

FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**ALTERACIONES DE LA CALIDAD DEL FLUIDO LAGRIMAL
Y DE LA SENSIBILIDAD CORNEAL EN PACIENTES CON
SINDROME DE OJO SECO**

JOSÉ MANUEL GUAJARDO BEROÍZA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIAS**

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Remigio López S., Prof. Dr. Leonidas
Traipe C., Prof. Dr. Ramón Rodrigo S.**

2016

FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**ALTERACIONES DE LA CALIDAD DEL FLUIDO LAGRIMAL
Y DE LA SENSIBILIDAD CORNEAL EN PACIENTES CON
SINDROME DE OJO SECO**

JOSÉ MANUEL GUAJARDO BEROÍZA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIAS**

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Remigio López S., Prof. Dr. Leonidas
Traipe C., Prof. Dr. Ramón Rodrigo S.**

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

JOSÉ MANUEL GUAJARDO BEROÍZA

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas Mención Neurociencias en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día Viernes 8 de Enero de 2016.

Prof. Dr. Remigio López, Prof. Dr. Leonidas Traipe,

Prof. Dr. Ramón Rodrigo

Directores de Tesis

**Instituto de Ciencias Biomédicas
Fundación Oftalmológica Los Andes**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. María Eugenia Letelier

Prof. Dra. Julieta González

Prof. Dr. Juan Verdaguer

Prof. Dra. Jimena Sierralta

Presidente Comisión

A María Francisca, mi vocación y la razón de todo.

Agradecimientos

A los Tecnólogos Médicos Daniela López, Daniela Salinas y Christian Segovia.

Al Técnico de Laboratorio Diego Soto.

Al Ingeniero Mauricio Fuentes.

Financiamiento parcial Proyectos Fondecyt 1110325 y 1151005.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Materiales y métodos	17
Resultados	22
Discusión	41
Conclusión	45
Bibliografía	46
Anexos	53

RESUMEN.

Introducción: La salud corneal es esencial en el desempeño de la visión humana y la película lagrimal es un elemento central en esta función. Alteraciones de la calidad, cantidad o distribución del fluido lagrimal generan síntomas y signos con potencial daño de la superficie ocular catalogados como Síndrome de Ojo Seco (SOS). No existe claridad respecto de las alteraciones de la sensibilidad corneal y su relación con la calidad del fluido lagrimal, así como tampoco del papel de elementos antioxidantes de la lágrima en esta relación.

Objetivos: Explorar una relación entre el SOS y la calidad del fluido lagrimal, su capacidad antioxidante y la sensibilidad corneal objetiva.

Métodos. Se reclutaron 64 pacientes durante 18 meses en el Policlínico de la Fundación Oftalmológica Los Andes. Fueron informados y se les solicitó consentimiento escrito. Fueron excluidos quienes se negaron o presentaban enfermedades sistémicas, tabaquismo o uso de suplementos vitamínicos. A los candidatos se les aplicó el cuestionario “Ocular Surface Disease Index” (OSDI) y un examen Oftalmológico completo. Fueron incluidos en el grupo 1 (estudio) quienes presentaron OSDI >22 o ≥ 2 síntomas de SOS constante/frecuente, y ≥ 1 signo de SOS. El grupo 2 (control) quedó conformado por pacientes con OSDI nunca/rara vez en alguna categoría, y sin signos de SOS. Todos los sujetos incluidos fueron sometidos a estesiometría corneal, test de Ferning y obtención de lágrima. Además se analizó la osmolaridad y la capacidad reductora del Fe^{3+} [Ferric Reducing Ability of Tears (FRAT)] lagrimal.

Resultados: El grupo 1 presentó menor sensibilidad corneal y alteración de la calidad lagrimal. No se logró establecer una correlación entre la alteración de la sensibilidad corneal y al menos uno de los parámetros indicadores de la calidad lagrimal en este grupo.

ABSTRACT

Introduction: Human vision depends on corneal health and the tear film is a key feature in this balance. As a consequence of a disturbance in the amount, quality or distribution of tears, symptoms and clinical signs develop as a condition known as Dry Eye Syndrome (DES). The role of corneal sensitivity and how it relates to the quality of tear fluid, as well as the eventual contribution of its antioxidant defenses, are yet to be determined.

Objectives: To explore the relationship between DES and tear film quality, particularly its antioxidant capacity, and corneal sensitivity.

Methods: 64 patients were included during a 18 months recruitment period from Fundación Oftalmológica Los Andes general Ophthalmology clinic. Information regarding the study was provided and consent obtained. Patients with systemic diseases, smoking or under vitamin supplementation were excluded. Candidates were asked to answer the “Ocular Surface Disease Index” (OSDI) and subject to a full Ophthalmic exam. Patients with an OSDI index >22 or ≥ 2 DES constant symptoms, and ≥ 1 DES clinical sign were included in Group 1 (study). Whereas Group 2 (control) was constituted from individuals with at least one answer under the never/rarely category and no DES clinical signs. Corneal esthesiometry, tear Ferning test and tear fluid recollection were performed in all the patients. Tear film osmolarity and Ferric Reducing Ability of Tears (FRAT) were measured from the samples obtained.

Results: Group 1 presented a significantly lower corneal sensitivity and altered tear fluid quality. There was no correlation between corneal sensitivity and any of the tests performed to assess tear quality.

INTRODUCCIÓN

Una córnea saludable es esencial en el desempeño de la visión humana. Ella se encuentra expuesta al medio ambiente bajo el recubrimiento de una película lagrimal altamente organizada. Esta película cumple diversas funciones, entre las cuales podemos identificar la mantención de una adecuada hidratación del epitelio corneal preservando el equilibrio osmótico, lubricación de la interfase córneo-tarsal, lavado de partículas, provisión de oxígeno a la córnea, organización de una superficie lisa homogénea necesaria para la función refractiva de la córnea y provisión de sustancias antibacterianas y antioxidantes protectoras de la superficie ocular (1). La película lagrimal está constituida en un 99.78% por agua proveniente de las glándulas lagrimales principal y accesorias, en un 0.2% por mucina secretada por las células caliciformes del epitelio conjuntival y en un 0.02% por lípidos vertidos por las glándulas de Meibomio, Zeiss y Moll (2). En el componente acuoso se encuentran disueltos 5 a 7 mg/mL de proteínas (entre las que destacan enzimas bactericidas y antioxidantes, inmunoglobulinas, factores de crecimiento y albúmina), concentraciones iónicas que superan las plasmáticas, antioxidantes de bajo peso molecular y bajos niveles de glucosa (3). Topográficamente la película lagrimal se encuentra formada por 3 capas: la más externa es oleosa, de un espesor aproximado de 0,1 μm , la capa media acuosa posee un espesor de 7 μm y la interna de 0,03 μm , que es la mucinosa. Esta última se encuentra adherida al glicocálix de las células epiteliales corneales, facilitando la adhesión del resto de la película, y se diluye progresivamente hacia las capas más superficiales en forma de un gradiente de mucinas las que desaparecen del todo a nivel de la capa oleosa (2, 3).

Definición y patogenia del Síndrome de Ojo Seco (SOS). La estructura multilaminar que constituye la lágrima es dinámicamente redistribuida a lo largo de la superficie anterior del ojo con cada parpadeo, manteniéndose un equilibrio entre secreción, evaporación y frecuencia de parpadeo (2, 4). En condiciones normales esta estructura se mantiene entre cada parpadeo lo cual permite asegurar la superficie refractiva de la córnea y preservar la salud de ella y de la conjuntiva que la rodea (5, 6). En aquellas situaciones en que este fluido se altera en su cantidad, calidad o distribución se produce un conjunto de condiciones que agrupamos como el

Síndrome de Ojo Seco (SOS) (2). Este es uno de los problemas más frecuentemente observados en la atención de pacientes oftalmológicos. Según diversos estudios, entre un 10% a 20% de la población de más de 45 años reportan síntomas característicos de esta condición; su frecuencia aumenta con la edad, predomina en el género femenino y su origen es considerado como multifactorial (7, 8, 9, 10). El SOS fue redefinido recientemente en el año 2007 por el *International Dry Eye WorkShop* como una “enfermedad multifactorial de las lágrimas y superficie ocular que produce síntomas de discomfort y molestia visual, e inestabilidad de la película lagrimal con potencial daño a la superficie ocular. Se acompaña de un aumento en la osmolaridad lagrimal e inflamación de la superficie ocular” (2).

En el desarrollo del SOS se ve involucrada la Unidad Funcional Lacrimal, que comprende todas las estructuras del polo anterior del ojo, incluyendo la película lacrimal, la superficie ocular, las glándulas lacrimales principales y los circuitos reflejos neurales (2, 11). La reducción en la producción de la lágrima, el aumento de la evaporación y la inestabilidad de la película lagrimal son considerados como los factores iniciadores. La menor producción puede deberse a diversos factores comúnmente agrupados en: a) hiposecreción por síndrome de Sjögren (SS) y b) no asociados a SS, para distinguir entre aquellos en los que el factor detonante de este síndrome es la destrucción autoinmune de las glándulas lagrimales y no otras causas de hiposecreción, como son la obstrucción de las glándulas o la alteración del reflejo de lagrimeo (2). Puede ocurrir también, aumento de la evaporación de la lágrima lo cual puede deberse a: a) factores intrínsecos como deficiencia en la síntesis de la capa oleosa y alteraciones relacionadas a la oclusión palpebral y b) factores extrínsecos como el uso de lentes de contacto y preservantes en colirios, entre otros. El aumento de la osmolaridad lagrimal, consecuencia de la menor cantidad de agua en la misma, altera el equilibrio isotónico entre la película lagrimal y el epitelio corneal subyacente. Esto produce una deshidratación patológica de las células epiteliales, la cual puede ser compensada temporalmente a expensas de la incorporación de nuevos solutos al medio intracelular. Si esta alteración del equilibrio entre epitelio y lágrima no es compensada con un suministro de solutos compatibles con el fluido lagrimal, en el largo plazo se producirá la muerte celular y el inicio de una cascada de

eventos, que mediante estimulación y lesión nerviosa, generarán los síntomas iniciales de alteración de la superficie ocular, así como eventos compensadores. Si estas alteraciones se prolongan en el tiempo, ocurrirá un bloqueo neurosecretorio de la glándula lagrimal amplificando y perpetuando el círculo vicioso al reducir el flujo lagrimal y aumentando aún más la osmolaridad (2).

Control neural de la secreción lagrimal y SOS. La producción lagrimal depende en primera instancia de la innervación adecuada de las glándulas lagrimales, epitelio conjuntival y corneal. La glándula lagrimal posee innervación sensitiva dada por el nervio lagrimal, ramo de la división oftálmica del trigémino (V_1), también recibe innervación vasomotora simpática y secretomotora parasimpática provenientes del nervio facial (VII) (11, 12). La córnea y conjuntiva están innervadas por un número relativamente pequeño de fibras nerviosas sensitivas primarias provenientes del ganglio trigeminal ipsilateral, alrededor de 70 a 80 nervios, ramos de los nervios ciliares cortos y anteriores, ingresan a la córnea a nivel del estroma periférico. Estos nervios pierden la vaina de mielina alrededor de 2 a 3 mm desde de su ingreso, permaneciendo sin embargo, rodeados por las células de Schwann. Posterior a esto ocurre una importante ramificación de terminales nerviosas, que hacen de la córnea el tejido más densamente innervado del cuerpo, conformando tres redes: una profunda en el estroma medio, una subepitelial a nivel de la capa de Bowman y la más superficial a nivel del epitelio corneal. En esta última las fibras nerviosas pierden su cobertura de células de Schwann para terminar como fibras nerviosas desnudas particularmente sensibles, emergiendo entre las células epiteliales (13, 14, 15, 16). La inspección histológica de los nervios corneales ha demostrado que son homogéneos en su estructura; sin embargo, su análisis bajo técnicas de tinción inmunohistoquímica demuestra la presencia de distintos neuropéptidos en los somas, lo cual sugiere su heterogeneidad funcional. A grandes rasgos, alrededor de un 60% de los nervios corneales son inmunoreactivos al Péptido Relacionado al Gen de la Calcitonina (CGRP) y un 20 % de ellos lo son a la sustancia P (17). Adicionalmente, estudios electrofisiológicos demuestran que un 20% de las fibras nerviosas corneales corresponden al tipo mecano-nociceptoras, fibras mielinizadas que responden exclusivamente a estímulos mecánicos de una intensidad cercana a la necesaria

para dañar el epitelio corneal, posiblemente las fibras responsables de la sensación dolorosa evocada por el contacto mecánico contra la superficie corneal. El 70% de las fibras corneales corresponden a fibras polimodales nociceptivas, tipo C no mielinizadas, que además de responder a estímulos táctiles cercanos a los dañinos, lo hacen al calor, químicos irritantes exógenos y una gran variedad de mediadores químicos endógenos liberados por células epiteliales dañadas, células inflamatorias y del plasma filtrado de los vasos limbares. Estas fibras a diferencia de las mecanonociceptores, además de codificar para la presencia del estímulo, transmiten información acerca de su duración e intensidad, de modo que posiblemente contribuyen a la percepción dolorosa de la estimulación mecánica corneal, pero adicionalmente son la principal fuente de actividad nerviosa causada por irritación química y térmica, a la vez que la sensación dolorosa persistente frente a la liberación sostenida local de mediadores inflamatorios. Entre el 10% y 15% restante de las fibras sensitivas corneales corresponden a receptores sensibles al frío, fibras no mielinizadas del tipo $A\delta$ y C, que presentan descargas eléctricas en forma continua frente a variaciones de temperatura cercanas a 1°C; estímulos fríos aumentan su frecuencia de descarga y aumentos de temperatura las silencian momentáneamente (14, 16). Todas las fibras polimodales nociceptivas, incluyendo las corneales, poseen la característica particular de disminuir su umbral de excitación, aumentar su respuesta y presentar actividad espontánea, fenómeno denominado sensibilización (14, 18). La sensibilización ocurre como fenómeno secundario a la liberación de mediadores inflamatorios endógenos desde células dañadas, células gliales e inflamatorias vecinas. Del gran número de mediadores inflamatorios conocidos, sólo unos pocos han sido demostrados como responsables de producir este fenómeno a nivel de las terminaciones nerviosas de la córnea, entre los que destacan las prostaglandinas y la bradiquinina. Por otra parte, las neuronas peptidérgicas nociceptivas, dentro de las cuales al menos un 80% de los nervios corneales califican, al ser vigorosamente estimuladas liberan mayores cantidades de CGRP y sustancia P, provocando vasodilatación, extravasación de plasma y estimulación de la liberación de citoquinas por células locales; esto contribuye a la inflamación local inicial, fenómeno denominado inflamación neurogénica (14, 18).

