



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

EVALUACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LÁGRIMA EN EL SÍNDROME DE OJO SECO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:
ALDEN ALMANZA GUTIÉRREZ

Tutora:
Dra. María Del Carmen Jiménez Martínez
Facultad De Medicina, Universidad Nacional Autónoma De México

Ciudad Universitaria, Ciudad De México, octubre 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Marco teórico: La superficie de ojo está formada por la película lagrimal, teniendo un papel fundamental, particularmente en proporcionar mecanismos de defensa contra agentes oxidantes ya que potencialmente reaccionar con otros compuestos celulares produciendo daño celular. Este mecanismo en conjunto se conoce como capacidad total antioxidante (CAT). El ácido ascórbico (AA) es uno de estos siendo uno de los principales encontrados en lágrima. En el ojo se ha asociado un desbalance de estos mecanismos en el síndrome de ojo seco.

Objetivo: Comparar la producción de antioxidantes en lágrima entre pacientes con síndrome de ojo seco e individuos sanos.

Metodología: Es un estudio observacional, transversal y comparativo. Se realizó una toma de muestra de lágrima a pacientes con ojo seco y en controles. Se realizó cuestionario de Índice de Enfermedad de Superficie Ocular (OSDI) para evaluar los síntomas relacionados con el ojo seco. Se determinó la capacidad antioxidante total (CAT) y Ácido Ascórbico (AA) en lágrima por colorimetría. Para la valoración clínica de la superficie ocular se realizaron pruebas de Schirmer y el Tiempo de Ruptura de la película lagrimal (TBUT). El tamaño de muestra fue a conveniencia. El análisis estadístico fue descriptivo. El valor de p debía ser ≤ 0.05 para demostrar la significancia de las comparaciones.

Resultados: Se reclutaron 28 sujetos, clasificados en 15 sanos, 5 leves y 8 moderados/severos. Se determinó la cantidad y calidad de lágrima en los diferentes estadios del síndrome de ojo seco y sujetos sanos. La correlación entre la CAT y el resultado OSDI fue de 0.315. La concentración de ácido ascórbico (AA) fue de 104.8 $\mu\text{M} / \text{L}$, 395.2 $\mu\text{M} / \text{L}$ y 61 $\mu\text{M} / \text{L}$ respectivamente.

Conclusiones: No se encontró relación entre la severidad de síntomas y los niveles de ácido ascórbico, cantidad y calidad de lágrima producida. Los sujetos con mayor severidad sintomática presentaron una menor CAT en comparación con sujetos sanos.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	6
SUPERFICIE OCULAR	6
PELÍCULA LAGRIMAL.....	9
OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES.....	11
SÍNDROME DE OJO SECO.....	15
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO GENERAL	20
UNIVERSO DE ESTUDIO	20
TAMAÑO DE MUESTRA	20
CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA	20
MÉTODOS.....	23
HISTORIA CLÍNICA MÉDICA.	23
ENCUESTA DEL ÍNDICE DE ENFERMEDAD DE SUPERFICIE OCULAR (OSDI).....	24
MUESTRA DE LÁGRIMA.....	24
VALORACIÓN OFTALMOLÓGICA.	25
PROCESAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LA MUESTRA DE LÁGRIMA.....	29
INTERPRETACIÓN DE LA MUESTRA DE LÁGRIMA.....	31
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DEL CUESTIONARIO OSDI.....	32
VALORACIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR.....	33
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	34
CONSENTIMIENTO INFORMADO.	34
CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD.....	35
FINANCIAMIENTO Y SITIO DE LA INVESTIGACIÓN.....	37
DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES	37

RESULTADOS	38
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	38
EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LÁGRIMA DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	43
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	53
Anexo 1. Consentimiento informado.	53
Anexo 2. Cuestionario para valorar el Índice de Enfermedad de Superficie Ocular (OSDI).	57

DEDICATORIA

A mi esposa Karla, por la grandiosa aventura que hemos compartido en esta vida.

A mis papás, Silvia y Beto, por apoyarme en cada proyecto y ser la luz en mi camino.

A mi tío Leopoldo, por sus enseñanzas de vida.

A mi tutora, la doctora Jiménez, por abrirme las puertas en diferentes proyectos e impulsarme a mejorar profesionalmente día con día.

