on the site of injury. *European Journal of Neuroscience*, 11(3), 899–906. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00498.x>
- De Felipe, C., Gonzalez, G. G., Gallar, J., & Belmonte, C. (1999). Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: Effect of corneal wounding. *European Journal of Pain*, 3(1), 31–39. [https://doi.org/10.1016/S1090-3801\(99\)90186-6](https://doi.org/10.1016/S1090-3801(99)90186-6)
- De Swert, K. O., Tournoy, K. G., Joos, G. F., & Pauwels, R. A. (2004). The role of the tachykinin NK1 receptor in airway changes in a mouse model of allergic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(6), 1093–1099. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.015>
- Denis, P., Fardin, V., Nordmann, J. P., Elena, P. P., Laroche, L., Saraux, H., & Rostene, W. (1991). Localization and characterization of substance P binding sites in rat and rabbit eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(6), 1894–1902.
- Devesa, I., Ferrándiz-Huertas, C., Mathivanan, S., Wolf, C., Luján, R., Changeux, J.-P., & Ferrer-Montiel, A. (2014). α CGRP is essential for algescic exocytotic mobilization of TRPV1 channels in peptidergic nociceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), 18345–18350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420252111>
- Dhouailly, D., Pearton, D. J., & Michon, F. (2014). The vertebrate corneal epithelium: From early specification to constant renewal. *Developmental Dynamics*, 243(10), 1226–1241. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24179>
- Di Girolamo, N., Bobba, S., Raviraj, V., Delic, N. C., Slapetova, I., Nicovich, P. R., ... Lyons, J. G. (2015). Tracing the fate of limbal epithelial progenitor cells in the murine cornea. *Stem Cells*, 33(1), 157–169. <https://doi.org/10.1002/stem.1769>

- Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T., & Lowe, J. (2013). Human Corneal Anatomy Redefined: A Novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). *Ophthalmology*, *120*(9), 1778–1785. <https://doi.org/10.1016/J.OPHTHA.2013.01.018>
- Egea, S. C., & Dickerson, I. M. (2012). Direct interactions between calcitonin-like receptor (CLR) and CGRP-receptor component protein (RCP) regulate CGRP receptor signaling. *Endocrinology*, *153*(4), 1850–1860. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1459>
- Erlanger, J., Bishop, G. H., & Gasser, H. S. (1926). The action potential waves transmitted between the sciatic nerve and its spinal roots. *Am J Physiol*, *78*(3), 574–591.
- Evans, B. N., Rosenblatt, M. I., Mnayer, L. O., Oliver, K. R., & Dickerson, I. M. (2000). CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(40), 31438–31443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005604200>
- Felipe, C. De, Herrero, J. F., O'Brien, J. A., Palmer, J. A., Doyle, C. A., Smith, A. J. H., ... Hunt, S. P. (1998). Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, *392*(6674), 394–397. <https://doi.org/10.1038/32904>
- Fisher, A. S., Stewart, R. J., Yan, T., Hunt, S. P., & Stanford, S. C. (2007). Disruption of noradrenergic transmission and the behavioural response to a novel environment in NK1R-/- mice. *European Journal of Neuroscience*, *25*(4), 1195–1204. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05369.x>
- Freeland, K., Liu, Y. Z., & Latchman, D. S. (2000). Distinct signalling pathways mediate the cAMP response element (CRE)-dependent activation of the calcitonin gene-related peptide gene promoter by cAMP and nerve growth factor. *The Biochemical Journal*, *345 Pt 2*, 233–238.
- Gaddipati, S., Rao, P., Jerome, A. D., Burugula, B. B., Gerard, N. P., & Suvas, S. (2016). Loss of Neurokinin-1 Receptor Alters Ocular Surface Homeostasis and Promotes an Early Development of Herpes Stromal Keratitis. *The Journal of Immunology*, *197*(10), 4021–4033. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600836>
- Gallar, J., Luna, C., Alonso, E., Revert, R., Quirce, S., Aracil, A., ... Acosta, M. C. (2015). Corneal surface temperature and tear secretion in young and adult aqueous tear deficient guinea pigs. *Acta Ophthalmologica*, *93*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.2015.0617>
- Gallar, J., Pozo, M. A., Rebollo, I., & Belmonte, C. (1990). Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *31*(10), 1968–1974.

- Gallar, J., Pozo, M. A., Tuckett, R. P., & Belmonte, C. (1993). Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *The Journal of Physiology*, *468*, 609–622.
- Garcia-Hirschfeld, J., Lopez-Briones, L. G., & Belmonte, C. (1994a). Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*, *59*(5), 597–605.
<https://doi.org/10.1006/exer.1994.1145>
- Garcia-Hirschfeld, J., Lopez-Briones, L. G., & Belmonte, C. (1994b). Neurotrophic influences on corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*, *59*, 597–605.
- Georgette, L. (1983). La place de Magendie dans la physiologie expérimentale du système nerveux. *Histoire Des Sciences Médicales Paris*, 357–366.
- Gilbard, J. P., & Rossi, S. R. (1990a). Tear Film and Ocular Surface Changes in a Rabbit Model of Neurotrophic Keratitis. *Ophthalmology*, *97*(3), 308–312. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(90\)32587-3](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(90)32587-3)
- Gilbard, J. P., & Rossi, S. R. (1990b). Tear Film and Ocular Surface Changes in a Rabbit Model of Neurotrophic Keratitis. *Ophthalmology*, *97*(3), 308–312. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(90\)32587-3](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(90)32587-3)
- Gipson, I. K., Westcott, M. J., & Brooksby, N. G. (1982). Effects of cytochalasins B and D and colchicine on migration of the corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *22*(5), 633–642.
- Giraldez, F., Geijo, E., & Belmonte, C. (1979). Response characteristics of corneal sensory fibers to mechanical and thermal stimulation. *Brain Research*, *177*(3), 571–576.
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90475-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90475-X)
- Golebiowski, B., Chao, C., Stapleton, F., & Jalbert, I. (2017). Corneal Nerve Morphology, Sensitivity, and Tear Neuropeptides in Contact Lens Wear. *Optometry and Vision Science*, *94*(4), 534–542. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000001063>
- 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 & Visual Science*, *58*(1), 404. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20033>
- Hanna, C. (1966). Proliferation and migration of epithelial cells during corneal wound repair in the rabbit and the rat. *American Journal of Ophthalmology*, *61*(1), 55–63.
- Harris, L. W., & Purves, D. (1989). Rapid remodeling of sensory endings in the corneas of living

- mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(6), 2210–2214.
- Hayashi, R., Yamato, M., Sugiyama, H., Sumide, T., Yang, J., Okano, T., ... Nishida, K. (2007). N-Cadherin Is Expressed by Putative Stem/Progenitor Cells and Melanocytes in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche. *Stem Cells*, 25(2), 289–296.
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0167>
- He, J., & Bazan, H. E. P. P. (2016). Neuroanatomy and Neurochemistry of Mouse Cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(2), 664. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18019>
- Hegarty, D. M., Hermes, S. M., Morgan, M. M., & Aicher, S. A. (2018). Acute hyperalgesia and delayed dry eye after corneal abrasion injury. *Pain Reports*, 3(4), e664.
<https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000664>
- Heino, P., Oksala, O., Luhtala, J., & Uusitalo, H. (1995). Localization of calcitonin gene-related peptide binding sites in the eye of different species. *Current Eye Research*, 14(9), 783–790.
- Herpfer, I., Hunt, S. P., & Stanford, S. C. (2005). A comparison of neurokinin 1 receptor knock-out (NK1^{-/-}) and wildtype mice: exploratory behaviour and extracellular noradrenaline concentration in the cerebral cortex of anaesthetised subjects. *Neuropharmacology*, 48(5), 706–719. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2004.12.016>
- Hertsenberg, A. J., & Funderburgh, J. L. (2015). *Stem Cells in the Cornea. Molecular Biology of Eye Disease* (1st ed., Vol. 134). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.002>
- Hooijmans, C. R., Leenaars, M., & Ritskes-Hoitinga, M. (2010). A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 38(2), 167–182.
- Höppener, J. W., Steenbergh, P. H., Zandberg, J., Geurts van Kessel, A. H., Baylin, S. B., Nelkin, B. D., ... Lips, C. J. (1985). The second human calcitonin/CGRP gene is located on chromosome 11. *Human Genetics*, 70(3), 259–263.
- IASP. (2011). IASP Terminology - Pain. Retrieved December 26, 2018, from <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576#Pain>
- Ivanusic, J. J., Wood, R. J., & Brock, J. A. (2013). Sensory and sympathetic innervation of the mouse and guinea pig corneal epithelium. *The Journal of Comparative Neurology*, 521(4),

877–893. <https://doi.org/10.1002/cne.23207>

- Iwamoto, T., & Smelser, G. K. (1965). Electron microscope studies on the mast cells and blood and lymphatic capillaries of the human corneal limbus. *Investigative Ophthalmology*, 4(5), 815–834.
- Jennings, M., Batchelor, G. R., Brain, P. F., Dick, A., Elliott, H., Francis, R. J., ... West, C. (1998). Refining rodent husbandry: the mouse. Report of the Rodent Refinement Working Party. *Laboratory Animals*, 32(3), 233–259.
- Jensen, D. D., Lieu, T., Halls, M. L., Veldhuis, N. A., Imlach, W. L., Mai, Q. N., ... Bunnett, N. W. (2017). Neurokinin 1 receptor signaling in endosomes mediates sustained nociception and is a viable therapeutic target for prolonged pain relief. *Science Translational Medicine*, 9(392), eaal3447. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3447>
- Jones, M. A., & Marfurt, C. F. (1998). Peptidergic innervation of the rat cornea. *Experimental Eye Research*, 66(4), 421–435. <https://doi.org/10.1006/exer.1997.0446>
- Joubert, F., Acosta, M. del C., Gallar, J., Fakih, D., Sahel, J.-A., Baudouin, C., ... Réaux-Le Goazigo, A. (2018). Effects of corneal injury on ciliary nerve fibre activity and corneal nociception in mice: A behavioural and electrophysiological study. *European Journal of Pain*. <https://doi.org/10.1002/ejp.1332>
- Jumblatt, M. M., Fogle, J. A., & Neufeld, A. H. (1980). Cholera toxin stimulates adenosine 3',5'-monophosphate synthesis and epithelial wound closure in the rabbit cornea. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 19(11), 1321–1327.
- Jumblatt, M. M., & Neufeld, A. H. (1981). Characterization of cyclic AMP-mediated wound closure of the rabbit corneal epithelium. *Current Eye Research*, 1(4), 189–195. <https://doi.org/10.3109/02713688109001848>
- Kanpolat, Y., Savas, A., Bekar, A., & Berk, C. (2001). Percutaneous controlled radiofrequency trigeminal rhizotomy for the treatment of idiopathic trigeminal neuralgia: 25-year experience with 1600 patients. *Neurosurgery*, 48(3), 524–534. <https://doi.org/10.1097/00006123-200103000-00013>
- Karkas, A., Lamblin, E., Meyer, M., Gay, E., Ternier, J., & Schmerber, S. (2014). Trigeminal nerve deficit in large and compressive acoustic neuromas and its correlation with MRI findings. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, 151(4), 675–680. <https://doi.org/10.1177/0194599814545440>