Adicionalmente, este fenómeno local podría propagarse a otras áreas no estimuladas de la córnea, debido a la transmisión antidrómica del impulso nervioso que se ha evidenciado, ocurre en las fibras polimodales peptidérgicas como fenómeno adicional a la transmisión centrípeta del mismo (19, 20). Adicionalmente a la densa inervación sensitiva, la córnea presenta fibras nerviosas simpáticas que ingresan de la misma forma que el resto, pero provenientes del plexo simpático carotídeo, y poseen un rol fundamental en la regulación del metabolismo, proliferación y regeneración del epitelio corneal (16, 17).

La secreción lagrimal presenta dos componentes, una secreción basal y otra refleja. La basal es mantenida por el tono parasimpático secretomotor de las glándulas lagrimales principales y accesorias, el aporte propio de las células caliciformes conjuntivales y la inervación y actividad metabólica basal de las glándulas de Meibomio, Zeiss y en menor medida las de Moll (11, 12). La secreción refleja es producto del adecuado funcionamiento de un reflejo neural cuya vía aferente involucra principalmente los ramos sensitivos corneales y extracorneales provenientes de V₁ y su vía eferente correspondiente a las fibras parasimpáticas de las glándulas lagrimales (11). La alteración de esta vía neural a nivel ocular, el llamado bloqueo reflejo sensitivo, da cuenta de un tipo de SOS por hiposecreción no Sjögren, frecuentemente observado en la práctica clínica. Ejemplos de esta condición son el daño neural en la microangiopatía secundaria a Diabetes mellitus, el trauma asociado al uso de lentes de contacto o a la sección de terminaciones nerviosas en relación a la formación del flap corneal para la realización de Laser *in situ* keratomileusis (LASIK). Todos estos escenarios tienen en común la alteración del estímulo sensitivo proveniente de la superficie ocular lo que favorece el SOS de dos modos, primero reduciendo la secreción lagrimal refleja y segundo aumentando la pérdida por evaporación al disminuir la frecuencia del parpadeo.

Existe muy poca evidencia empírica en el estudio de la sensibilidad corneal de pacientes con SOS sin bloqueo reflejo sensitivo y aunque ésta indica que se encuentra alterada, se desconoce en qué medida ésta sería la causa o una consecuencia del mismo (11, 21, 22, 23, 24, 25). Sumado a esto, la escasa evidencia

en este respecto es en cierto modo contradictoria, ya que tanto hiposensibilidad como hipersensibilidad corneal han sido observadas. La presencia de hiperestesia corneal puede explicarse por varios mecanismos, debido a la epitelopatía asociada al SOS o queratitis sicca, que al implicar una pérdida de la barrera epitelial de la córnea ofrece un acceso más directo a las terminaciones nerviosas dejándolas absolutamente desnudas tanto de mucina como de lágrima (18, 23, 24, 25). Adicionalmente la inflamación asociada al SOS aumenta la frecuencia de descarga, disminuye el umbral sensitivo y genera descargas espontáneas de los terminales sensitivos corneales polimodales, en el fenómeno de sensibilización ya explicado previamente. En el caso de la hipoestesia, esta sería una consecuencia del daño a la superficie ocular, que trascendiendo más allá de una lesión inicial al epitelio, generaría una reducción de las terminales sensitivas corneales funcionalmente intactas. Esto explicaría tanto la hipoestesia como la sensación de discomfort e irritación, dado que estas fibras dañadas se encontrarían en distintos estadios de regeneración (18, 23, 24, 25).

Estrés oxidativo, antioxidantes y SOS. Existe evidencia de que al igual que en numerosas otras patologías oculares y extraoculares, el SOS presenta un desbalance del estado redox, el que eventualmente daría cuenta del desarrollo, mantención o agravamiento de esta condición (26, 27, 28). El equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes puede verse alterado tanto por un exceso de los primeros como por una depleción de los segundos. Cuando esto ocurre estamos frente a estrés oxidativo y esto implica que se ha sobrepasado la capacidad antioxidante celular (29). Entre las especies oxidantes de mayor importancia en el organismo se encuentran: a) las especies reactivas del oxígeno (EROs) y las derivadas del nitrógeno (ERNs). Las EROs se generan por reducción parcial del oxígeno molecular y forman parte de este grupo entre otras el peróxido de hidrógeno H_2O_2 y las especies radicalarias anión superóxido $O_2^{\cdot-}$, radical hidroxilo HO^{\cdot} y radical peróxido ROO^{\cdot} . Las ERNs se generan en menor cantidad que las EROs y se originan principalmente a través del sistema óxido nítrico sintasa que produce óxido nítrico (NO), el que reacciona con el anión superóxido para formar el radical peroxinitrito.

Estas especies oxidantes cumplen diversas funciones fisiológicas (acciones bactericida, viricida, vasopresora, regulatoria de la expresión de ciertos genes, entre otras). Sin embargo, bajo condiciones de generación excesiva y/o remoción deficiente de dichas especies, éstas provocan modificaciones oxidativas de las macromoléculas biológicas: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando de su estructura y funciones, lo cual puede conducir a la muerte celular (29, 30).

Fuentes endógenas de generación de especies reactivas del oxígeno (EROs).

La activación del oxígeno molecular a sus especies radicalarias anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y radical hidroxilo ($\cdot OH$), ocurre en la célula bajo condiciones aeróbicas. Bajo condiciones fisiológicas, la reducción parcial del oxígeno a sus especies radicalarias puede ocurrir a distintos niveles catalizada por oxidasas, en el citosol por la xantina-oxidasa, en la mitocondria por la monoamino-oxidasa y en el retículo endoplásmico, a través del sistema oxidativo del citocromo P_{450} (29). Fuentes no enzimáticas de generación de EROs de relevancia para la superficie anterior del ojo son los estados de hipoxia o hiperoxia, la radiación UV, el uso de algunos fármacos y las reacciones de Haber Weiss y Fenton (29). En estas reacciones los metales de transición tales como el hierro y el cobre pueden generar especies radicalarias del oxígeno. Estas reacciones están representadas por las ecuaciones siguientes:



En condiciones fisiológicas normales, al ingresar estos metales a la célula, se unen a diferentes moléculas formando complejos que los mantienen en estado ligado y, por lo tanto, no tóxicos. Sin embargo, bajo condiciones de estrés oxidativo, se debilita la estabilidad de los complejos formados, provocando la liberación de los iones metálicos al medio, potenciando el estrés oxidativo (29)

Fuentes endógenas de remoción de especies radicalarias. El exceso de las especies reactivas del oxígeno no siempre provoca daño celular, debido a que existen diferentes mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos conducentes, ya sea a prevenir la oxidación de macromoléculas por acción de los radicales libres o a reparar o remover los productos de oxidación formados. Entre los mecanismos enzimáticos podemos mencionar a la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del anión superóxido a agua oxigenada, la glutatión-peroxidasa (GP), que reduce hidroperóxidos a alcoholes y la catalasa (CAT), que reduce agua oxigenada a H₂O. Entre los mecanismos no enzimáticos destacan sustancias antioxidantes tales como el glutatión reducido (GSH) y la vitamina E (29, 31).

Diversos estudios han demostrado que la lágrima no es una fuente importante de antioxidantes enzimáticos, posee una escasa actividad SOD y no se ha demostrado la existencia de actividad GP como tampoco de CAT. Sin embargo, posee antioxidantes no enzimáticos, entre los que se encuentran vitamina C, GSH, ácido úrico, cisteína, tirosina y lactoferrina (32, 33, 34).

Dada su naturaleza de gran exposición al medio ambiente y a radiación UV, la córnea es un tejido especialmente susceptible al aumento de radicales libres (34). Específicamente en el SOS se ha encontrado un exceso de EROs a nivel celular, específicamente en el epitelio y el estroma. Aún más, estudios clínicos han demostrado que el uso de antioxidantes en forma sistémica mejora tanto la estabilidad de la película lagrimal como la salud conjuntival (35, 36); el uso de antioxidantes tópicos también han demostrado una mejoría en forma segura y bien tolerada tanto en factores subjetivos como objetivos del SOS (37).

Es posible que la alteración de la sensibilidad corneal observada en pacientes portadores de SOS sea debida a una interacción entre diversos mediadores inflamatorios, estrés oxidativo y modificaciones de la morfología y conducción nerviosa de los axones y terminales sensitivos a nivel corneal. La medición individual de distintos mediadores inflamatorios en la lágrima es una tarea lenta y engorrosa. En el intento por medir el conjunto de aquellos mediadores que poseen un efecto en

el terminal nervioso podemos postular como una representación general de ellos a la actividad antioxidante de la lágrima. Este es un fluido de obtención fácil y poco invasiva, condiciones necesarias en un estudio clínico en pacientes de otro modo sanos. Es más, no existe a nuestro saber ningún estudio clínico que haya intentado dilucidar una posible relación entre la sintomatología del SOS, la sensibilidad corneal objetiva y la capacidad antioxidante a nivel de la película lagrimal.

Técnicas de medición de estrés oxidativo. Numerosas técnicas han sido descritas con objeto de medir la capacidad antioxidante de fluidos corporales, tales como mediciones en el consumo local de oxígeno y quimioluminiscencia (38). Sin embargo, estas mediciones requieren de equipamiento especializado, una alta demanda de tiempo y costos elevados, sin mencionar que la cantidad de fluido necesario para realizar mediciones precisas es grande en relación a la producción de lágrima en condiciones basales (38, 39). La medición de la capacidad reductora de hierro del plasma (FRAP, Ferric reducing ability of plasma) constituye un método eficiente y rápido para la descripción de las defensas antioxidantes en el plasma. La técnica de FRAP ha sido ampliamente validada, como también aplicada en el estudio de otros fluidos corporales, entre ellos la lágrima (39, 40, 41). Este método consiste en la exposición del complejo Tri-piridil-triazina férrico (Fe^{+3} -TPTZ) a bajo pH a un antioxidante capaz de reducir el complejo Fe^{+3} -TPTZ a TPTZ ferroso (Fe^{+2} -TPTZ). Este último es de color azul y posee una absorbancia máxima a 593 nm de longitud de onda (40). Esta es una reacción inespecífica en presencia de un exceso de Fe^{+3} -TPTZ; la etapa limitante la constituye la formación de Fe^{+2} -TPTZ y la intensidad de la coloración azul es directamente proporcional al poder reductor de la muestra que se ha expuesto al complejo férrico (40).

Una modificación para la aplicación de la medición de FRAP en fluido lagrimal (FRAT, Ferric reducing ability of tears) ha sido previamente descrita para volúmenes de 25 μl del mismo, obtenidos posterior al reflejo de bostezo mediante tubos capilares (42). Sin embargo, parece importante conocer el estado de la lágrima basal dado que la evidencia indica que esta es la que se encontraría alterada en el SOS y existen diferencias relevantes en la composición de ambas (3, 43). En la práctica,

dado el bajo flujo de producción lagrimal y el escaso volumen de reservorio no es posible obtener más de 10 μL de este fluido sin estimular significativamente la producción de lágrima refleja. Por lo tanto, para el estudio clínico de sujetos individuales parece esencial contar con un método de medición de capacidad antioxidante de la lágrima lo suficientemente sensible como para estimar fielmente su valor en un volumen por debajo de 5 μL . En la actualidad, las técnicas publicadas utilizan volúmenes mayores, por lo que requieren de la disponibilidad de un pool de lágrimas con recolecciones repetidas de un mismo individuo, esto al sobreestimar e inflamar la superficie ocular puede alterar significativamente los componentes de la misma.