AGRADECIMIENTOS

Por ser un programa perteneciente al programa nacional de posgrados, CONACYT apoyó los estudios de maestría durante la realización de este proyecto.

INTRODUCCIÓN

El ojo es un sistema complejo que proporciona un sentido visual de nuestro entorno. Para realizar esta función, los rayos de luz que son reflejados por los objetos que nos rodean, hasta llegar al ojo, particularmente la retina, la cual es su capa más profunda, en donde se traduce el estímulo de los rayos luz en un estímulo eléctrico que se transmite por el nervio óptico hasta llegar a la corteza del cerebro para su interpretación (Vera Díaz & Doble, 2012). Para lograr que los rayos luz lleguen hasta la retina, primero deben atravesar película lagrimal y la córnea, después el humor acuoso, lente cristalino y humor vítreo. La córnea y lente cristalino conforman el sistema óptico, el cual tiene un poder de refracción de 60 dioptrías permitiendo satisfactoriamente concentrar los rayos de luz en la retina.

MARCO TEÓRICO

SUPERFICIE OCULAR

Para poder entender el impacto de la conjuntivitis alérgica en el órgano blanco, es necesario mencionar que la superficie ocular (SO) y los anexos también pueden verse afectados. La SO es una entidad anatómicamente compuesta por diferentes estructuras oculares (de la parte más externa a la interna): 1) película lagrimal, 2) conjuntiva, 3) córnea y 4) limbo esclerocorneal; y los anexos, 5) glándula lacrimal (principal y accesorias), párpados y pestañas.

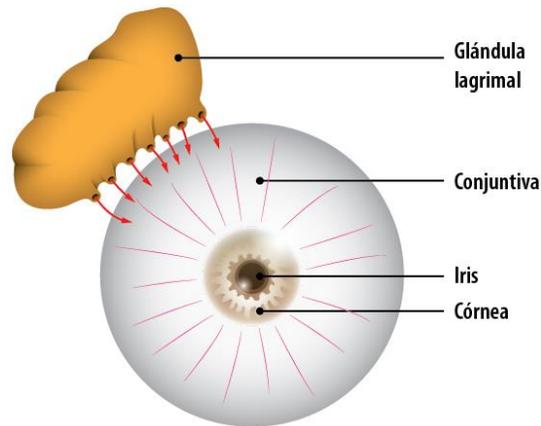


Figura 1. Esquematización de la superficie ocular.

Desde el punto de vista oftalmológico, la SO tiene la función de mantener y proteger el medio intraocular, además de proporcionar una correcta visión, por ejemplo, si la película lagrimal es inestable, escasa o cualitativamente anormal, la SO se ve afectada y viceversa. Pero, las relaciones son más extensas y complejas: la SO, sus anexos y los arcos reflejos que los interconectan (V y VII pares craneales) constituyen una unidad funcional; el fracaso o alteración (sin importar la causa) de cualquiera de sus componentes conlleva el fracaso o alteración de toda esta estructura.

La primera descripción en la que se consideró al ojo como un todo, la realizó P. B. Medawer en la década de 1940. Medawer hizo la primera referencia de “privilegio inmune” demostrando que los aloinjertos de piel colocados dentro de la cámara anterior del ojo sobrevivían indefinidamente en contraste con su rápido rechazo en otros tejidos más convencionales, como la piel; pero la referencia sólo incluía a los

componentes de la cámara anterior del ojo y la única descripción que hace de la SO son las características histológicas de la córnea, y de manera más precisa, a la ausencia de vasos, es decir, a señalar que es un tejido avascular; por lo que está implícitamente impedida la migración o presencia de algún componente del sistema inmune. Lo que Medawer desconocía para ese momento histórico eran los diversos elementos de la respuesta inmune que están presentes en la SO, el primero y más importante: su condición de tejido mucoso.