- Kenshalo, D. R. (1960). Comparison of thermal sensitivity of the forehead, lip, conjunctiva and cornea. *Journal of Applied Physiology*, *15*(6), 987–991.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1960.15.6.987>
- Kenshalo, D. R., Chudler, E. H., Anton, F., & Dubner, R. (1988). SI nociceptive neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious thermal stimulation. *Brain Research*, *454*(1–2), 378–382.
- Kieselbach, G. F., Ragaut, R., Knaus, H. G., König, P., & Wiedermann, C. J. (1990). Autoradiographic analysis of binding sites for ¹²⁵I-Bolton-Hunter-substance P in the human eye. *Peptides*, *11*(4), 655–659. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(90\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0196-9781(90)90175-5)
- Kingsley, R. E., & Marfurt, C. F. (1997). Topical substance P and corneal epithelial wound closure in the rabbit. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *38*(2), 388–395.
- Ko, J.-A., Mizuno, Y., Ohki, C., Chikama, T., Sonoda, K.-H., & Kiuchi, Y. (2014). Neuropeptides Released From Trigeminal Neurons Promote the Stratification of Human Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(1), 125.
<https://doi.org/10.1167/iovs.13-12642>
- Kovács, I., Ludány, A., Koszegi, T., Fehér, J., Kovács, B., Szolcsányi, J., & Pintér, E. (2005). Substance P released from sensory nerve endings influences tear secretion and goblet cell function in the rat. *Neuropeptides*, *39*(4), 395–402.
<https://doi.org/10.1016/j.npep.2005.04.003>
- Ksander, B. R., Kolovou, P. E., Wilson, B. J., Saab, K. R., Guo, Q., Ma, J., ... Frank, N. Y. (2014). ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*, *511*(7509), 353–357. <https://doi.org/10.1038/nature13426>
- Kulka, M., Sheen, C. H., Tancowny, B. P., Grammer, L. C., & Schleimer, R. P. (2008). Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, *123*(3), 398–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02705.x>
- Kurihashi, K., Yanagihara, N., & Honda, Y. (1977). A modified Schirmer test: the fine-thread method for measuring lacrimation. *Journal of Pediatric Ophthalmology*, *14*(6), 390–397.
- Kuzawińska, O., Lis, K., Cudna, A., & Bałkowiec-Iskra, E. (2014). Gender differences in the neurochemical response of trigeminal ganglion neurons to peripheral inflammation in mice. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *74*(2), 227–232.
- Kwong, Y. M., & Cho, P. (1998). Evaluation of a self-prepared cotton thread test (SP-CTT) and

- the phenol red thread (PRT) test. *Contact Lens and Anterior Eye*, 21(1), 11–14.
[https://doi.org/10.1016/S1367-0484\(98\)80018-0](https://doi.org/10.1016/S1367-0484(98)80018-0)
- Lambiase, A., Rama, P., Bonini, S., Caprioglio, G., & Aloe, L. (1998). Topical treatment with Nerve Growth Factor for corneal neurotrophic ulcers. *The New England Journal of Medicine*, 338(17), 1174–1180.
- Laux-Fenton, W. T., Donaldson, P. J., Kistler, J., & Green, C. R. (2003). Connexin expression patterns in the rat cornea: molecular evidence for communication compartments. *Cornea*, 22(5), 457–464.
- LaVail, J. H., Johnson, W. E., & Spencer, L. C. (1993). Immunohistochemical identification of trigeminal ganglion neurons that innervate the mouse cornea: Relevance to intercellular spread of herpes simplex virus. *The Journal of Comparative Neurology*, 327(1), 133–140.
<https://doi.org/10.1002/cne.903270111>
- Lavker, R. M., Tseng, S. C. G., & Sun, T.-T. (2004). Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Experimental Eye Research*, 78(3), 433–446. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.008>
- Lawrenson, J. G., & Ruskell, G. L. (1991). The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *Journal of Anatomy*, 177, 75–84.
- Lei, J., Zhu, F., Zhang, Y., Duan, L., Lei, H., & Huang, W. (2016). Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 1 Inhibits Inflammation and Apoptosis via the Release of Calcitonin Gene-Related Peptide in the Heart after Myocardial Infarction. *Cardiology*, 134(4), 436–443. <https://doi.org/10.1159/000444439>
- Lele, P. P., & Weddell, G. (1956). The relationship between neurohistology and corneal sensibility. *Brain*, 79(1), 119–154.
- Lele, P. P., & Weddell, G. (1959). Sensory nerves of the cornea and cutaneous sensibility. *Experimental Neurology*, 1, 334–359.
- Levene, R. Z. (1962). Mast cells and amines in normal ocular tissues. *Investigative Ophthalmology*, 1, 531–543.
- Lewis, R. A., Keltner, J. L., & Cobb, C. A. (1982). Corneal Anesthesia After Percutaneous Radiofrequency Trigeminal Rhizotomy: A Retrospective Study. *Archives of Ophthalmology*, 100(2), 301–303. <https://doi.org/10.1001/archoph.1982.01030030303015>
- Lewis, T. (1937a). Nocifensor System of Nerves (II). *British Medical Journal*, 1(3974), 491–494.

- Lewis, T. (1937b). Nocifensor System of Nerves and its Reactions. *British Medical Journal*, 1(3973), 431–435.
- Li, Z., Burns, A. R., Rumbaut, R. E., & Smith, C. W. (2007). $\gamma\delta$ T cells are necessary for platelet and neutrophil accumulation in limbal vessels and efficient epithelial repair after corneal abrasion. *American Journal of Pathology*, 171(3), 838–845.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070008>
- Li, Z., Burns, A. R., & Smith, C. W. (2006). Two Waves of Neutrophil Emigration in Response to Corneal Epithelial Abrasion: Distinct Adhesion Molecule Requirements. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(5), 1947. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1193>
- Liliensiek, S. J., Schell, K., Howard, E., Nealey, P., & Murphy, C. J. (2006). Cell sorting but not serum starvation is effective for SV40 human corneal epithelial cell cycle synchronization. *Experimental Eye Research*, 83(1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.11.007>
- Lindsay, R. M., & Harmar, A. J. (1989). Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature*, 337(6205), 362–364.
<https://doi.org/10.1038/337362a0>
- Lindsay, R. M., Lockett, C., Sternberg, J., & Winter, J. (1989). Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience*, 33(1), 53–65.
- Liu, C.-Y., & Kao, W. W.-Y. (2015). Corneal Epithelial Wound Healing. In *Molecular Biology of Eye Disease* (1st ed., Vol. 134, pp. 61–71). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.05.002>
- Ljubimov, A. V., & Saghizadeh, M. (2015). Progress in corneal wound healing. *Progress in Retinal and Eye Research*, 49, 17–45. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.002>
- López de Armentia, M., Cabanes, C., & Belmonte, C. (2000). Electrophysiological properties of identified trigeminal ganglion neurons innervating the cornea of the mouse. *Neuroscience*, 101(4), 1109–1115.
- Lwigale, P. Y. (2015). Corneal Development. In *Molecular Biology of Eye Disease* (1st ed., Vol. 134, pp. 43–59). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.04.003>
- Lynn, B. (1996). Efferent function of nociceptors. In C. Belmonte & F. Cerveró (Eds.), *Neurobiology of nociceptors* (pp. 418–438). New York: Oxford University Press.
- MacIver, M. B., & Tanelian, D. L. (1993a). Free nerve ending terminal morphology is fiber type