Recientemente se ha descrito una novedosa técnica de recolección de fluido lagrimal mediante el uso de un pequeño cubo de poliuretano estéril, de 2 mm de altura, el cuál es alojado en el fondo de saco tarsal inferior para luego ser centrifugado obteniendo en promedio 15 μl de fluido lagrimal en sujetos sanos (44). Esta técnica facilita la recolección de lágrima basal y a diferencia de otros métodos no daña la conjuntiva, logrando así una muestra de lágrima mínimamente inducida, más apropiada para estudiar los fenómenos presentes en ella en condiciones de patología ocular superficial (38, 44). Un beneficio adicional del uso de mini esponjas es que permite la recolección de lágrima de varios sujetos experimentales por un mismo individuo con un mínimo de entrenamiento, siendo a la vez más segura y tan reproducible y válida como otras técnicas (44).

Diagnóstico de SOS. Actualmente se ha desarrollado una clasificación del diagnóstico en conjunto con guías clínicas para la evaluación clínica y la respuesta del SOS al tratamiento (1, 45). La principal división propuesta es entre SOS hiposecretor y evaporativo. En la evaluación clínica del primero cobran especial relevancia la cuantificación de la producción lagrimal mediante el test de Schirmer, el patrón de tinción por exposición del epitelio corneal y conjuntival con verde Lisamina o Rosa de Bengala y la queratopatía filamentosa, mientras que en el segundo lo hacen la disminución del tiempo de ruptura de la película lagrimal (BUT), la disfunción Meibomiana y el patrón lineal de tinción con las tinciones mencionadas del

epitelio corneal, conjuntival y del borde palpebral. Puesto que sólo el 57% de los pacientes con sintomatología característica de SOS presentan signos objetivos al examen clínico, el uso de cuestionarios validados es esencial también en el diagnóstico inicial de la enfermedad, constituyendo un método de alta sensibilidad y especificidad para estos fines (2).

Dado lo relevante de la sintomatología del SOS diversos cuestionarios han sido elaborados con el objetivo de diagnosticar y clasificar la enfermedad de acuerdo a su severidad. De ellos el primer cuestionario con propiedades psicométricas publicado fue el de McMonnies, sin embargo, este fue utilizado fundamentalmente como un método de tamizaje y no ha permitido evaluar el efecto de la enfermedad en la capacidad visual, por lo que no permite establecer severidad de la enfermedad (46). Un cuestionario más reciente, ampliamente utilizado y validado corresponde al "Ocular Surface Disease Index" (OSDI) (47). Este consiste en un cuestionario de 12 preguntas dirigidas a obtener una medición rápida de la sintomatología irritativa compatible con SOS y su impacto en la función visual, a partir de las cuales se genera un puntaje según el cual los pacientes son clasificados como libres de enfermedad o portadores de sintomatología leve, moderada o severa (47).

Diversos exámenes de apoyo se han utilizado en el diagnóstico de SOS. El test de Schirmer consiste en la medición estandarizada de la producción lagrimal basal o mixta por medio de la aplicación de un papel absorbente en el fondo de saco palpebral inferior con o sin la aplicación de anestesia tópica. El Tiempo de Ruptura de la Película Lagrimal (BUT) corresponde a la cuantificación del tiempo que demora la película lagrimal teñida con fluoresceína en desintegrarse sobre el epitelio corneal. La observación del patrón corneal y conjuntival de tinción con colorantes vitales como el verde Lisamina o la Rosa de Bengala y la citología conjuntival provee información cualitativa y cuantitativa respecto de la etiología y severidad del cuadro (48). La medición de la osmolaridad lagrimal se considera hoy un complemento en el diagnóstico de SOS y adicionalmente podría tener un rol en determinar la severidad de la enfermedad (45, 48, 49). Una película lagrimal hipertónica se entiende como el evento responsable del daño inicial a la superficie ocular, y por ende su presencia

constituiría una función integradora, resultado de la secreción, drenaje, absorción y evaporación lacrimal (50).

El test de Ferning consiste en la calificación de una imagen de morfología arborizante observada al microscopio al permitir el secado espontáneo de una pequeña gota de fluido corporal sobre una lámina de vidrio. Esta imagen se cree es formada por la interacción entre los electrolitos lacrimales y diversas macromoléculas presentes en ella, tales como proteínas (51). La morfología de las imágenes observadas ha sido clasificada por diversos autores, pero la clasificación propuesta por Rolando para los patrones observados sigue siendo la más popular, principalmente por su alta reproducibilidad (51, 52, 53). En ella se establecen cuatro patrones de organización, que van desde una abundante arborización o patrón tipo I hasta escasas imágenes con muchos espacios vacíos y pequeños islotes de mucus o patrón tipo IV (54). Diversos estudios revelan que el test presenta una alta sensibilidad, cercana al 90%, y especificidad entre 75 y 89% en el diagnóstico del SOS (51).

La estesiometría Cochet-Bonnet corresponde a la aplicación de un monofilamento de longitud decreciente con una fuerza constante, de modo de registrar la longitud a la cuál el paciente percibe el estímulo (24). Este valor así obtenido es una medida objetiva del nivel de sensibilidad corneal tanto en pacientes sanos como con patologías en las cuales esta función se vea alterada. Diversos reportes empíricos proveen evidencia de que la sensibilidad corneal se encuentra alterada en los pacientes con ojo seco, sin embargo, la evidencia que respalda este hecho es en cierto modo contradictoria ya que se ha reportado tanto una reducción como un aumento de la sensibilidad corneal (21, 22, 23, 24, 25, 49, 55). Sin embargo, estos resultados han sido obtenidos con diversos métodos de valoración de la sensibilidad corneal, tanto de contacto como libres de él, y sólo estos últimos han demostrado hiperestesia corneal. Esto podría explicarse por el hecho de que el estesiómetro libre de contacto es capaz de estimular fibras nociceptivas polimodales en forma aislada, mientras que el de contacto incluye todas aquellas que responden a estímulos mecánicos cercanos al daño. Se ha hipotetizado que una hipoestesia

corneal podría generar una disfunción del reflejo responsable del parpadeo y secreción lagrimal, lo que causaría un mayor tiempo de exposición de la película lagrimal al medio con pérdida de sus funciones. Por otra parte la sensibilidad de la respuesta táctil de las fibras sensitivas corneales puede ser modificada y en efecto aumentada por daño o inflamación de la superficie corneal. Este proceso se denomina sensibilización, ocurre como consecuencia de la aplicación de estímulos nocivos, y es una característica de las fibras nociceptivas polimodales, entre las que se incluyen el 70% de las fibras nerviosas corneales (56, 57). Se piensa que esta sensibilización es también consecuencia de la alteración de la permeabilidad iónica de los terminales sensitivos producto del efecto de la liberación de mediadores inflamatorios locales (18). De este modo ambas condiciones, hipo e hiperestesia podrían ser observadas en pacientes con SOS que probablemente responderían a distintas etiologías, etapas o severidad dentro de un continuo de enfermedad.

HIPÓTESIS

En pacientes con SOS existe una menor sensibilidad corneal de contacto, acompañada de alteraciones en la calidad del fluido lagrimal e inferior capacidad antioxidante, en comparación con un grupo control de pacientes sanos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación entre SOS con la calidad del fluido lagrimal, su capacidad antioxidante y la sensibilidad corneal objetiva.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar un método de medición de capacidad antioxidante de la lágrima aplicable al estudio clínico de individuos.
2. Determinar las alteraciones de la sensibilidad corneal objetiva en pacientes con SOS respecto a una población de sujetos normales.
3. Caracterizar la calidad del fluido lagrimal en un grupo control de sujetos normales a través de la osmolaridad lagrimal, test de Ferning y FRAT.
4. Caracterizar la calidad del fluido lagrimal en un grupo de pacientes con SOS a través de la osmolaridad lagrimal, test de Ferning y FRAT.
5. Determinar la existencia de asociación entre el FRAT y la sensibilidad corneal objetiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes, diagnóstico de SOS y recolección de fluido lagrimal. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y las autoridades académicas de la Fundación Oftalmológica Los Andes. Se realizó el reclutamiento de pacientes en el policlínico de atención Oftalmológica General de la Fundación Oftalmológica Los Andes durante un período de 18 meses. A todos los pacientes con diagnóstico de ojo seco se les presentó un formulario con información y preguntas respecto del estudio y se les solicitó su consentimiento por escrito. Fueron excluidos aquellos que se negaron a participar por motivos personales, portadores de enfermedades sistémicas crónicas que cursen con alteraciones de la sensibilidad corneal e inflamación de la glándula lagrimal o superficie ocular, fumadores, usuarios de suplementos vitamínicos y presencia de patología corneal conocida asociada a bloqueo reflejo sensitivo (tabla 1). A los pacientes candidatos se les aplicó el cuestionario OSDI, para posteriormente ser sometidos a un examen Oftalmológico completo, incluyendo una evaluación clínica estandarizada para SOS que consideró test de Schirmer (papel absorbente Farmacia Reccius, Chile), BUT (cintas de Fluoresceína farmacia Reccius, Chile) y tinción con verde Lisamina (cintas de verde Lisamina Beaver-Visitec International, Inc). Fueron incluidos en el grupo 1 o grupo estudio aquellos pacientes que presentaron un puntaje mayor a 22 en el OSDI o declararon haber presentado al menos dos síntomas de ojo seco en forma constante o frecuente, y que presentaron al menos un signo objetivo de SOS. El grupo 2 o control fue conformado por aquellos pacientes que en el OSDI nunca respondieron o lo hicieron rara vez, y que no mostraron ningún signo objetivo de SOS en la evaluación clínica.

Tabla 1. Criterios de exclusión

Condición	Causa
Hipolacrimia	Edad > 50 años Síndrome de Sjögren Sarcoidosis VIH Ablación/denervación glándula lagrimal Enfermedad injerto contra huésped Penfigoide ocular cicatrizal Eritema multiforme Causticación térmica/química superficie ocular
Reducción sensibilidad corneal	Uso de lentes de contacto reciente (<6 m) Cirugía corneal (queratoplastia penetrante y lamelar, cirugía fotorrefractiva/fototerapéutica reciente <12 m) Herpes corneal Queratitis neurotrófica (lesión nervio trigeminal) Parálisis nervio facial Diabetes mellitus 1 y 2 Medicamentos sistémicos (β -bloqueadores, diuréticos, antiespasmódicos, antihistamínicos, antidepresivos tricíclicos, inhibidores de la recaptura de serotonina)
Disfunción meibomiana	Acné Rosácea Psoriasis Medicamentos (retinoides)

Luego del reclutamiento a todos los pacientes se les citó a una nueva evaluación, debiendo suspender el uso de colirios por al menos 72 horas previo a ella. Durante esta cita se realizó la estesiometría corneal y se obtuvieron las muestras de fluido lagrimal. Muestras de 7-10 μ l de fluido lagrimal fueron obtenidas de todos los pacientes, mediante la técnica de mini-esponjas de poliuretano sanitizadas alojadas en el fondo de saco tarsal inferior, de acuerdo al método descrito por López y cols (44). En términos generales se localizó un cilindro de esponja de 2 mm de diámetro y longitud en el fondo de saco inferior por 5 minutos para luego ser exprimida por centrifugación a 605 g durante 3 minutos. Las muestras fueron analizadas de inmediato o almacenadas en congelador (-80° C) hasta su uso en un plazo no superior a 30 días.

Medición de la osmolaridad lagrimal. La osmolaridad de muestras frescas de fluido lagrimal fue evaluada mediante el nanosmolímetro TearLab (®TearLab Corporation 2015) que estima la osmolaridad de una solución mediante impedanciometría corregida por temperatura. En breve, el nanosmolímetro consiste en una estructura similar a un lápiz grueso en cuyo extremo superior se aloja una tarjeta de medición intercambiable la cual se acerca cuidadosamente para tomar contacto con el menisco lagrimal inferior a nivel de la hendidura interpalpebral de un paciente sin anestesia. La medida se obtiene de forma inmediata, siendo registrada en la base de datos.

Test de Ferning lagrimal. Alícuotas de 1 μ l de lágrima se depositaron sobre un portaobjetos previamente secado con alcohol isopropílico, permitiéndoseles secar en forma espontánea a una temperatura y humedad relativa ambiente de 20° C y bajo 60% respectivamente. Posteriormente la muestra de lágrima seca se observó y fue clasificada de acuerdo a la graduación propuesta por Rolando en un microscopio de campo oscuro a una magnificación de 23x (51-53).