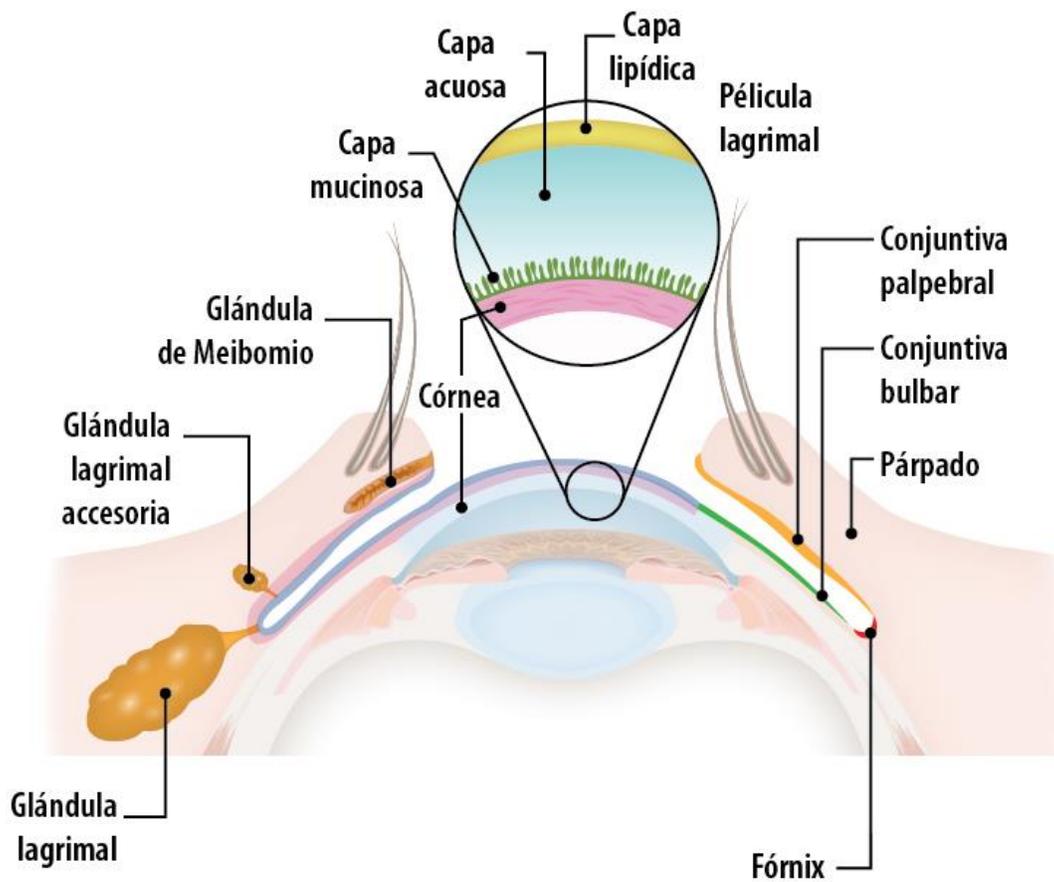


Figura 2. Estructuras que conforman la superficie ocular.

PELÍCULA LAGRIMAL.

La superficie de ojo está formada por la película lagrimal en la parte anterior o más externa e inmediatamente detrás se encuentra la córnea y conjuntiva. Esta película lagrimal es formada inmediatamente después del parpadeo, permitiendo que el ojo se mantenga abierto por suficiente tiempo mientras entra en una fase de deformación o ruptura (Iskander, Collins, & Davis, 2005). Además, la apertura palpebral permite extenderla a lo largo de toda la superficie. Durante el cierre de los párpados, la lágrima es barrida hacia el canto interno en donde se encuentra un drenaje denominado vía lagrimal, desembocando en el meato medio e inferior de la nariz.

La película lagrimal tiene un papel fundamental en el sistema óptico comentado previamente, ya que crea una suave y uniforme interfaz óptica que mejora el paso de luz a través del ojo (Bai, Ngo, Gu, Zhang, & Nichols, 2018) permitiendo mantener una imagen de calidad hacia la retina (Tutt, Bradley, Begley, & Thibos, 2000).

Otras funciones de la película lagrimal son proporcionar nutrición a las estructuras subyacentes, lubricarlas y formar una barrera química (Bolaños Jiménez, y otros, 2015), las cuales se comentarán a detalle a lo largo del texto.

La película lagrimal consta a la vez de 3 capas, una capa lipídica más externa, una capa acuosa central y una capa mucosa interior.

La capa lipídica se encuentra en contacto directo con el exterior. Sus componentes lipídicos son continuamente secretados hacia la película lagrimal por las glándulas

de Meibomio (Bum-Joo , y otros, 2019). Estas glándulas se encuentran distribuidas a lo largo del párpado, entre las pestañas y la conjuntiva.