- specific for A delta and C fibers innervating rabbit corneal epithelium. *Journal of Neurophysiology*, 69(5), 1779–1783.
- MacIver, M. B., & Tanelian, D. L. (1993b). Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *The Journal of Neuroscience*, 13(10), 4511–4524.
- Majo, F., Rochat, A., Nicolas, M., Jaoudé, G. A., & Barrandon, Y. (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456(7219), 250–254. <https://doi.org/10.1038/nature07406>
- Malick, A., Strassman, R. M., Burstein, R., Armstrong, W., Arvidsson, J., Fundin, B., ... Giesler, G. (2000). Trigeminothalamic and reticulohypothalamic tract neurons in the upper cervical spinal cord and caudal medulla of the rat. *Journal of Neurophysiology*, 84(4), 2078–2112. <https://doi.org/10.1002/cne.903510402>
- Malminiemi, O. I., & Malminiemi, K. H. (1992). [125 i]Calcitonin Gene-Related Peptide Binding in Membranes of the Ciliary Body-Iris Block. *Current Eye Research*, 11(11), 1079–1085. <https://doi.org/10.3109/02713689209015079>
- Marfurt, C. F. (1981a). The central projections of trigeminal primary afferent neurons in the cat as determined by the transganglionic transport of horseradish peroxidase. *The Journal of Comparative Neurology*, 203(4), 785–798. <https://doi.org/10.1002/cne.902030414>
- Marfurt, C. F. (1981b). The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *The Anatomical Record*, 201(1), 105–118. <https://doi.org/10.1002/ar.1092010113>
- Marfurt, C. F. (1988). Sympathetic innervation of the rat cornea as demonstrated by the retrograde and anterograde transport of horseradish peroxidase-wheat germ agglutinin. *The Journal of Comparative Neurology*, 268(2), 147–160. <https://doi.org/10.1002/cne.902680202>
- Marfurt, C. F., Cox, J., Deek, S., & Dvorscak, L. (2010). Anatomy of the human corneal innervation. *Experimental Eye Research*, 90(4), 478–492. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.12.010>
- Marfurt, C. F., & Del Toro, D. R. (1987). Corneal sensory pathway in the rat: a horseradish peroxidase tracing study. *The Journal of Comparative Neurology*, 261(3), 450–459. <https://doi.org/10.1002/cne.902610309>

- Marfurt, C. F., & Ellis, L. C. (1993). Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase in corneal nerves. *The Journal of Comparative Neurology*, *336*(4), 517–531. <https://doi.org/10.1002/cne.903360405>
- Marfurt, C. F., Kingsley, R. E., & Echtenkamp, S. E. (1989). Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *30*(3), 461–472.
- Martinez, S., & Belmonte, C. (1996). C-Fos expression in trigeminal nucleus neurons after chemical irritation of the cornea: reduction by selective blockade of nociceptor chemosensitivity. *Experimental Brain Research*, *109*(1), 56–62.
- Mastropasqua, L., Massaro-Giordano, G., Nubile, M., & Sacchetti, M. (2017). Understanding the Pathogenesis of Neurotrophic Keratitis: The Role of Corneal Nerves. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(4), 717–724. <https://doi.org/10.1002/jcp.25623>
- Matak, I., Tékus, V., Bölcskei, K., Lacković, Z., & Helyes, Z. (2017). Involvement of substance P in the antinociceptive effect of botulinum toxin type A: Evidence from knockout mice. *Neuroscience*, *358*, 137–145. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2017.06.040>
- Matsumiya, Y., & Mostofsky, D. I. (1972). Somatosensory evoked responses elicited by corneal and nostril air puff stimulation. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *33*(2), 225–227.
- McKenna, C. C., & Lwigale, P. Y. (2011). Innervation of the Mouse Cornea during Development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *52*(1), 30. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5902>
- Mertaniem, P., Yläupa, S., Partanen, P., & Tervo, T. (1995). Increased release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide (CGRP) in tears after excimer laser keratectomy. *Experimental Eye Research*, *60*(6), 659–665. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(05\)80007-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(05)80007-7)
- Mikulec, A. A., & Tanelian, D. L. (1996). CGRP Increases the Rate of Corneal Re-Epithelialization in an In Vitro Whole Mount Preparation. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, *12*(4), 417–423. <https://doi.org/10.1089/jop.1996.12.417>
- Miyamoto, K., Kobayashi, T., Hayashi, Y., Zhang, Y., Hara, Y., Higashine, M., ... Ohashi, Y. (2012). Involvement of stem cell factor and c-kit in corneal wound healing in mice. *Molecular Vision*, *18*, 1505–1515.