Estesiometría Cochet-Bonnet. El estesiómetro de contacto Cochet-Bonnet (®Luneau) es el único método disponible en el mercado para la cuantificación de la sensibilidad corneal de contacto y se encuentra ampliamente validado (58, 59). Consiste en un aparato similar a un portaminas de acero que en su interior contiene

un monofilamento de nylon de 0,12 mm de diámetro constante extensible a una longitud variable de 0-60 mm. El procedimiento se realiza aplicando presión axial oponente al centro de la córnea cuya magnitud variará proporcionalmente según la longitud del filamento de acuerdo a una escala de conversión previamente descrita (60). Los pacientes fueron sentados frente a un biomicroscopio y se les solicitó mirar fijamente al frente, en este momento se avanzó el filamento del estesiómetro en forma perpendicular a la superficie corneal hasta hacer contacto durante un segundo observando la aparición del reflejo corneal. El procedimiento se repitió incrementando la presión ejercida sobre la córnea por medio de disminuciones de 5 mm en la longitud del filamento, hasta obtener el reflejo de parpadeo. La mayor longitud frente a la cuál un paciente presentó respuesta fue considerada como el umbral de sensibilidad corneal. Todas las mediciones fueron realizadas por un mismo operador.

Medición del FRAT. La capacidad antioxidante de las lágrimas se determinó mediante la medición de su habilidad para reducir al hierro férrico a hierro ferroso (reactivos de Merck EMD Millipore / Sigma-Aldrich, Inc). Se construyó una curva de calibración para estándares generados a partir de concentraciones crecientes de sulfato ferroso en un volumen total de 850 μL , de acuerdo a la fórmula descrita por Benzie y cols (42). Posteriormente, y utilizando una microcubeta de cuarzo (Starna Scientific Ltd., UK) se construyeron curvas de calibración para volúmenes decrecientes de mezcla con volumen total hasta 272 μL . Antes de realizar las mediciones de los sujetos en estudio, se efectuaron mediciones seriadas de FRAT adaptado a volúmenes totales y de muestra decreciente en fluido lagrimal de sujetos voluntarios sanos hasta 2 μL .

Para la medición del FRAT modificado se mezclaron 2 μl de lágrima obtenida por centrifugado de esponjas con el reactivo FRAT. Luego se agitaron en un agitador Vórtex y se incubaron a 37°C durante 2 minutos (volumen total 272 μL). Al término de este tiempo se midió la absorbancia de la mezcla a 593 nm de longitud de onda en espectrofotómetro (Shimadzu UV-3600, ©Shimadzu Scientific Instruments). Los

valores obtenidos fueron convertidos a valores de FRAT según la curva de calibración, luego de aplicado un factor de amplificación de dilución de 4.

Análisis de Datos. Para describir la distribución de variables cuantitativas se aplicó el test de normalidad de Shapiro-Wilk, y en la búsqueda de significancia estadística entre los grupos se optó de acuerdo a la simetría de la distribución por el test de t-Student de dos colas o test no paramétrico (prueba de Mann-Whitney) para el caso de variables de distribución asimétrica. La correlación entre sensibilidad corneal y las otras variables se estimó mediante el coeficiente de correlación de Pearson en caso de distribución normal de las mismas o coeficiente de correlación de Spearman si no se daba esta última condición. Se consideró como significativo un p menor a 0,05. Para todos los análisis estadísticos descritos se utilizó el software STATA/SE 12.0 (©StataCorp 2011, TX USA).

RESULTADOS

Modificaciones de la técnica de FRAT. La técnica de FRAT originalmente descrita para 25µl de muestra en un volumen total de 850µl de solución se adaptó para utilizar volúmenes menores de muestras clínicas de sujetos individuales. Se utilizó una microcubeta y se redujo el volumen total de la reacción desde 850µl a 272µl, comprobándose linealidad de la reacción para estándares de concentraciones conocidas de Fe^{+2} (FeSO_4) entre 50µM y 400µM (figura 1). Se verificó reproducibilidad y consistencia para mediciones de FRAT en volúmenes decrecientes de muestra de fluido lagrimal de 25µL (volumen total de 850µL), 10 µL (volumen total 340 µL), 5µL (volumen total 340µL, aplicando factor de amplificación de 2) y 2 µL (volumen total 272µL, aplicando factor de amplificación de 4) (tabla 2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de FRAT obtenidos a partir de muestras en las cuales se reemplazó el fluido lagrimal por agua bidestilada directa (blanco teórico) o exprimida a partir de un cubo de poliuretano (blanco).

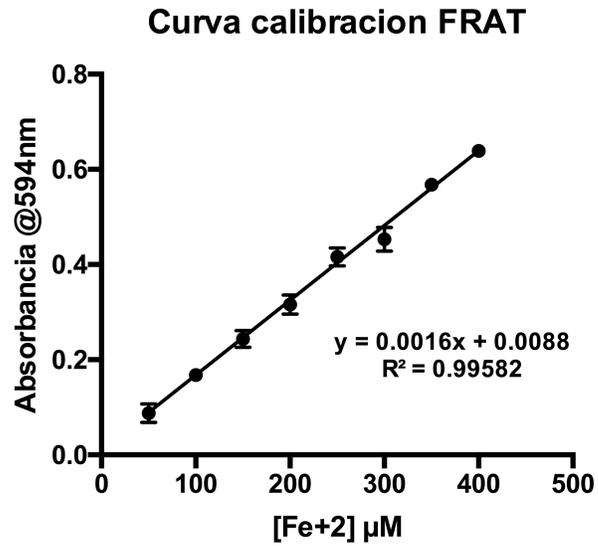


Figura 1. Curva de calibración “Ferric reducing ability of Tears” (FRAT). Lectura espectrofotométrica a 594nm para concentraciones crecientes de Fe+2 en solución FRAT con volumen total de reacción de 272 μl .

Tabla 2. Valores de FRAT para distintos volúmenes de muestra de fluido lagrimal en pool obtenido de voluntarios sanos.

	<i>10µl (volumen total 340µl)</i>	<i>5µl (volumen total 340µl)⁺</i>	<i>2µl (volumen total 272µl)⁺⁺</i>
1	139	146	136
2	137	130	150
3	144	138	143
4	144	131	130
5	136	140	147
<i>Promedio (µM) ± SD</i>	<i>140 ± 3,8</i>	<i>137 ± 6,6[*]</i>	<i>141 ± 8,2^{**}</i>

Las muestras de 5 y 2 µL fueron diluidas con agua bidestilada para alcanzar el volumen proporcional correspondiente al volumen total de reacción, aplicando posteriormente un factor de amplificación a la medición espectrofotométrica obtenida (Ver Métodos). + Factor de amplificación de 2 para lecturas obtenidas. * $p = 0,4$ vs valores obtenidos muestra 10µl, test de *t*-Student. ++ Factor de amplificación de 4 para lecturas obtenida. ** $p = 0,8$ vs valores obtenidos muestra 10µl, test de *t*-Student.

Estudios clínicos. En el estudio fueron incluidos un total de 64 pacientes con una mediana de edad de 22 años (rango 18 - 46 años) de los cuales 32 correspondieron a mujeres (50%) y 32 a hombres (50%, tabla 3). El grupo control se constituyó por un total de 41 pacientes con una edad mediana de 22 años (rango 18 - 24 años), con 18 mujeres (43,9%) y 23 hombres (56,1%), las medianas de puntaje OSDI y test de Schirmer fueron de 8 puntos (rango 0 - 12) y 26 mm (rango 6 -30), respectivamente. El BUT promedio fue de $10,9 \pm 5,7$ (SD) segundos (figura 5). Ningún paciente de este grupo presentó alteración en el patrón de tinción de superficie ocular. Por su parte, el grupo SOS fue conformado por 23 pacientes con una mediana de edad 27 años (rango 19 - 46; $p < 0,05$ vs grupo control), con 14 mujeres (60,9%) y 9 hombres (39,1%). El puntaje OSDI para este grupo presentó una mediana de 37,75 puntos (rango 2 - 63 puntos; $p < 0,01$ vs grupo control). Todas las variables de la evaluación clínica estandarizada presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. El test de Schirmer presentó una mediana de 14 (rango 2 – 30; $p < 0,05$ vs grupo control), y el BUT un promedio de $7,3 \pm 3,2$ (SD) segundos ($p < 0,05$ vs grupo control). El porcentaje de pacientes con tinción de superficie alterada en este grupo alcanzó al 34,1% (tabla 4).

Tabla 3. Parámetros descriptivos generales para pacientes del grupo Control y grupo SOS.

	<i>Control</i>	<i>SOS</i>
<i>n</i>	41	23
<i>Relación H:M</i>	0,57	0,78
<i>Edad (años)</i>	22 [18-24]	27 [19-46] [†]
<i>OSDI (puntos)</i>	8 [0-12]	37,75 [2-63] [†]

[†] $p < 0,05$ vs. control, test no paramétrico Mann-Whitney. Datos expresados como mediana y [rango].

Tabla 4. Evaluación oftalmológica estandarizada para los grupos en estudio mediante test de Schirmer, BUT y tinciones Fluoresceína y verde Lisamina

	Control	SOS
<i>Schirmer (mm)</i>	26 [6-30]	14 [2-30] †
<i>BUT (segundos)</i>	10,9 ± 5,7	7,3 ± 3,2 *
<i>Tinción Fluoresceína y verde Lisamina (% alterado)</i>	0%	34,1% ††

El test de Schirmer determina la tasa de producción lagrimal el test de BUT, la estabilidad de la película lagrimal y las tinciones Fluoresceína y verde Lisamina el daño epitelial de la superficie ocular. † $p < 0,05$ vs control, test no paramétrico Mann-Whitney. Datos expresados como mediana y [rango]. * $p < 0,05$ vs control, test de *t*-Student. Datos expresados como promedio ± SD. †† $p < 0,05$ vs control, test exacto de Fisher. Los valores representan al menos 62 pacientes entre controles y SOS.

Sensibilidad corneal. La sensibilidad corneal se distribuyó de manera asimétrica en ambos grupos, presentando una mediana de 60 mm (rango 25 – 60 mm), dentro de lo normal descrito para la edad (tabla 5 y 6). El grupo control presentó una mediana de 60 mm (rango 50 – 60 mm) mientras que en el grupo SOS este valor fue de 55 mm (rango 25 – 60 mm, $p < 0,05$ vs grupo control). La diferencia fue más marcada en la porción femenina de la muestra (tabla 5), sin embargo, al comparar hombres con mujeres dentro del grupo SOS no se encontró significancia estadística para estesiometría corneal entre ellos.

Tabla 5. Valores normales de sensibilidad corneal en población sana

Age groups (years)		(15–25)	(26–35)	(36–45)	(46–55)	(56–65)	(>65)
Corneal sensitivity* (mm)	Central	58.9 ± 0.22	59.2 ± 0.19	57.6 ± 0.28	54.5 ± 0.46	52.5 ± 0.47	50.0 ± 0.53
	Nasal	58.6 ± 0.26	58.4 ± 0.29	57.1 ± 0.29	54.3 ± 0.51	52.0 ± 0.52	50.0 ± 0.42
	Inferior	58.0 ± 0.35	58.6 ± 0.26	56.1 ± 0.37	53.8 ± 0.54	52.2 ± 0.50	50.6 ± 0.45
	Temporal	58.3 ± 0.32	58.4 ± 0.29	56.5 ± 0.36	54.2 ± 0.48	51.6 ± 0.52	49.6 ± 0.49
	Superior	57.7 ± 0.39	58.4 ± 0.30	56.0 ± 0.37	53.8 ± 0.54	50.9 ± 0.54	49.6 ± 0.52

* Presented as mean ± standard deviation

La sensibilidad ha sido estimada mediante estesiometría de contacto Cochet-Bonnet y estratificada según rango etáreo (Mirzajan A1, Khezri F, Jafarzadehpur E, Karimian F, Khabazkhoob M. Normal corneal sensitivity and its changes with age in Tehran, Iran. *Clin Exp Optom.* 2015 Jan;98(1):54-7; ver ref. 59).