Su función primordial es mantener estable la película lagrimal debido a que disminuye la tensión superficial y en consecuencia evita la rápida evaporación. Esta capa está compuesta por una variedad de lípidos tanto polares como no polares, dentro de los cuales se encuentran esteroides de colesterol, esteroides serosos, triacilglicéridos y ácidos grasos libres (Butovich, 2013). Sus componentes de tipo polar permiten contar con propiedades anfipáticas permitiendo formar una interfaz hacia la capa acuosa. (Pucker & Haworth, 2015).

La capa acuosa proviene de la secreción de la glándula lagrimal y de las glándulas accesorias de Krause y Wolfring. Estas últimas contribuyen con un 10% de la secreción acuosa.

La glándula lagrimal se encuentra ubicada en la parte superotemporal de la órbita ocular y tiene un tamaño aproximado de 20 x 12 x 4 mm. Está formada por lóbulos que se encuentran separados por tejido conectivo. Sus conductos excretores desembocan hacia el fondo de saco de la conjuntiva. Por otra parte, las glándulas accesorias se encuentran difusas, las glándulas de Krause están localizadas en el fondo de saco conjuntival y las glándulas de Wolfring en la placa tarsal del párpado. (Conrady, Joos, & Patel, 2016).

En conjunto las glándulas lagrimales secretan agua, electrolitos, proteínas y mucinas hacia la película lagrimal. Recientemente se han reportado que la lágrima contiene cerca de 2000 proteínas (Zhou & Beuerman, 2017), dentro de las cuales

destacan lisozima, lactoferrina, albúmina, inmunoglobulina en sujetos sanos (Gachon, Richard, & Dastugue, 1982). Se han identificado 18 enzimas antioxidantes en lágrima cuya función es la participación en la respuesta ante el estrés oxidativo. (de Souza, Godoy, & Mann, 2006).

Las mucinas son glicoproteínas de características hidrofílicas que permiten anclar la capa acuosa a la superficie ocular gracias a que el 80% de sus carbohidratos se encuentran o-glicosilados a residuos de serina y treonina, formando una capa mucosa. Además, permiten la lubricación del ojo, protección epitelial y prevención de invasión bacteriana y sirven para anclar otras proteínas antimicrobianas a la superficie ocular. (William, 2010). Las mucinas son expresadas por las células caliciformes, las cuales se encuentran intercaladas en el epitelio conjuntival y corneal. Funcionalmente las mucinas se dividen en transmembrana y solubles. MUC1, MUC4, MUC16 han sido identificadas como mucinas de transmembrana, de forma soluble se encuentran MUC2, MUC5AC y MUC19. (Galicia Carreon, Santacruz, Hong, & Jiménez Martínez, 2013).

OXIDANTES Y ANTIXIDANTES.

El oxígeno es una molécula imprescindible en los seres humanos ya que a través de la oxidación de los carbohidratos y otros compuestos orgánicos se obtiene energía y esta es almacenada en forma de ATP. Normalmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), al igual que el nitrógeno (N_2) sin embargo,

por reacciones químicas, enzimáticas y por efecto de radiaciones se pueden producir, a partir de estos, moléculas que contienen uno o más electrones no apareados, mejor conocidos como radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN) son radicales libre con capacidad potencial de reaccionar con otros compuestos celulares, alterando su estructura y por ende producir daño celular. Los EROs incluyen a radicales hidroxilo (OH^\bullet), anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Matés, Pérez Gómez, & Núñez de Castro, 1999).

Desde el punto de vista bioquímico los lípidos celulares son fácilmente oxidados por las EROs, especialmente el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico. De igual forma interactúa con las cadenas laterales de las proteínas, con los ácidos nucleicos y con la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. (Pisoschi & Pop, 2015).

Tabla 1. Radicales libres de oxígeno y de nitrógeno.