- Moore, M., Ma, T., Yang, B., & Verkman, A. S. (2000). Tear secretion by lacrimal glands in transgenic mice lacking water channels AQP1, AQP3, AQP4 and AQP5. *Experimental Eye Research*, 70(5), 557–562. <https://doi.org/10.1006/exer.1999.0814>
- Morcuende, S., Gadd, C. A., Peters, M., Moss, A., Harris, E. A., Sheasby, A., ... Hunt, S. P. (2003). Increased neurogenesis and brain-derived neurotrophic factor in neurokinin-1 receptor gene knockout mice. *The European Journal of Neuroscience*, 18(7), 1828–1836.
- Morfis, M., Christopoulos, A., & Sexton, P. M. (2003). RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(11), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.09.001>
- Morton, D. B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., ... Wilson, A. B. (2001). Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal So. *Laboratory Animals*, 35(1), 1–41.
- Mosso, J. A., & Kruger, L. (1973). Receptor categories represented in spinal trigeminal nucleus caudalis. *J Neurophysiol*, 36(3), 472–488.
- Müller, L. J., Marfurt, C. F., Kruse, F., & Tervo, T. M. T. (2003). Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research*, 76(5), 521–542. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(03\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(03)00050-2)
- Müller, L. J., Vrensen, G. F., Pels, L., Cardozo, B. N., & Willekens, B. (1997). Architecture of human corneal nerves. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38(5), 985–994.
- Murata, Y., & Masuko, S. (2006). Peripheral and central distribution of TRPV1, substance P and CGRP of rat corneal neurons. *Brain Research*, 1085(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.035>
- N'Diaye, A. R., Leclerc, C., Kentache, T., Hardouin, J., Poc, C. D., Konto-Ghiorghi, Y., ... Feuilloley, M. G. J. (2016). Skin-bacteria communication: Involvement of the neurohormone Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in the regulation of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Scientific Reports*, 6(October). <https://doi.org/10.1038/srep35379>
- Nagano, S., Myers, J. A., & Hall, R. D. (1975). Representation of the cornea in the brain stem of the rat. *Experimental Neurology*, 49(3), 653–670.
- Nagano, T., Nakamura, M., Nakata, K., Yamaguchi, T., Takase, K., Okahara, A., ... Nishida, T. (2003). Effects of Substance P and IGF-1 in Corneal Epithelial Barrier Function and Wound

- Healing in a Rat Model of Neurotrophic Keratopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(9), 3810. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0189>
- Nakamura, A., Hayakawa, T., Kuwahara, S., Maeda, S., Tanaka, K., Seki, M., & Mimura, O. (2007). Morphological and immunohistochemical characterization of the trigeminal ganglion neurons innervating the cornea and upper eyelid of the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 34(3–4), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.05.005>
- Nakamura, M., Ofuji, K., Chikama, T. I., & Nishida, T. (1997). The NK1 receptor and its participation in the synergistic enhancement of corneal epithelial migration by substance P and insulin-like growth factor-1. *British Journal of Pharmacology*, 120(4), 547–552. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0700923>
- Nakamura, M., Ofuji, K., Chikama, T., & Nishida, T. (1997). Combined effects of substance P and insulin-like growth factor-1 on corneal epithelial wound closure of rabbit in vivo. *Current Eye Research*, 16(3), 275–278.
- Nishida, T., Nakamura, M., Ofuji, K., Reid, T. W., Mannis, M. J., & Murphy, C. J. (1996). Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *Journal of Cellular Physiology*, 169(1), 159–166. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199610\)169:1<159::AID-JCP16>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199610)169:1<159::AID-JCP16>3.0.CO;2-8)
- Orio, P., Parra, A., Madrid, R., González, O., Belmonte, C., & Viana, F. (2012). Role of Ih in the firing pattern of mammalian cold thermoreceptor endings. *Journal of Neurophysiology*, 108(11), 3009–3023. <https://doi.org/10.1152/jn.01033.2011>
- Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., Jurjus, R. A., Zieske, J. D., & Stepp, M. A. (2008). BALB/c and C57BL6 mouse strains vary in their ability to heal corneal epithelial debridement wounds. *Experimental Eye Research*, 87(5), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.08.013>
- Parra, A., Gonzalez-Gonzalez, O., Gallar, J., & Belmonte, C. (2014). Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain*, 155(8), 1481–1491. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.04.025>
- Parra, A., Madrid, R., Echevarria, D., del Olmo, S., Morenilla-Palao, C., Acosta, M. C., ... Belmonte, C. (2010). Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nature Medicine*, 16(12), 1396–1399. <https://doi.org/10.1038/nm.2264>
- Perl, E. R. (2007). Ideas about pain, a historical view. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(1), 71–80. <https://doi.org/10.1038/nrn2042>

- Pham, T. L., Kakazu, A., He, J., & Bazan, H. E. P. (2018). Mouse strains and sexual divergence in corneal innervation and nerve regeneration. *The FASEB Journal*, fj.201801957R. <https://doi.org/10.1096/fj.201801957R>
- Pin, S. S., & Bahr, B. A. (2008). Protein kinase C is a common component of CGRP receptor desensitization induced by distinct agonists. *European Journal of Pharmacology*, 587(1–3), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.083>
- Pinho-Ribeiro, F. A., Baddal, B., Haarsma, R., O’Seaghdha, M., Yang, N. J., Blake, K. J., ... Chiu, I. M. (2018). Blocking Neuronal Signaling to Immune Cells Treats Streptococcal Invasive Infection. *Cell*, 173(5), 1083–1097.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.006>
- Planells-Cases, R., Aracil, A., Merino, J. M., Gallar, J., Pérez-Payá, E., Belmonte, C., ... Ferrer-Montiel, A. V. (2000). Arginine-rich peptides are blockers of VR-1 channels with analgesic activity. *FEBS Letters*, 481(2), 131–136.
- 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>
- Pozo, M. A., Gallego, R., Gallar, J., & Belmonte, C. (1992). Blockade by calcium antagonists of chemical excitation and sensitization of polymodal nociceptors in the cat’s cornea. *The Journal of Physiology*, 450, 179–189.
- Purves, D. (2003). *Invitación a la neurociencia*. (D. Purves, Ed.). Editorial Medica Panamericana.
- Quallo, T., Vastani, N., Horridge, E., Gentry, C., Parra, A., Moss, S., ... Bevan, S. (2015). TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature Communications*, 6, 7150. <https://doi.org/10.1038/ncomms8150>
- Quinn, J. P., Kipar, A., Hughes, D. J., Bennett, E., Cox, H., McLaughlin, L., ... Stewart, J. P. (2011). Altered host response to murine gammaherpesvirus 68 infection in mice lacking the tachykinin 1 gene and the receptor for substance P. *Neuropeptides*, 45(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2010.10.004>
- Rama, P., & Sacchetti, M. (n.d.). Neurotrophic keratopathy. Retrieved March 7, 2018, from http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=EN&data_id=16681&disease=Neurotrophic-keratopathy&search=Disease_Search_Simple
- Reid, T. W., Murphy, C. J., Iwahashi, C. K., Foster, B. A., & Mannis, M. J. (1993). Stimulation of