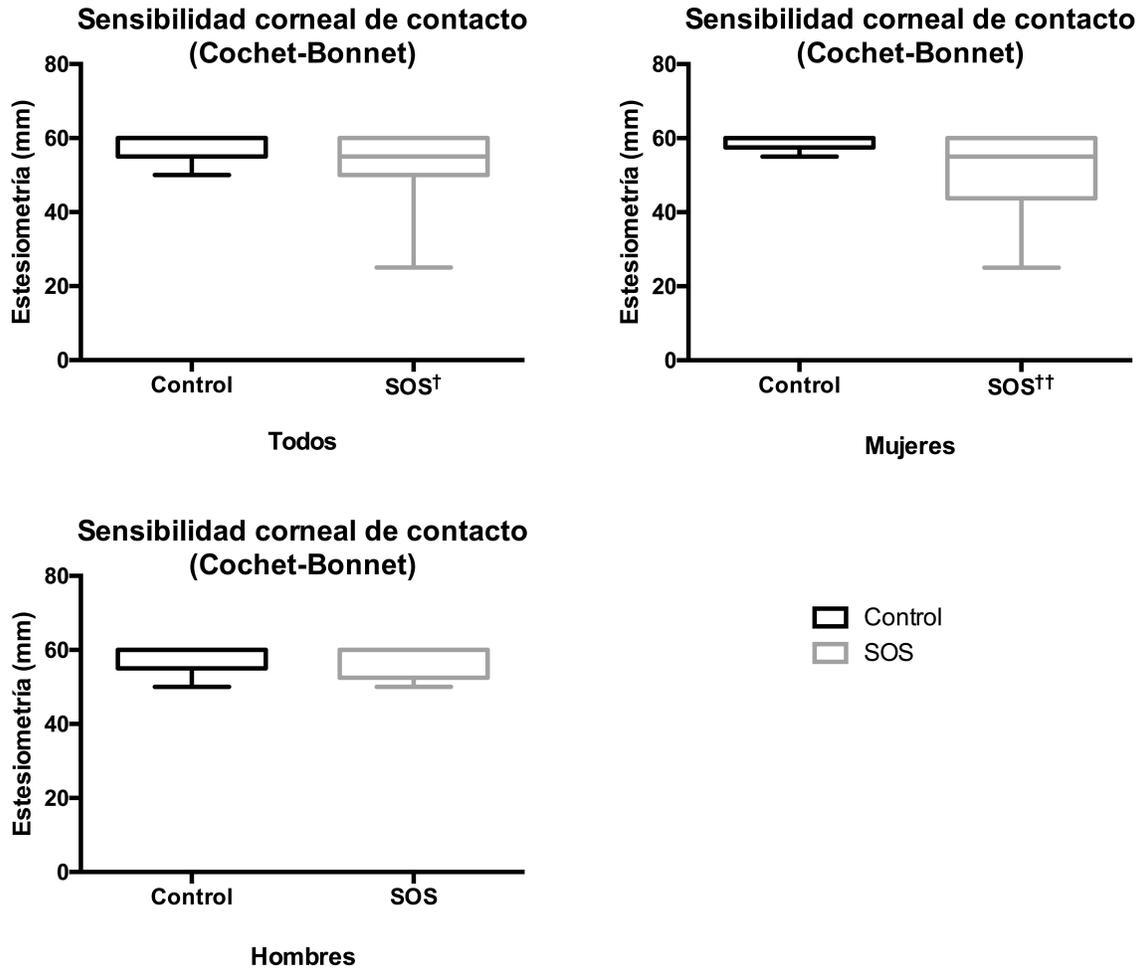


Figura 2. Sensibilidad corneal de contacto medida con estesiómetro Cochet-Bonnet. Los datos están expresados para ambos grupos en estudios completos y estratificados según sexo, como mediana y rango. [†] $p < 0,05$ vs Estesiometría grupo Control, test no paramétrico Mann-Whitney. ^{††} $p < 0,05$ vs Estesiometría promedio subgrupo Mujeres Control, test no paramétrico Mann-Whitney.

Calidad del fluido lagrimal. La osmolaridad lagrimal presentó una distribución simétrica normal de acuerdo al histograma de frecuencias y test de normalidad de Shapiro-Wilk (figura 2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores de osmolaridad lagrimal entre ambos grupos ($304,8 \pm 9,1$ mOsm/L [IC 95% = 302 – 308] grupo control vs $304,0 \pm 9,7$ mOsm/L [IC 95% = 300 – 308] grupo SOS, $p = 0,4$).

La distribución de sujetos clasificados en las distintas categorías del test de Ferning propuestas por *Rolando et al.* (54) se muestran en la figura 3. El porcentaje de pacientes con alteración del patrón Ferning (categorías 3 y 4) en el grupo SOS fue de 80,4%, mientras que este valor alcanzó un 37,8% para el grupo Control, $p < 0,05$ (figura 3).

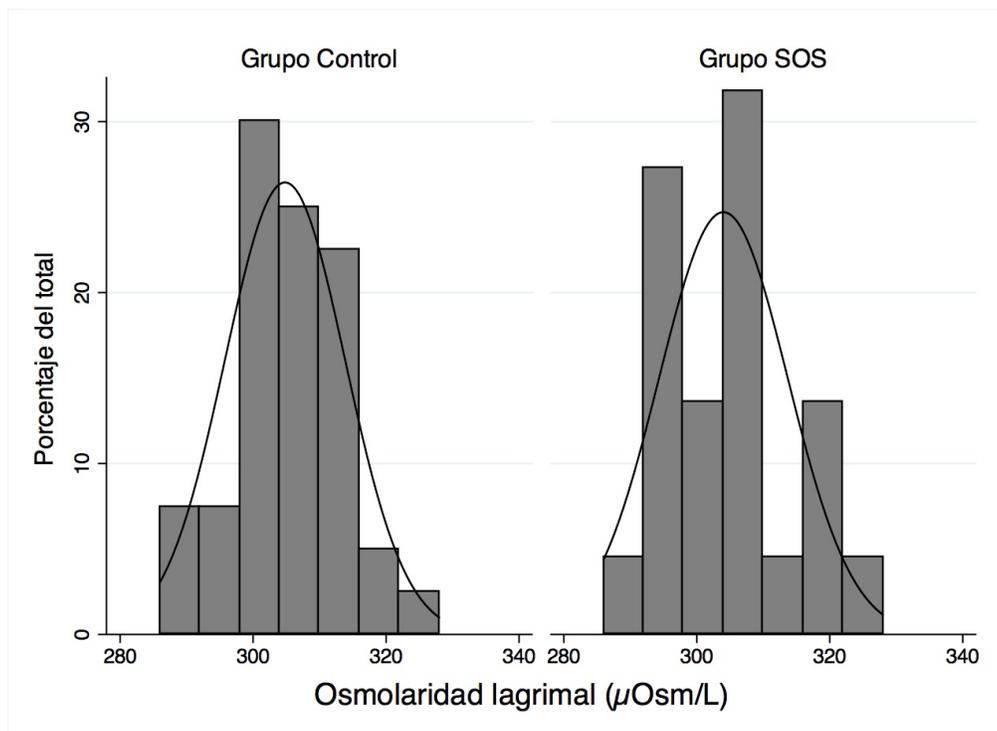


Figura 3. Histograma mostrando los valores de Osmolaridad lagrimal para ambos grupos y líneas de tendencia distribución normal. Esta variable presentó distribución simétrica normal de acuerdo al test de normalidad Shapiro-Wilk. Abajo valores promedio \pm SD y entre corchetes [IC 95%]. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (test de t-Student).

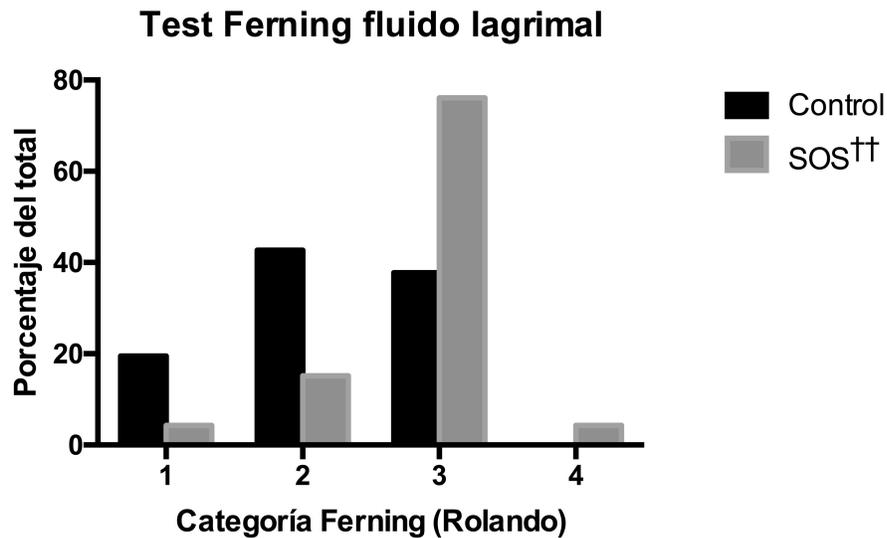


Figura 4. Test de Ferning lagrimal. Se muestra el diagrama de barras resumen de la distribución de individuos de ambos grupos en estudio en las 4 categorías propuestas por *Rolando et al.* para la descripción de imágenes tipo helecho a la observación microscópica de 1 μ L de fluido lagrimal desecado a temperatura ambiente 20°C y humedad ambiental relativa del 60% (*Rolando, M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. Chibret Int. J. Ophthalmol. 1984; 2, 32–41; ver ref. 54*). ^{††} $p < 0,05$ vs grupo Control, test exacto de Fisher (*para esta prueba se agruparon las categorías 1 y 2 como “examen normal” y las categorías 3 y 4 “examen alterado”*).

Capacidad antioxidante de la lágrima. Los valores de FRAT obtenidos para ambos grupos se encuentran dentro del rango descrito en la literatura (tabla 7). Esta variable presentó una distribución simétrica normal de acuerdo al histograma y prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (figura 4). El grupo control presentó un valor promedio de $376,6 \pm 163,5 \mu\text{M}$ [IC 95% = 324 - 428] y el grupo SOS de $380,7 \pm 101,1 \mu\text{M}$ [IC 95% = 337 - 424], valores no estadísticamente diferentes; tampoco fueron diferentes los valores de FRAT de los hombres controles y en estudio y tampoco al considerar de igual forma a las mujeres (tabla 8).

Tabla 6. Valores de FRAT publicados en la literatura.

	N	Raza	Edad promedio (años) [rango]	Volumen y tipo lágrima	Comorbilidad	FRAP ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)
<i>Choy et al. 2000</i>	47 (18 mujeres)	Asiático	23 [20-26]	Refleja 120 μl (25 μl)	No	409 \pm 162
<i>Choy et al. 2003</i>	21 (7 mujeres)	Asiático	N/E [22-29]	Refleja 120 μl (25 μl)	No	273 \pm 94
<i>Kowalaski et al. 2009</i>	68 (46 mujeres)	Caucásico	59 [10-92]	Basal 10 μl (10 μl)	No	208 \pm 137
<i>Choy et al. 2011</i>	120 (N/E mujeres)	Asiático	N/E [19-75]	Mínimamente refleja 30 μl (25 μl)	No	398 \pm 160
<i>Guajardo et al. 2015</i>	64 (36 mujeres)	Hispánico	24 [18-46]	Basal 8 μl (2 μl)	No / SOS	380 \pm 151

Los datos incluidos en esta tabla que incluyen el rango etario, raza, volumen, tipo de lágrima obtenida y volumen de lágrima utilizada para efectuar las mediciones aparecen en las referencias 39, 41, 42, 61.

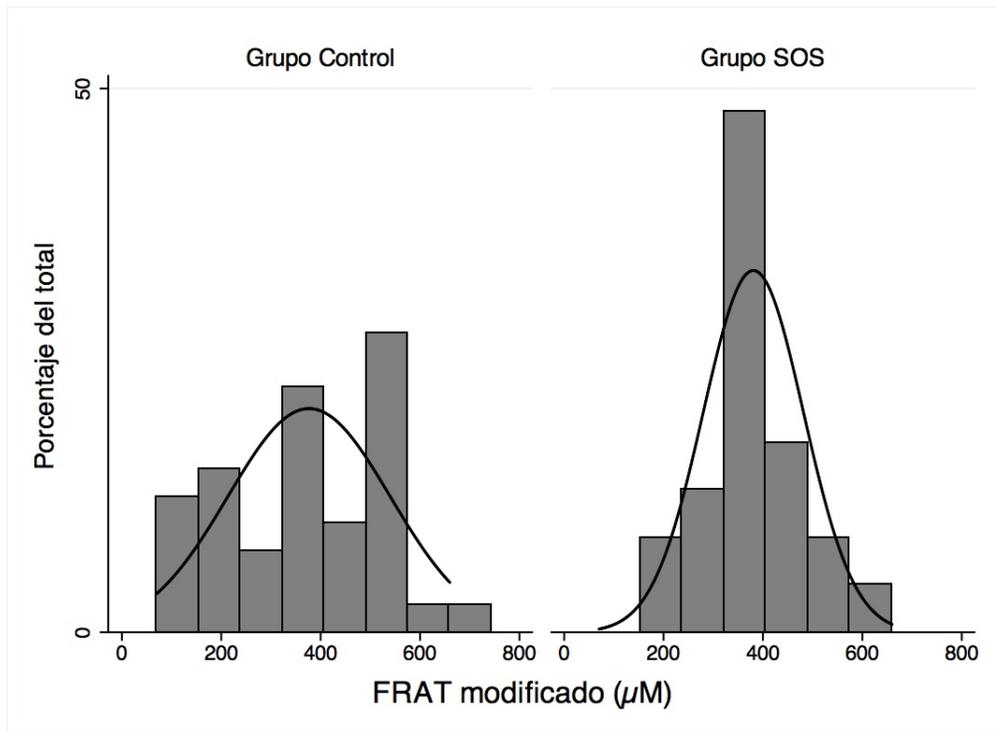


Figura 5. Histograma de la distribución de los valores de FRAT modificado. Se utilizaron 2 μL de muestra de fluido lagrimal en ambos grupos en estudio. Esta variable presentó distribución simétrica, normal de acuerdo al test de normalidad de Shapiro-Wilk. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (test de *t*-Student).