	Símbolo		Símbolo
Radicales libres de oxígeno (ROS)		Radicales libres de nitrógeno (RNS)	
Radicales		Radicales	
Superóxido	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Óxido nítrico	NO^\bullet
Hidroxilo	OH^\bullet	Dióxido de nitrógeno	NO_2^\bullet
Radical alcoxilo	RO^\bullet	No radicales	
Radical peroxilo	ROO^\bullet	Peroxinitrito	ONOO^-
No radicales		Catión nitrosilo	NO^+
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Anión nitroxilo	NO^-
Singulete de oxígeno	$^1\text{O}_2$	Trióxido de dinitrógeno	N_2O_3

Ozono	O ₃	Tetraóxido de dinitrógeno	N ₂ O ₄
Peróxido orgánico	ROOH	Ácido nitroso	HNO ₂
Ácido hipocloroso	HOCl	Ácido peroxinitroso	ONOOH
Ácido hipobromoso	HOBr	Cloruro de nitrilo	NO ₂ Cl

Los EROs se pueden clasificar en base a su fuente de origen en endógenos, exógenos y patológicos. La radiación tiene un papel como fuente tanto exógena como patológica¹⁵. Los endógenos se derivan de la cadena transportadora de electrones, por actividad de las enzimas del citocromo P450, la xantina oxidasa y urato oxidasa (Lassen, Black, Estey, & Vasiliou, 2008). Por ende, de manera fisiológica se encuentran en concentraciones bajas y estos niveles están determinados por el balance entre su velocidad de producción y su remoción por compuestos antioxidantes (Dröge, 2002).

La función de los antioxidantes es reducir los niveles de oxidantes o radicales libres en el organismo, estimular el crecimiento normal de las células, proteger a las células contra el envejecimiento prematuro o anormal, ayudar a controlar la degeneración molecular relacionada a la edad y dar soporte al sistema inmunológico. (Kattappagari, y otros, 2015). Los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos.

Algunos antixodantes de tipo enzimático son la Superoxido Dismutasa (SOD), Glutación Peroxidasa (GPx) y Catalasa (CAT). Los no enzimáticos principales son el Ácido Ascórbico (Vitamina C), alfa-Tocoferol (Vitamina E), glutatión (GSH) y Vitamina A.

La enzima SOD tiene tres isoenzimas: SOD1, SOD2 y SOD 3. SOD1 representa un 90% del total de actividad enzimática y se encuentra distribuida en todos los tejidos. En los compartimentos oculares se ha encontrado en diferentes concentraciones, mayoritariamente se encuentra en la retina, después en córnea, esclera, cristalino y en poca cantidad en el humor acuoso y lágrima. (Behndig, Svensson, Marklund, & Karlsson, 1998).

A diferencia de la baja concentración de estos antioxidantes tipo enzimáticos, el ácido ascórbico se encuentra en altas concentraciones en lágrima. El ácido ascórbico (AA), comúnmente llamado vitamina C porque es un micronutriente que se necesita obtener de forma exógena, a diferencia de otras especies como el murciélago y cobayo. Su fórmula química es $C_6H_8O_6$, tiene un peso molecular de 176.13 Daltones, es una molécula hidrosoluble con propiedades reductoras (Serra & Cafaro, 2007) ya que permiten barrer o acarrear los electrones no apareados en el medio.

La liberación EROs al medio extracelular puede dañar el tejido circundante, promoviendo procesos inflamatorios. Se ha observado el aumento de citocinas pro-inflamatorias, como (IL)-1, IL-6, IL-8, y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) en lágrima y epitelio conjuntival en pacientes con enfermedad de Ojo Seco (Massingale, 2009).

Es por esto que cuando hay un desbalance entre la producción de las ERO/ERN y la capacidad de contrarrestar sus efectos a través de los antioxidantes, se produce el estrés oxidativo. El estrés oxidativo se ha relacionado con múltiples enfermedades, por ejemplo, en enfermedad de Parkinson, Alzheimer, cáncer,

enfermedades cardiovasculares. (Pisoschi & Pop, 2015). A nivel ocular se ha asociado con la formación de cataratas, uveítis, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada a la edad y glaucoma de ángulo abierto (Cejka & Cejkova, 2015). En el síndrome de Sjögren se ha demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en su fisiopatología (Wakamatsu, y otros, 2013).

De hecho, en pacientes con ingesta de antioxidantes orales, se demostró que mejoran en la sintomatología de ojo seco. (Huang, Yeh, & Hou, 2016).