- epithelial cell growth by the neuropeptide substance P. *Journal of Cellular Biochemistry*, 52(4), 476–485. <https://doi.org/10.1002/jcb.240520411>
- Rezaeian, A. H., Isokane, T., Nishibori, M., Chiba, M., Hiraiwa, N., Yoshizawa, M., & Yasue, H. (2009). alphaCGRP and betaCGRP transcript amount in mouse tissues of various developmental stages and their tissue expression sites. *Brain & Development*, 31(9), 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2008.10.011>
- Roland, P. (1992). Cortical representation of pain. *Trends in Neurosciences*, 15(1), 3–5. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(92\)90337-8](https://doi.org/10.1016/0166-2236(92)90337-8)
- Rosenblatt, M. I., Dahl, G. P., & Dickerson, I. M. (2000). Characterization and localization of the rabbit ocular calcitonin gene-related peptide (CGRP)-receptor component protein (RCP). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41, 1159–1167.
- Rosenfeld, M. G., Mermod, J.-J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., ... Evans, R. M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*, 304(5922), 129–135. <https://doi.org/10.1038/304129a0>
- Rosenthal, N., & Brown, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature Cell Biology*, 9(9), 993–999. <https://doi.org/10.1038/ncb437>
- Rózsa, A. J., & Beuerman, R. W. (1982). Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain*, 14(2), 105–120.
- Russell, F. A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X., & Brain, S. D. (2014). Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 94(4), 1099–1142. <https://doi.org/10.1152/physrev.00034.2013>
- Sabatino, F., Di Zazzo, A., De Simone, L., & Bonini, S. (2017). The Intriguing Role of Neuropeptides at the Ocular Surface. *The Ocular Surface*, 15(1), 2–14. <https://doi.org/10.1016/J.JTOS.2016.10.003>
- Sacchetti, M., & Lambiase, A. (2014). Diagnosis and management of neurotrophic keratitis. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 8, 571–579. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S45921>
- Sahu, S. K., Mittal, S. K., Foulsham, W., Li, M., Sangwan, V. S., & Chauhan, S. K. (2018). Mast Cells Initiate the Recruitment of Neutrophils Following Ocular Surface Injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(5), 1732. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23398>

- Sakamoto, K. (1951). Histological Study on the Innervation of the Human Cornea. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 54(2), 105–114. <https://doi.org/10.1620/tjem.54.105>
- Salmon, A. M., Damaj, I., Sekine, S., Picciotto, M. R., Marubio, L., & Changeux, J. P. (1999). Modulation of morphine analgesia in alphaCGRP mutant mice. *Neuroreport*, 10(4), 849–854.
- Salmon, A. M., Damaj, M. I., Marubio, L. M., Epping-Jordan, M. P., Merlo-Pich, E., & Changeux, J. P. (2001). Altered neuroadaptation in opiate dependence and neurogenic inflammatory nociception in alpha CGRP-deficient mice. *Nature Neuroscience*, 4(4), 357–358. <https://doi.org/10.1038/86001>
- Schaeffer, C., Vandroux, D., Thomassin, L., Athias, P., Rochette, L., & Connat, J.-L. (2003). Calcitonin gene-related peptide partly protects cultured smooth muscle cells from apoptosis induced by an oxidative stress via activation of ERK1/2 MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1643(1–3), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.09.005>
- Schermer, A., Galvin, S., & Sun, T. T. (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *The Journal of Cell Biology*, 103(1), 49–62.
- Schimmelpfennig, B. (1982). Nerve structures in human central corneal epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 218(1), 14–20.
- Schmid, E., Leierer, J., Doblinger, A., Laslop, A., Fischer-Colbrie, R., Humpel, C., ... Troger, J. (2005). Neurokinin A is a main constituent of sensory neurons innervating the anterior segment of the eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(1), 268–274. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0608>
- Schütz, B., Mauer, D., Salmon, A.-M., Changeux, J.-P., & Zimmer, A. (2004a). Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice. *The Journal of Comparative Neurology*, 476(1), 32–43. <https://doi.org/10.1002/cne.20211>
- Schütz, B., Mauer, D., Salmon, A.-M., Changeux, J.-P., & Zimmer, A. (2004b). Analysis of the cellular expression pattern of β -CGRP in α -CGRP-deficient mice. *Journal of Comparative Neurology*, 476(1), 32–43. <https://doi.org/10.1002/cne.20211>
- Segond von Banchet, G., Pastor, A., Biskup, C., Schlegel, C., Benndorf, K., & Schaible, H.-G. (2002). Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a

- subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 110(1), 131–145.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00547-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00547-4)
- Semeraro, F., Forbice, E., Romano, V., Angi, M., Romano, M. R., Filippelli, M. E., ... Costagliola, C. (2014). Neurotrophic keratitis. *Ophthalmologica. Journal International d'ophtalmologie. International Journal of Ophthalmology. Zeitschrift Für Augenheilkunde*, 231(4), 191–197.
<https://doi.org/10.1159/000354380>
- Sigelman, S., & Friedenwald, J. S. (1954). Mitotic and wound-healing activities of the corneal epithelium; effect of sensory denervation. *A.M.A. Archives of Ophthalmology*, 52(1), 46–57.
- Smith, E., & Lewin, G. (2009). Nociceptors: a phylogenetic view. *Journal of Comparative Physiology*, 195(12), 1089–1106. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0482-z>
- Smith, R. (2000). *Systematic evaluation of the mouse eye. Anatomy, pathology and biometrics*. CRC press LLC.
- Snow, P. J., Lumb, B. M., & Cervero, F. (1992). The representation of prolonged and intense, noxious somatic and visceral stimuli in the ventrolateral orbital cortex of the cat. *Pain*, 48(1), 89–99. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90135-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90135-X)
- Sousa-Valente, J., & Brain, S. D. (2018). A historical perspective on the role of sensory nerves in neurogenic inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 40(3), 229–236.
<https://doi.org/10.1007/s00281-018-0673-1>
- Spitzer, M. J. S., Reeh, P. W., & Sauer, S. K. (2008). Mechanisms of potassium- and capsaicin-induced axonal calcitonin gene-related peptide release: involvement of L- and T-type calcium channels and TRPV1 but not sodium channels. *Neuroscience*, 151(3), 836–842.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.030>
- Stanisic, S., Marocco, A., Gallo, A., Rama, P., Sacchetti, M., Rolando, M., ... Berto, P. (2018). Epidemiology and economic impact of moderate and severe neurotrophic keratopathy in Italy. *Global & Regional Health Technology Assessment*, XX, 1–8.
<https://doi.org/10.1177/2284240318777150>
- Stapleton, F., Marfurt, C., Golebiowski, B., Rosenblatt, M., Bereiter, D., Begley, C., ... Willcox, M. (2013). The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: Report of the subcommittee on neurobiology. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(11).
<https://doi.org/10.1167/iovs.13-13226>

- Steinhoff, M. S., von Mentzer, B., Geppetti, P., Pothoulakis, C., & Bunnett, N. W. (2014). Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiological Reviews*, *94*(1), 265–301.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2013>
- Stern, M. E., Beuerman, R. W., Fox, R. I., Gao, J., Mircheff, A. K., & Pflugfelder, S. C. (1998a). A unified theory of the role of the ocular surface in dry eye. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *438*, 643–651.
- Stern, M. E., Beuerman, R. W., Fox, R. I., Gao, J., Mircheff, A. K., & Pflugfelder, S. C. (1998b). The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea*, *17*(6), 584–589.
- Sun, R.-Q., Tu, Y.-J., Lawand, N. B., Yan, J.-Y., Lin, Q., & Willis, W. D. (2004). Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *Journal of Neurophysiology*, *92*(5), 2859–2866.
<https://doi.org/10.1152/jn.00339.2004>
- Sun, T.-T., Tseng, S. C., & Lavker, R. M. (2010). Location of corneal epithelial stem cells. *Nature*, *463*(7284), E10–1; discussion E11. <https://doi.org/10.1038/nature08805>
- Suzuki, T., Richards, S. M., Liu, S., Jensen, R. V., & Sullivan, D. A. (2009). Influence of sex on gene expression in human corneal epithelial cells. *Molecular Vision*, *15*, 2554–2569.
- Taha, J. M., Tew, J. M., & Buncher, C. R. (1995). A prospective 15-year follow up of 154 consecutive patients with trigeminal neuralgia treated by percutaneous stereotactic radiofrequency thermal rhizotomy. *Journal of Neurosurgery*, *83*(6), 989–993.
<https://doi.org/10.3171/jns.1995.83.6.0989>
- Tam, E. K., & Caughey, G. H. (1990). Degradation of Airway Neuropeptides by Human Lung Tryptase. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *3*(1), 27–32.
<https://doi.org/10.1165/ajrcmb/3.1.27>
- Tamura, Y., Konomi, H., Sawada, H., Takashima, S., & Nakajima, A. (1991). Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *32*(9), 2636–2644.
- Tanelian, D. L., & Beuerman, R. W. (1984). Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Experimental Neurology*, *84*(1), 165–178.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(84\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0014-4886(84)90013-X)

- Terenghi, G., Polak, J. M., Ghatei, M. A., Mulderry, P. K., Butler, J. M., Unger, W. G., & Bloom, S. R. (1985). Distribution and origin of calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the sensory innervation of the mammalian eye. *The Journal of Comparative Neurology*, *233*(4), 506–516. <https://doi.org/10.1002/cne.902330410>
- Tervo, K., Tervo, T., Eränkö, L., Vannas, A., Cuello, A. C., & Eränkö, O. (1982). Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *23*(5), 671–674.
- Tervo, T., Joó, F., Huikuri, K. T., Toth, I., & Palkama, A. (1979). Fine structure of sensory nerves in the rat cornea: an experimental nerve degeneration study. *Pain*, *6*(1), 57–70.
- Thoft, R. A., & Friend, J. (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *24*(10), 1442–1443.
- Toriyama, Y., Iesato, Y., Imai, A., Sakurai, T., Kamiyoshi, A., Ichikawa-Shindo, Y., ... Shindo, T. (2015). Pathophysiological Function of Endogenous Calcitonin Gene-Related Peptide in Ocular Vascular Diseases. *The American Journal of Pathology*, *185*(6), 1783–1794. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.017>
- Tran, M. T., Lausch, R. N., & Oakes, J. E. (2000). Substance P differentially stimulates IL-8 synthesis in human corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *41*, 3871–3877. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1361>
- Tran, M. T., Ritchie, M. H., Lausch, R. N., & Oakes, J. E. (2000). Calcitonin Gene-Related Peptide Induces IL-8 Synthesis in Human Corneal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, *164*(8), 4307–4312. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.8.4307>
- Troger, J., Kieselbach, G., Teuchner, B., Kralinger, M., Nguyen, Q. A., Haas, G., ... Schmid, E. (2007). Peptidergic nerves in the eye, their source and potential pathophysiological relevance. *Brain Research Reviews*, *53*(1), 39–62. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.06.002>
- Ueda, S., del Cerro, M., LoCascio, J. A., & Aquavella, J. V. (1989). Peptidergic and catecholaminergic fibers in the human corneal epithelium. *Acta Ophthalmol Suppl.*, *192*, 80–90.
- Ueta, M., Iida, T., Sakamoto, M., Sotozono, C., Takahashi, J., Kojima, K., ... Honda, T. (2007). Polyclonality of *Staphylococcus epidermidis* residing on the healthy ocular surface. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(1), 77–82. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46810-0>