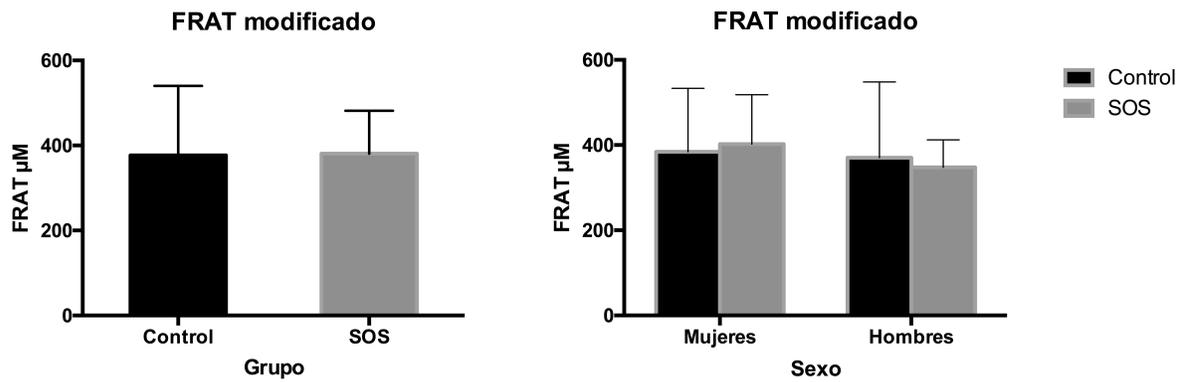


Figura 6. Test de FRAT modificado para 2 μL de muestra de fluido lagrimal. Los datos están expresados para ambos grupos como promedio \pm SD. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al analizar hombres y mujeres por separado (test de *t*-Student).

Estudio de asociación. Las variables osmolaridad lagrimal y FRAT se distribuyeron normalmente, por lo que se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para buscar asociación con Estesimetría corneal. Ninguna de las dos variables mostró una correlación significativa. Para osmolaridad lagrimal el valor r fue de $-0,20$ ($p = 0,16$) y para FRAT de $-0,01$ ($p = 0,95$) (figuras 5 y 6). La variable test de Ferning se estudió calculando el coeficiente de correlación de Spearman que presentó un valor $r_s = 0,12$ ($p = 0,38$).

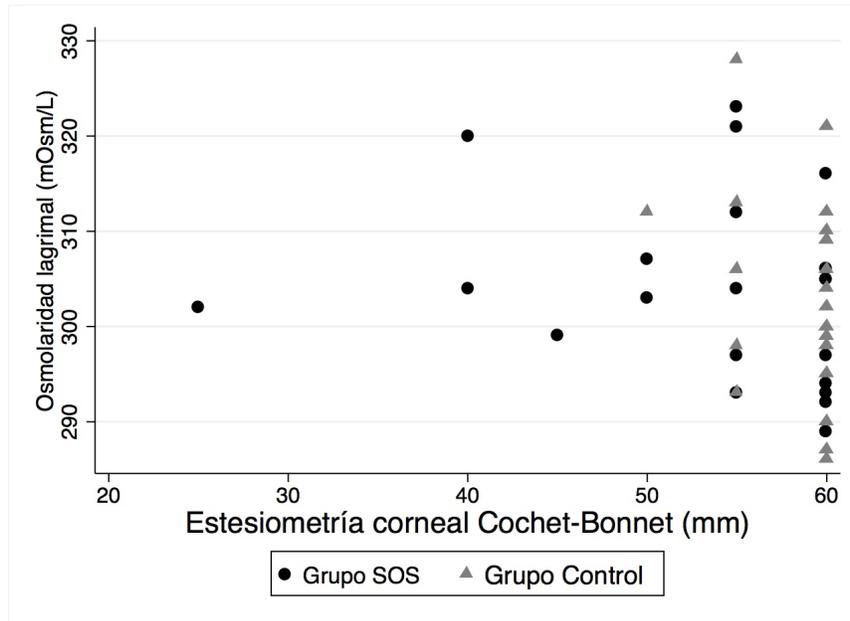


Figura 7. Diagrama de dispersión mostrando la asociación entre Osmolaridad lagrimal y estesiometría corneal de contacto Cochet-Bonnet. El coeficiente de correlación de Pearson es $r = -0,20$ ($p = 0,16$).

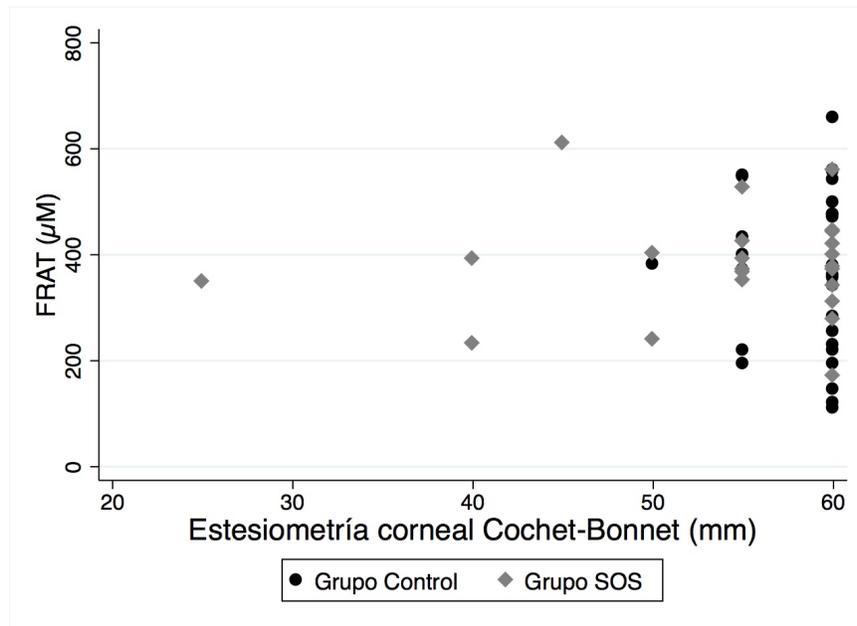


Figura 8. Diagrama de dispersión mostrando la asociación entre FRAT modificado y estesiometría corneal de contacto Cochet-Bonnet. El coeficiente de correlación de Pearson es $r = -0,01$ ($p = 0,95$).

DISCUSIÓN

La técnica FRAP se ha presentado como un método sencillo, de bajo costo y alta reproducibilidad en el estudio de la capacidad antioxidante del plasma (40). Su uso a la fecha se ha centrado fundamentalmente en el análisis de muestras para la búsqueda de asociaciones entre la disminución de la capacidad antioxidante y diversas patologías sistémicas. La técnica FRAP también ha sido utilizada para cuantificar el efecto de la suplementación con antioxidantes sobre la capacidad antioxidante plasmática. Los valores inicialmente descritos para plasma son alrededor de 4 veces los publicados para fluido lagrimal por quienes describieron originalmente el método (40).

La toma de muestras por sobre 10 μ L de fluido lagrimal es un proceso engorroso que requiere de repetidas tomas, lo que puede agregar sesgos en el análisis ya sea por evaporación de la misma o excesiva manipulación de la superficie ocular (61). Es por ello que en este trabajo presentamos la modificación de la técnica FRAT para determinar la capacidad antioxidante de la lágrima, de tal modo que ella pueda ser aplicable al estudio y caracterización clínica de la lágrima de pacientes individuales con y sin SOS. Los volúmenes de fluido requeridos para nuestro estudio fueron 5 veces menores a los que hasta ahora han sido publicados y se ajustan a la realidad de una evaluación clínica, a la vez que permiten el estudio de otros parámetros en una misma muestra (41, 42). Más aún, nuestros resultados mediante la técnica de FRAT modificada fueron similares a los publicados por otros autores, tanto en los valores promedio como en la alta dispersión de las mediciones interindividuales y la ausencia de diferencias significativas entre sexos (39, 41, 42, 61).

Contrario a lo hipotetizado, el grupo con SOS definido mediante un cuestionario validado y variables clínicas no mostró diferencia estadísticamente significativa en los valores de FRAT respecto del grupo de sujetos sanos (Figura 6). Causas etiológicas y severidad del cuadro podrían estar involucradas en la ausencia de estrés oxidativo observada en los pacientes del grupo con SOS. Este síndrome es una condición de desenlace por falla en uno o más de los diversos componentes de la unidad funcional

lagrimal provocada por diferentes causas. En el presente estudio se incluyeron como pacientes SOS a sujetos sanos en el resto de sus sistemas lo que necesariamente dejó fuera una gran cantidad de pacientes con ojo seco de mayor severidad, a la vez que no se efectuó una clasificación acuciosa del subtipo de ojo seco frente al cual nos encontrábamos. Existen evidencias tanto clínicas como provenientes de estudios *in vitro* que aseveran que el estrés oxidativo juega un rol en al menos ciertos subtipos de SOS severo como el secundario a Diabetes mellitus (66-68). Esto sumado al hecho de que el FRAP ya ha demostrado ser una técnica válida en la cuantificación del rol del estrés oxidativo en diversas patologías (69, 70) nos lleva a suponer que es altamente probable que los niveles de FRAT se encuentren alterados en uno o más subtipos de ojo seco, especialmente aquellos que cursan asociados a un proceso inflamatorio indicando una mayor severidad del cuadro. Un ejemplo sería el SOS como efecto secundario a la destrucción autoinmune de la glándula lagrimal u otros que no fueron incluidos en este estudio. La mayor parte de los pacientes incluidos en nuestro estudio correspondieron a ojo seco leve de acuerdo a una caracterización clínica estandarizada y no mostraron clínicamente gran inflamación ni daño de la superficie ocular. Esto implica que los mecanismos compensatorios dados en parte por la indemnidad del reflejo de lagrimeo se encontraban operativos, presumiblemente asociados a la inducción de mecanismos enzimáticos antioxidantes. De esta forma, los valores de FRAT en lágrima de pacientes con SOS severo y secundario a enfermedades autoinmunes, neuropatía periférica u otras patologías son áreas a explorar en el futuro en la búsqueda de un rol más preponderante de la pérdida de defensas antioxidantes en el desarrollo o persistencia de esta condición.

Si bien la sensibilidad corneal del grupo SOS se encontró significativamente disminuida respecto del control, la reducción fue discreta. Al analizar por separado esta variable para hombres y mujeres, notamos que esta diferencia se debe fundamentalmente a la contribución del subgrupo femenino. Este hallazgo puede tener relación a lo descrito por *Khezri F y cols.* quienes encontraron una menor sensibilidad corneal para 77 mujeres de un total de 130 sujetos sanos de entre 20 y 35 años de edad, en quienes no se aplicaron cuestionarios de tamizaje para SOS

(62). La razón de esta diferencia podría obedecer a factores hormonales (63-65); sin embargo, no puede descartarse una pérdida de sensibilidad secundaria a la manipulación repetitiva de la región periocular y el contacto incidental de la superficie ocular con sustancias químicas, ambos factores asociados a la aplicación de maquillaje que rara vez observamos en sujetos del sexo masculino.

En el reclutamiento de pacientes del presente estudio nos encontramos con que los criterios requeridos para garantizar ausencia de enfermedad fueron cumplidos en su mayoría por sujetos de menos de 30 años. Esto es consistente con el hecho descrito de una mayor prevalencia del SOS de la mano con el envejecimiento (2), y explica en gran parte la disparidad de edad entre los grupos. A su vez, el requisito de ausencia de comorbilidad en los criterios de exclusión justifica también la relativa baja edad del grupo SOS. Si bien la diferencia de edad entre ambos grupos fue estadísticamente significativa, esto no parece a nuestro juicio relevante del punto de vista clínico, considerando que la mediana de edad de ambos estuvo por debajo de los 30 años y no se incluyeron menores de edad ni personas de más de 46 años. Por otra parte, si bien la sensibilidad corneal presenta una reducción con el paso de los años, esta desensibilización se torna relevante después de los 46 años de edad (59), algo similar a lo que ocurre con la reducción de la capacidad antioxidante de la lágrima medida por FRAT, que se ha demostrado decae por encima de los 59 años (42). Adicionalmente a esto, nosotros no encontramos una correlación estadísticamente significativa entre la edad de los grupos y ninguna de estas dos variables.