SÍNDROME DE OJO SECO

Este síndrome se define como una enfermedad multifactorial caracterizada por inestabilidad de la película lagrimal causando una variedad de síntomas y/o impedimento visual, potencialmente acompañado de daño en la superficie ocular (Tsubota, Yokoi, Shimazaki, & Watanabe, 2017). Tiene origen multifactorial, en la que provoca síntomas de malestar ocular, alteraciones visuales e inestabilidad de la película lagrimal, acompañado por un aumento en la osmolaridad lagrimal e inflamación crónica en la superficie ocular (García, y otros, 2014).

Por lo anterior, el diagnóstico se realiza primordialmente por los síntomas que presenta el paciente. Adicionalmente, se cuenta con una gama de estudios de gabinete que apoyan el diagnóstico de ojo seco. Los principales son aquellos que miden la cantidad y calidad de lágrima producida. En el primer caso se cuenta con

la prueba de Schirmmer, en la cual, a través de un papel filtro, se mide la cantidad de lágrima que se produce en 5 minutos.

Para medir la calidad, se ha implementado la tinción corneal y la medición del tiempo de la película lagrimal. La tinción se realiza con fluoresceína sobre la superficie ocular y a través de un filtro de azul cobalto, permite visualizar la tinción en color verde. El tiempo de ruptura lagrimal consiste en la evaluación del tiempo que tarda en aparecer un área sin colorante sobre la superficie posterior al parpadeo.

Actualmente no se cuenta con ningún estudio que permita evaluar el estado de oxido-reducción de la superficie ocular.

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El síndrome de ojo seco es un problema de salud pública, causando mayor riesgo de infecciones oculares, síntomas de malestar ocular, fatiga, alteración visual que interfiere con actividades cotidianas como leer, manejar o trabajar en computadora. En México no se cuenta con datos epidemiológicos sobre la prevalencia de la enfermedad, sin embargo, en Estados Unidos el síndrome de ojo seco es el motivo de consulta oftalmológica y por lo tanto presenta un gran costo en la salud, así como un costo indirecto por disminuir la productividad en el trabajo. En un centro de referencia oftalmológico en la ciudad de México se detectó una frecuencia del 30% de quienes acudían a consulta oftalmológica presentaban sintomatología de ojo seco y una frecuencia del 90% presentó alteración en la superficie ocular. Los métodos diagnósticos actuales miden la producción, estabilidad de la película lagrimal y síntomas de ojo seco, ninguno de los cuales es el estándar de oro hasta el día de hoy. Este estudio pretende conocer la bioquímica de la lágrima y el impacto de la óxido-reducción en el síndrome de ojo seco.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de las diversas etiologías del síndrome de ojo seco, en la fisiopatología se ve implicado el aumento en el estrés oxidativo y la consecuente inflamación en la superficie ocular. Los tratamientos actuales para el paciente con diagnóstico de ojo seco se centran en lágrimas artificiales, lo que permite únicamente aliviar los síntomas, pero no cambiar el curso de la enfermedad. Se ha observado que en pacientes tratados con medicamentos tópicos oftálmicos que disminuyen las reacciones de estrés oxidativo y pacientes tratados con antioxidantes orales presentan mejoría en la producción de lágrima, tiempo de ruptura lagrimal y en la sintomatología del ojo seco, sin embargo, no se han explorado los niveles de antioxidantes presentes en la superficie ocular de los pacientes con síndrome de ojo seco.

La información generada en este trabajo permitirá proponer un biomarcador lagrimal que permita entender los cambios bioquímicos relacionados con la óxido-reducción en el síndrome de ojo seco. El conocimiento generado en este estudio, permitirá proponer puntos de corte de antioxidantes lagrimales en los diferentes tipos de severidad clínica en el síndrome de ojo seco y posiblemente proponer estos niveles como biomarcadores de historia natural de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Existe una concentración menor de antioxidantes en lágrima de los pacientes con síndrome de ojo seco que en los individuos sanos.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la concentración de antioxidantes en lágrima entre pacientes con síndrome de ojo seco e individuos sanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la superficie ocular de pacientes con ojo seco y sujetos sanos.
- Comparar la concentración de especies reactivas de oxígeno en lágrima entre pacientes con síndrome de ojo seco e individuos sano.
- Comparar la concentración de citocinas proinflamatorias en lágrima entre pacientes con síndrome de ojo seco e individuos sano.
- Determinar el balance de especies reactivas de oxígeno/antioxidantes en lágrima entre pacientes con síndrome de ojo seco e individuos sano.