- Uosokin, D., Furlan, A., Islam, S., Abdo, H., Lönnerberg, P., Lou, D., ... Ernfors, P. (2014). Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, *18*, 145.
- Uusitalo, H., Krootila, K., & Palkama, A. (1989). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactive sensory nerves in the human and guinea pig uvea and cornea. *Experimental Eye Research*, *48*(4), 467–475. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(89\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0014-4835(89)90030-4)
- van der Kleij, H. P. M., Ma, D., Redegeld, F. A. M., Kraneveld, A. D., Nijkamp, F. P., & Bienenstock, J. (2003). Functional Expression of Neurokinin 1 Receptors on Mast Cells Induced by IL-4 and Stem Cell Factor. *The Journal of Immunology*, *171*(4), 2074–2079. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.2074>
- van Ham, J. J., & Yeo, C. H. (1996a). The Central Distribution of Primary Afferents from the External Eyelids, Conjunctiva, and Cornea in the Rabbit, Studied Using WGA-HRP and B-HRP as Transganglionic Tracers. *Experimental Neurology*, *142*(2), 217–225. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0193>
- van Ham, J. J., & Yeo, C. H. (1996b). Trigeminal Inputs to Eyeblink Motoneurons in the Rabbit. *Experimental Neurology*, *142*(2), 244–257. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0195>
- Walls, A. F., Brain, S. D., Desai, A., Jose, P. J., Hawkings, E., Church, M. K., & Williams, T. J. (1992). Human mast cell tryptase attenuates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Biochemical Pharmacology*, *43*(6), 1243–1248. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90498-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90498-8)
- Wang, C., Fu, T., Xia, C., & Li, Z. (2012). Changes in Mouse Corneal Epithelial Innervation with Age. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *53*(8), 5077. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9704>
- Wang, J. (2018). Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell and Tissue Research*, *371*(3), 531–539. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2785-7>
- Wang, S. B., Hu, K. M., Seamon, K. J., Mani, V., Chen, Y., & Gronert, K. (2012). Estrogen negatively regulates epithelial wound healing and protective lipid mediator circuits in the cornea. *The FASEB Journal*, *26*(4), 1506–1516. <https://doi.org/10.1096/fj.11-198036>
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>

- Weller, K., Reeh, P. W., & Sauer, S. K. (2011). TRPV1, TRPA1, and CB1 in the isolated vagus nerve--axonal chemosensitivity and control of neuropeptide release. *Neuropeptides*, 45(6), 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2011.07.011>
- Whitewar, M. (1960). An electron microscope study of the cornea in mice, with special reference to the innervation. *Journal of Anatomy*, 94(Pt 3), 387–409.
- Yang, L., Sui, W., Li, Y., Qi, X., Wang, Y., Zhou, Q., & Gao, H. (2016). Substance P inhibits hyperosmotic stress-induced apoptosis in corneal epithelial cells through the mechanism of akt activation and reactive oxygen species scavenging via the neurokinin-1 receptor. *PLoS ONE*, 11(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149865>
- Yarwood, R. E., Imlach, W. L., Lieu, T., Veldhuis, N. A., Jensen, D. D., Klein Herenbrink, C., ... Bunnett, N. W. (2017). Endosomal signaling of the receptor for calcitonin gene-related peptide mediates pain transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706656114>
- Yokota, T., Koyama, N., & Matsumoto, N. (1985). Somatotopic distribution of trigeminal nociceptive neurons in ventrobasal complex of cat thalamus. *J Neurophysiol*, 53(6), 1387–1400.
- Yokota, T., Koyama, N., Nishikawa, Y., & Hasegawa, A. (1991). Trigeminal nociceptive neurons in the subnucleus reticularis ventralis. II. Ascending projection. *Neuroscience Research*, 11(1), 18–27.
- Yoon, J. J., Ismail, S., & Sherwin, T. (2014). Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World Journal of Stem Cells*, 6(4), 391–403. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.391>
- Yu, L.-C., Hou, J.-F., Fu, F.-H., & Zhang, Y.-X. (2009). Roles of calcitonin gene-related peptide and its receptors in pain-related behavioral responses in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(8), 1185–1191. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.03.009>
- Zelenka, P. S., & Arpitha, P. (2008). Coordinating cell proliferation and migration in the lens and cornea. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(2), 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2007.10.001>
- Zhang, H. G., & Ying, G.-S. (2018). Statistical approaches in published ophthalmic clinical science papers: a comparison to statistical practice two decades ago. *British Journal of Ophthalmology*, 0(June 2017), bjophthalmol-2017-311529.

<https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2017-311529>

Zhao, M., Song, B., Pu, J., Forrester, J. V., & McCaig, C. D. (2003). Direct visualization of a stratified epithelium reveals that wounds heal by unified sliding of cell sheets. *The FASEB Journal*, 17(3), 397–406. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0610com>

Zimmer, A., Zimmer, A. M., Baffi, J., Usdin, T., Reynolds, K., Konig, M., ... Mezey, E. (1998). Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2630–2635. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2630>







La presente Tesis Doctoral se defendió en el año en que se conmemoró el vigésimo aniversario de la constitución del Instituto de Neurociencias de Alicante como Centro Mixto entre la Universidad Miguel Hernández de Elche y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.