Resumiendo, los resultados de este estudio muestran que es posible cuantificar el estado antioxidante de la lágrima de sujetos individuales con micro volúmenes de este fluido. Adicionalmente, respaldan la idea de que existe una asociación entre el desarrollo de ojo seco leve aislado y una menor sensibilidad corneal de contacto, además de alteraciones en la calidad de la lágrima, particularmente observada en el test de Ferning. El rol de la capacidad total antioxidante de la lágrima en la enfermedad es algo que requerirá de estudios adicionales. Es necesario ampliar el espectro de pacientes hacia subtipos específicos y más severos de la enfermedad y

explorar la adaptación de otras técnicas de medición de estrés oxidativo.

Como se mencionó en la introducción, la lágrima contiene GSH, tripéptido que representa el mayor antioxidante celular. En la célula hepática puede alcanzar una concentración 10 mM especialmente en condiciones de estrés oxidativo. La concentración de GSH en la lágrima se ha descrito en 107 $\mu\text{M/L}$ (34). Al actuar como antioxidante el GSH se convierte en glutatión oxidado (GSSG); éste es nuevamente reducido a GSH en presencia de NADPH, reacción catalizada por la GSH-reductasa, permitiendo mantener no sólo la concentración de glutatión total (GSH + GSSG), sino además la relación fisiológica GSH/GSSG que normalmente es utilizada como marcador de estrés oxidativo. El GSH además forma conjugados con compuestos electrofílicos provenientes del metabolismo de algunos fármacos, como el paracetamol (71); en este caso el glutatión total disminuye y por lo tanto también lo hace la capacidad antioxidante. De aquí que la determinación de glutatión total y GSH sería un buen marcador para asociar a la determinación de FRAT como marcador en pacientes con SOS. Otra posibilidad a investigar es la medición de productos de lipoperoxidación los cuales parecen especialmente interesantes en la lágrima debido al rol esencial de los lípidos en la prevención de la evaporación lagrimal, que se encuentra alterada en la mayor parte de los pacientes con SOS (2, 3).

Los antecedentes presentados a través de este trabajo muestran la relevancia de la asociación de marcadores de estrés oxidativo para determinar la severidad del síndrome SOS. Aunque no encontramos diferencias en las mediciones de FRAT entre el grupo caracterizado con SOS y los sujetos sanos, postulamos que esta técnica podría ser utilizada en la caracterización clínica de la severidad de uno o más subtipos de SOS. La evaluación de otros marcadores de estrés oxidativo como los mencionados anteriormente, podría ayudar a evaluar diferencias menos marcadas en la capacidad antioxidante lagrimal de pacientes con SOS leve respecto de sujetos sanos (66-68). Más aún, la observación de estrés oxidativo puede conducir a proponer terapias asociadas al uso de fármacos antioxidantes que probablemente potencien las terapias clásicas actuales.

CONCLUSIÓN

No encontramos diferencias en las mediciones de FRAT entre el grupo caracterizado con SOS y los sujetos sanos, al parecer porque el grupo de pacientes seleccionados presentaban un SOS leve que podría ser compensado fisiológicamente. Por lo mismo, postulamos que el método de FRAT modificado podría ser utilizado en la caracterización clínica de la severidad de uno o más subtipos de SOS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sutphin, J.E.; Dana, R.; Florakis, G.; Hammersmith, K.; Reidy, J.; Lopatynsky, M. "Section 8 External Disease and Cornea". American Academy of Ophthalmology 2007-2008 Basic and Clinical Science Course. 8: 71-110, 2008.
2. Lemp, M. "The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop". *Ocul Surf.* 5: 75-92, 2007.
3. Tiffany, J. "The Normal Tear Film. Surgery for the Dry Eye". *Dev Ophthalmol.* 41: 1-20, 2008.
4. Lemp, M.A. "Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes". *CLAO J.* 21: 221-32, 1995.
5. Lemp, M.A. "Advances in understanding and managing dry eye disease". *Am J Ophthalmol.* 146: 350-6, 2008.
6. Ousler, G.W. 3rd; Hagberg, K.W.; Schindelar, M.; Welch, D.; Abelson, M.B. "The Ocular Protection Index". *Cornea.* 27: 509-13, 2008.
7. Guo, B.; Lu, P.; Chen, X.; Zhang, W.; Chen, R. "Prevalence of dry eye disease in Mongolians at high altitude in China: the Henan eye study". *Ophthalmic Epidemiol.* 17: 234-41, 2010.
8. Schaumberg, D.A.; Sullivan, D.A.; Buring, J.E.; Dana, M.R. "Prevalence of dry eye syndrome among US women". *Am J Ophthalmol.* 136: 318-26, 2003.
9. Schaumberg, D.A.; Dana, R.; Buring, J.E.; Sullivan, D.A. "Prevalence of dry eye disease among US men: estimates from the Physicians' Health Studies". *Arch Ophthalmol.* 127: 763-8, 2009.
10. Uchino, M.; Schaumberg, D.A.; Dogru, M.; Uchino, Y.; Fukagawa, K.; Shimmura, S.; Satoh, T.; Takebayashi, T.; Tsubota, K. "Prevalence of dry eye disease among Japanese visual display terminal users". *Ophthalmology.* 115: 1982-8, 2008.
11. Dartt, D.A. "Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases". *Prog Retin Eye Res.* 28: 155-77, 2009.

12. Dartt, D.A. "Dysfunctional neural regulation of lacrimal gland secretion and its role in the pathogenesis of dry eye syndromes". *Ocul Surf.* 2: 76-91, 2004.
13. Al-Aqaba, M.A.; Fares, U.; Suleman, H.; Lowe, J.; Dua, H.S. "Architecture and distribution of human corneal nerves". *Br J Ophthalmol.* 94: 784-9, 2010.
14. Belmonte, C.; Gallar, J. "Corneal nociceptors". *Neurobiology of Nociceptors*, Oxford University. 4: 146–183, 1996.
15. Marfurt, C.F.; Cox, J.; Deek, S.; Dvorscak, L. "Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res*". 90: 478-92, 2010.
16. Remington, L.A. "Visual system". *Clinical Anatomy of the Visual System.* 1: 9-24, 2005.
17. Müller, L.J.; Marfurt, C.F.; Kruse, F.; Tervo, T.M. "Corneal nerves: structure, contents and function". *Exp Eye Res.* 76: 521-42, 2003.
18. Belmonte, C.; Acosta, M.C.; Gallar, J. "Neural basis of sensation in intact and injured corneas". *Exp Eye Res.* 78: 513-25, 2004.
19. Brock, J.A.; McLachlan, E.M.; Belmonte, C. "Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea". *J. Physiol.* 512: 211–7, 1998.
20. Weidner, C.; Schmidt, R.; Schmelz, M.; Torebjork, H.E.; Handwerker, H.O. "Action potential conduction in the terminal arborisation of nociceptive C-fibre afferents". *J. Physiol.* 547: 931–40, 2003.
21. Adatia, F.A.; Michaeli-Cohen, A.; Naor, J.; Caffery, B.; Bookman, A.; Slomovic, A. "Correlation between corneal sensitivity, subjective dry eye symptoms and corneal staining in Sjögren's syndrome". *Can J Ophthalmol.* 39: 767-71, 2004.
22. Benítez-Del-Castillo, J.M.; Acosta, M.C.; Wassfi, M.A.; Díaz-Valle, D.; Gegúndez, J.A.; Fernandez, C.; García-Sánchez, J. "Relation between corneal innervation with confocal microscopy and corneal sensitivity with noncontact esthesiometry in patients with dry eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48: 173-81, 2007.
23. Bourcier, T.; Acosta, M.C.; Borderie, V.; Borrás, F.; Gallar, J.; Bury, T.; Laroche, L.; Belmonte, C. "Decreased corneal sensitivity in patients with dry eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46: 2341-5, 2005.

24. Hoşal, B.M.; Ornek, N.; Zilelioğlu, G.; Elhan, A.H. "Morphology of corneal nerves and corneal sensation in dry eye: a preliminary study". *Eye (Lond)*. 19: 1276-9, 2005.
25. Situ, P.; Simpson, T.L.; Jones, L.W.; Fonn, D. "Conjunctival and corneal hyperesthesia in subjects with dryness symptoms". *Optom Vis Sci*. 85: 867-72, 2008.
26. Cejková, J.; Ardan, T.; Simonová, Z.; Cejka, C.; Malec, J.; Jirsová, K.; Filipec, M.; Dotrelová, D.; Brůnová, B. "Nitric oxide synthase induction and cytotoxic nitrogen-related oxidant formation in conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome)". *Nitric Oxide*. 17: 10-7, 2007.
27. Cejková, J.; Ardan, T.; Simonová, Z.; Cejka, C.; Malec, J.; Dotrelová, D.; Brunová, B. "Decreased expression of antioxidant enzymes in the conjunctival epithelium of dry eye (Sjögren's syndrome) and its possible contribution to the development of ocular surface oxidative injuries". *Histol Histopathol*. 23: 1477-83, 2008.
28. Nakamura, S.; Shibuya, M.; Nakashima, H.; Hisamura, R.; Masuda, N.; Imagawa, T.; Uehara, M.; Tsubota, K. "Involvement of oxidative stress on corneal epithelial alterations in a blink-suppressed dry eye". *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48: 1552-8, 2007.
29. Rodrigo, R. "Oxidative stress: Basic overview". *Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease*. 1: 1-24, 2009.
30. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 44-84, 2007.
31. Fletcher, A.E. "Free radicals, antioxidants and eye diseases: evidence from epidemiological studies on cataract and age-related macular degeneration". *Ophthalmic Res*. 44: 191-8, 2010.
32. Chen, Y.; Mehta, G.; Vasiliou, V. "Antioxidant defenses in the ocular surface". *Ocul Surf*. 7: 176-85, 2009.
33. Gukasyan, H.J.; Kim, K.J.; Lee, V.H.; Kannan, R. "Glutathione and its transporters in ocular surface defense". *Ocul Surf*. 5: 269-79, 2007.

34. Shoham, A.; Hadziahmetovic, M.; Dunaief, J.L.; Mydlarski, M.B.; Schipper, H.M. "Oxidative stress in diseases of the human cornea". *Free Radic Biol Med.* 45: 1047-55, 2008.
35. Blades, K.J.; Patel, S.; Aidoo, K.E. "Oral antioxidant therapy for marginal dry eye". *Eur J Clin Nutr.* 55(7): 589-97, 2001.
36. Drouault-Holowacz, S.; Bieuvelet, S.; Burckel, A.; Rigal, D.; Dubray, C.; Lichon, J.L.; Bringer, P.; Pilon, F.; Chiambaretta, F. "Antioxidants intake and dry eye syndrome: a crossover, placebo-controlled, randomized trial". *Eur J Ophthalmol.* 19: 337-42, 2009.
37. Horwath-Winter, J.; Schmut, O.; Haller-Schober, E.M.; Gruber, A.; Rieger, G. "Iodide iontophoresis as a treatment for dry eye syndrome". *Br J Ophthalmol.* 89(1): 40-4, 2005.
38. Choy, C.K.; Cho, P.; Chung, W.Y.; Benzie, I.F. "Water-soluble antioxidants in human tears: effect of the collection method". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(13): 3130-4, 2001.
39. Choy, C.K.; Benzie, I.F.; Cho, P. "Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tear fluid measured using the FRASC assay". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41(11): 3293-8, 2000.
40. Benzie, I.F.; Strain, J.J. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay". *Anal Biochem.* 239(1): 70-6, 1996.
41. Choy, C.; Benzie, I.; Cho, P. "Antioxidants in tears and plasma: Inter-relationships and effect of vitamin C supplementation". *Curr Eye Res.* 27(1): 55-60, 2003.
42. Kowalski, M.; Bielecka-Kowalska, A.; Bielecka-Roszkiewicz, K.; Dziańska-Zaborszczyk, E.; de Graft-Johnson, J.; Szemraj, J.; Zwolinska, A.; Nowak, D. "Ferric reducing ability of tears in healthy subjects-diurnal variation and dependence on defined demographic data". *Curr Eye Res.* 34(5): 333-9, 2009.
43. Choy, C.K.; Benzie, I.F.; Cho, P. "Is ascorbate in human tears from corneal leakage or from lacrimal secretion?". *Clin Exp Optom.* 87(1): 24-7, 2004.