TIPO DE ESTUDIO Y DISEÑO GENERAL

Es un estudio observacional, transversal y comparativo. Se realizó una toma de muestra de lágrima a pacientes con ojo seco y en controles.

Se interrogaron aquellos factores de riesgo para presentar ojo seco como ocupación al aire libre, tabaquismo, exposición aire acondicionado, esfuerzos visuales prolongados, uso de lentes de contacto, cirugía ocular previa.

UNIVERSO DE ESTUDIO

Se estudió a los pacientes que acudieron a consulta oftalmológica en el Instituto de Oftalmología, Fundación Conde de Valenciana que presentaron sintomatología de ojo seco.

TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra se obtuvo por conveniencia.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico clínico de ojo seco.
- Pacientes con OSDI mayor a 12.

- Edad igual o mayor a 18 años.
- Aceptación de ingreso al estudio y firma del Consentimiento Informado.

Criterios de exclusión

- Enfermedades inflamatorias de superficie ocular como conjuntivitis alérgica, blefaritis, tumores conjuntivales, síndrome de Sjögren.
- Enfermedades crónicas como diabetes mellitus, artritis, y hepatitis C.

Criterios de eliminación

- Retiro de consentimiento.
- Muestra insuficiente de lágrima.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL GRUPO CONTROL

Criterios de inclusión

- Voluntarios sanos con OSDI igual o menor a 12 (Normal).
- Edad mayor o igual a 18 años.
- Aceptación de ingreso al estudio y firma del Consentimiento Informado.
- Sin enfermedades crónicas como diabetes mellitus, artritis, y hepatitis C.

Criterios de exclusión

- Alteración en prueba de Schirmer y/o en tiempo de ruptura de película lagrimal.
- Pruebas cutáneas positivas.

Criterios de eliminación

- Retiro de consentimiento.
- Muestra insuficiente de lágrima.

MÉTODOS

HISTORIA CLÍNICA MÉDICA.

Se realizó una historia clínica médica, la cual incluye identificación, interrogatorio y exploración general del sujeto. A partir de esta historia clínica se obtuvo información para conocer si contaba con los criterios de inclusión o exclusión.

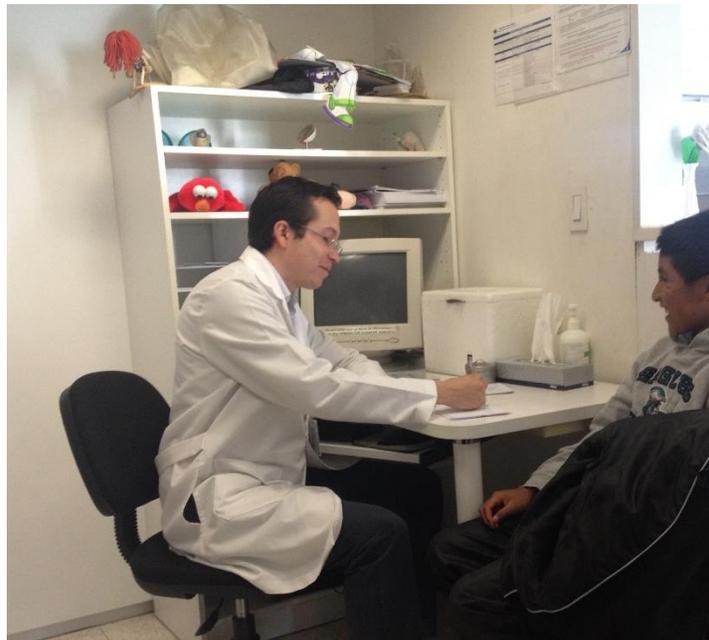


Figura 3. Investigador principal realizando interrogatorio a sujeto de estudio.

ENCUESTA DEL ÍNDICE DE ENFERMEDAD DE SUPERFICIE OCULAR (OSDI).

Se aplicó el cuestionario OSDI a cada participante, interrogando cada una de las 12 preguntas. Para cada pregunta se tenían las siguientes opciones como respuesta; “Todo el tiempo”, “La mayor parte del tiempo”, “La mitad del tiempo”, “A veces” y “Nunca”. Cada una de estas opciones tiene una puntuación de 0, 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Se solicitó que las respuestas fueran con base en su sintomatología de la última semana.