44. López-Cisternas, J.; Castillo-Díaz, J.; Traipe-Castro, L.; López-Solís, R.O. "Use of polyurethane minisponges to collect human tear fluid". *Cornea*. 25(3): 312-8, 2006.
45. Kaercher, T.; Bron, A.J. "Classification and diagnosis of dry eye". *Dev Ophthalmol*. 41: 36-53, 2008.
46. McMonnies, C.W.; Ho, A. "Responses to a dry eye questionnaire from a normal population". *J Am Optom Assoc*. 58: 588-91, 1987.
47. Schiffman, R.M.; Christianson, M.D.; Jacobsen, G.; Hirsch, J.D.; Reis, B.L. "Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index". *Arch Ophthalmol*. 118: 615-21, 2000.
48. Versura, P.; Frigato, M.; Cellini, M.; Mulè, R.; Malavolta, N.; Campos, E.C. "Diagnostic performance of tear function tests in Sjogren's syndrome patients". *Eye (Lond)*. 21: 229-37, 2007.
49. Sullivan, B.D.; Whitmer, D.; Nichols, K.K.; Tomlinson, A.; Foulks, G.N.; Geerling, G.; Pepose, J.S.; Kosheleff, V.; Porreco, A.; Lemp, M.A. "An objective approach to dry eye disease severity". *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 51: 6125-30, 2010.
50. Abelson, M.B.; Ousler, G.W. 3rd; Maffei, C. "Dry eye in 2008". *Curr Opin Ophthalmol*. 20: 282-6, 2009.
51. Evans, K.S.; North, R.V.; Purslow, C. "Tear ferning in contact lens wearers". *Ophthalmic Physiol Opt*. 29: 199-204, 2009.
52. Felberg, S.; Cordeiro, H.; Sato, E.H.; Martini Filho, D.; Nishiwaki-Dantas, M.C.; Endo, R.M.; Dantas, P.E. "Reproducibility of the classification of ocular ferning patterns in Sjogren's syndrome patients". *Arq Bras Oftalmol*. 71: 228-33, 2008.
53. Ravazzoni, L.; Ghini, C.; Macrí, A.; Rolando, M. "Forecasting of hydrophilic contact lens tolerance by means of tear ferning test". *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 236: 354-8, 1998.
54. Rolando, M. "Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes". *Chibret Int. J. Ophthalmol*. 2: 32-41, 1984.

55. Tuisku, I.S.; Konttinen, Y.T.; Konttinen, L.M.; Tervo, T.M. "Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjögren's syndrome". *Exp Eye Res.* 86: 879-85, 2008.
56. De Paiva, C.S.; Pflugfelder, S.C. "Corneal epitheliopathy of dry eye induces hyperesthesia to mechanical air jet stimulation". *Am J Ophthalmol.* 137: 109-15, 2004.
57. Situ, P.; Simpson, T.L.; Fonn, D.; Jones, L.W. "Conjunctival and corneal pneumatic sensitivity is associated with signs and symptoms of ocular dryness". *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49: 2971-6, 2008.
58. Hieselaar, L.C.; Hogeweg, M.; de Vries, C.L. "Corneal sensitivity in patients with leprosy and in controls". *Br J Ophthalmol.* 79(11): 993-5, 1995.
59. Mirzajan, A.; Khezri, F.; Jafarzadehpur, E.; Karimian, F.; Khabazkhoob, M. "Normal corneal sensitivity and its changes with age in Tehran, Iran". *Clin Exp Optom.* 98(1): 54-7, 2015.
60. Martin, X.Y.; Safran, A.B. "Corneal hypoesthesia". *Survey of Ophthalmology.* 33(1): 28-40, 1988.
61. Choy, C.K.; Cho, P.; Benzie, I.F. "Antioxidant content and ultraviolet absorption characteristics of human tears". *Optom Vis Sci.* 88(4): 507-11, 2011.
62. Khezri, F.; Mirzajani, A.; Karimian, F.; Jafarzadehpur, E. "Is Corneal Sensitivity Sex Dependent?" *Journal of Ophthalmic & Vision Research.* 10(2): 102-105, 2015.
63. Golebiowski, B.; Papas, E.B.; Stapleton, F. "Factors affecting corneal and conjunctival sensitivity measurement". *Optom Vis Sci.* 85(4): 241-6, 2008.
64. Mantelli, F.; Moretti, C.; Macchi, I.; Massaro-Giordano, G.; Cozzupoli, M.G.; Lambiase, A.; Bonini, S. "Effects of Sex Hormones on Ocular Surface Epithelia: Lessons Learned from Polycystic Ovary Syndrome". *J Cell Physiol.* 9999: 1-5, 2015.
65. Riss, B.; Binder, S.; Riss, P.; Kemeter, P. "Corneal sensitivity during the menstrual cycle". *Br J Ophthalmol.* 66(2): 123-6, 1982.
66. Liu, H.; Sheng, M.; Liu, Y.; Wang, P.; Chen, Y.; Chen, L.; Wang, W.; Li, B. "Expression of SIRT1 and oxidative stress in diabetic dry eye". *Int J Clin Exp*

- Pathol. 8(6): 7644-53, 2015.
67. Deng, R.; Hua, X.; Li, J.; Chi, W.; Zhang, Z.; Lu, F.; Zhang, L.; Pflugfelder, S.C.; Li, D.Q. "Oxidative stress markers induced by hyperosmolarity in primary human corneal epithelial cells". PLoS One. 10(5): 1-16, 2015.
68. Čejková, J.; Čejka, Č. "The role of oxidative stress in corneal diseases and injuries. Histol Histopathol". 30(8): 893-900, 2015.
69. Rodrigo, R.; Prat, H.; Passalacqua, W.; Araya, J.; Bächler, J.P. "Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension". Clin Sci (Lond). 114(10): 625-34, 2008.
70. Desai, V.; Prasad, N.R.; Manohar, S.M.; Sachan, A.; Narasimha, S.R.; Bitla, A.R. "Oxidative stress in non-obese women with polycystic ovarian syndrome". J Clin Diagn Res. 8(7): 1-3, 2014.
71. Klopčič, I.; Poberžnik, M.; Mavri, J.; Dolenc, M.S. "A quantum chemical study of the reactivity of acetaminophen (paracetamol) toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine with deoxyguanosine and glutathione". Chem Biol Interact. 242: 407-14, 2015.

Anexo 1: Inervación Corneal

Tipo de Nociceptores	Estímulo al que responden	Sensación que produce estímulo	Inervación corneal (%)
Mecánicos (bajo y alto umbral)	Fuerza mecánica	Dolor agudo punzante	20%
Polimodales	Temperaturas extremas Irritantes químicos Mediadores endógenos de inflamación (SP, CGRP)	Irritación sostenida asociada a la cicatrización	70%
Frío	Frío	Sensación de frío	10%

* Adaptado de *Belmonte C; Acosta MC; Gallar J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. Exp Eye Res. 2004;78:513-25. (Ref 18)*

Anexo 2: OSDI

Nombre: _____ Fecha: _____

1. ¿Ha experimentado cualquiera de los siguientes síntomas durante la última semana?

	Todo el tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	Algunas veces	Nunca
1.Sensibilidad ocular a la luz (le molestan los ojos con el sol)	4	3	2	1	0
2.Sensación de arena en los ojos (cuerpo extraño en los ojos)	4	3	2	1	0
3. Irritación o dolor ocular (puntadas o clavadas en los ojos)	4	3	2	1	0
4.Visión Borrosa (no ve nítido a pesar de sus lentes)	4	3	2	1	0
5.Mala Visión (no ve bien o ve poco personas u objetos)	4	3	2	1	0

Subtotal pregunta 1 _____

2. ¿Hace más o menos cuanto tiempo presenta estos síntomas?

3. ¿Sus problemas oculares han limitado la realización de alguna de las siguientes actividades durante la última semana?

	Todo el tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	Algunas veces	Nunca No aplicable
1.Leer (o ver de cerca)	4	3	2	1	0
2.Conducir de noche (ver letreros o locomoción)	4	3	2	1	0
3. Trabajar en el computador	4	3	2	1	0
4. Ver televisión	4	3	2	1	0

Subtotal pregunta 3 _____

4. ¿Ha sentido molestias oculares en alguna de estas situaciones durante la última semana?

	Todo el tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	Algunas veces	Nunca No aplicable
1. Clima ventoso (andar en el auto con las ventanas abiertas, secador, ventilador)	4	3	2	1	0
2. Áreas secas con baja humedad (con estufa, en la cocina o lugares cerrados con humo, si viajan al norte o lugar seco)	4	3	2	1	0
3. Áreas con aire acondicionado (aire acondicionado del auto, en Mall)	4	3	2	1	0

Subtotal pregunta 4 _____

Suma subtotales	
Preguntas contestadas	
Puntaje OSDI (sum score *25 /n questions)	
Clasificación OSDI	

Clasificación OSDI	
Normal	0-12 puntos
Leve	13-22 puntos
Moderado	23-32 puntos
Severo	33-100 puntos

Anexo 3:

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de Tesis de Magister: “Alteraciones de la calidad del fluido lagrimal y de la sensibilidad corneal en pacientes con Síndrome de Ojo Seco”.

Nombre del Investigador principal: Dr José Manuel Guajardo B

Institución: Universidad de Chile

Teléfonos: 946 21 33 – 09 9883 39 74

Invitación a participar: Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación “**Alteraciones de la calidad del fluido lagrimal y de la sensibilidad corneal en pacientes con Síndrome de ojo seco**”, debido a que usted reúne ciertas características que consideramos pueden aportar información y contribuir a un mejor diagnóstico y tratamiento del Síndrome de Ojo Seco, tanto en usted como en otros pacientes.

Objetivos: Esta investigación tiene por objeto profundizar nuestro conocimiento del Síndrome de Ojo Seco y sus características clínicas. El estudio incluirá a un número total de 60 pacientes, de dos hospitales o centros de salud de la Región Metropolitana (Fundación Oftalmológica Los Andes y Hospital del Salvador).

Procedimientos: Si Ud. acepta participar será sometido, hasta en 2 oportunidades a los siguientes procedimientos: llenado por escrito de dos cuestionarios y evaluación Oftalmológica completa en el Laboratorio de Lágrimas – FOLA, lo que incluye evaluación de la superficie ocular en lámpara de hendidura, tinción corneal con métodos estandarizados, recolección de fluido lagrimal mediante mini esponjas, medición de la sensibilidad corneal de contacto. Posteriormente se le administrará el tratamiento indicado para su patología y se derivará para control con su Médico tratante en la Institución correspondiente. Cabe mencionar que la mayor parte de ésta evaluación corresponde a la que se realiza en forma rutinaria a pacientes con Ojo Seco.

Riesgos: La tinción del segmento anterior, recolección de fluido lagrimal y la medición de sensibilidad corneal pueden acompañarse de los siguientes efectos indeseados: alergia a alguno de los compuestos utilizados, sensación de discomfort local transitoria, erosiones pequeñas localizadas transitorias y rara vez infección de la superficie anterior del ojo (conjuntivitis, queratitis). Cualquier otro efecto que Ud. considera que puede derivarse de alguno de estos procedimientos deberá comunicarlo al Dr. José M. Guajardo en el teléfono 09 9883 39 74.

Costos: Las técnicas a utilizar en este estudio (papelillos de fluoresceína, rosa de Bengala, verde Lisamina, mini esponjas y reactivos químicos necesarios en análisis de lágrima) serán aportados por el Laboratorio de estrés oxidativo (ICBM – Universidad de Chile) y el Laboratorio de lágrima (FOLA) sin costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto.

Aquellos exámenes que no correspondan al Laboratorio de lágrima, así como medicamentos, colirios, hospitalizaciones y honorarios necesarios para el tratamiento de su enfermedad deberán ser financiados por Ud. o su sistema previsional.

Beneficios: Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio le traerá los siguientes beneficios: conocer en forma detallada el nivel de gravedad de su enfermedad, realizar un ajuste a su terapia actual o iniciarla en caso de no estar previamente diagnosticada, eventualmente ser seleccionado para un nuevo estudio de prueba de una nueva terapia.

Alternativas: Si Ud. decide no participar en esta investigación recibirá el estudio y tratamiento que se aplica habitualmente, los que también pueden tener efectos adversos, descritos por el fabricante.

Compensación: Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

Información adicional: Ud. o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

Complicaciones: En el improbable caso de que Ud. presente complicaciones directamente dependientes de la administración de tinción vital del segmento anterior, mini esponjas o estesiometría, Ud. recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

Derechos del participante: Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Investigador: Dr José Manuel Guajardo B - 09 9 883 39 74 –
jm_guajardo@med.uchile.cl
Autoridad de la Institución: Dr Leonidas Traipe C, Fundación Oftalmológica Los
Andes – 3704600

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto **“Alteraciones de la calidad del fluido lagrimal y de la sensibilidad corneal en pacientes con Síndrome de Ojo Seco”**.

_____ Nombre del sujeto	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre de informante	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del investigador	_____ Firma	_____ Fecha

Nota: Si se trata de un paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.

FRAT (μM)			
	Control	SOS	Total
Todos	376,6 \pm 163,5 [324-428]	380,7 \pm 101,1 [337-424]	378,1 \pm 142,9 [342-414]
Subgrupo Hombres	370,3 \pm 177,9 [291-449]	347,7 \pm 64,7 [297-397]	363,7 \pm 152,9 [307-419]
Subgrupo Mujeres	384,4 \pm 148,6 [310-458]	402,0 \pm 116,1 [334-469]	392,1 \pm 133,5 [343-440]