Al finalizar, se sumó cada uno de los 3 apartados (apartado A, B y C). Posteriormente se sumó el resultado de los 3 apartados (A+B+C) para obtener el resultado de calificación. Después el resultado se multiplicó por 25 y se dividió entre el total de preguntas contestadas. El resultado de la evaluación OSDI fue registrado en una base de datos para su posterior análisis. En el anexo 2 se muestra el cuestionario OSDI que se utilizó para registrar las respuestas y resultado final correspondiente.

MUESTRA DE LÁGRIMA.

En el consultorio médico, previo lavado de manos y colocación de guantes se procedió a la toma de muestra de lágrima. Primero se colocó al sujeto en posición sentada y con la cabeza inclinada hacia atrás y ligeramente de lado (hacia el ojo en la que se tomó la muestra). Se obtuvieron muestras de lágrimas de HC y PAC del

fórnix conjuntival mediante la adición de 20 μL de solución salina estéril BSS™ en la superficie ocular. Posteriormente, el lavado ocular se recuperó inmediatamente con un capilar estéril y se recogió en un microtubo de polipropileno estéril de 0.6mL. Las muestras se marcaron con el número de identificación y se almacenaron a -60°C hasta su procesamiento.



Figura 4. Toma de muestra de lágrima de ojo derecho a sujeto de estudio a través de la recaptura con tubo capilar.

VALORACIÓN OFTALMOLÓGICA.

La valoración fue realizada por un médico oftalmólogo quien, en colaboración con el investigador principal, llevó a cabo las siguientes pruebas.

Prueba de Schirmer sin anestesia

Se colocó una tira de papel con escala milimétrica (AMCON Tear Flo Test Strips Nomax, Inc St. Louis) en el párpado inferior de cada ojo entre el tercio medio y tercio externo. Ambas tiras se colocaron simultáneamente en cada ojo y se dejaron por 5 minutos mientras el paciente/sujeto mantuvo sus ojos cerrados. Al finalizar el tiempo, se retiraron ambas tiras, se midió la cantidad de humedad en el papel y se marcó en la tira. Se reportó el resultado en milímetros y fue registrado para su posterior análisis.

Prueba de Schirmer con anestesia.

Se aplicó una gota de Clorhidrato de Tetracaína (anestésico tópico) sobre la superficie ocular, esperando 5 minutos para que tuviera el efecto anestésico. Posteriormente se colocó una tira de papel con escala milimétrica (AMCON Tear Flo Test Strips Nomax, Inc St. Louis) en el párpado inferior de cada ojo entre el tercio medio y tercio externo. Ambas tiras se colocaron simultáneamente en cada ojo y se dejaron por 5 minutos mientras el paciente/sujeto mantuvo sus ojos cerrados. Al finalizar el tiempo, se retiraron ambas tiras, se midió la cantidad de humedad en el papel y se marcó en la tira. Se reportó el resultado en milímetros y fue registrado para su posterior análisis.



Figura 5. Prueba de Schirmer en ambos ojos a sujeto de estudio.

Tiempo de ruptura de la película lagrimal.

Se instiló fluoresceína en el fondo de saco conjuntival inferior a través de tiras ya preparadas (Bio Glo Fluorescein Sodium Ophthalmic Strips HUB Pharmaceuticals Cucamonga CA: 91730) y se solicitó al paciente que parpadeara varias veces para repartir el colorante por toda la película lagrimal. Posteriormente se pidió al paciente/sujeto colocarse la cabeza en la lámpara de hendidura con filtro de luz azul cobalto. El oftalmólogo exploró la superficie ocular, midiendo el tiempo transcurrido desde el último parpadeo hasta que apareció la primera mancha seca (parte de la superficie ocular que ya no presentaba colorante). El tiempo se reportó en segundos y fue registrado para su posterior análisis.

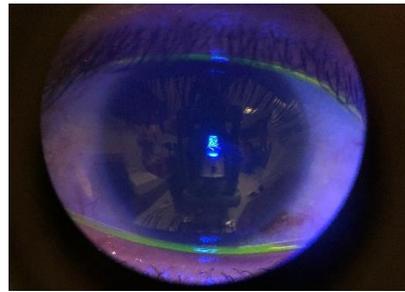
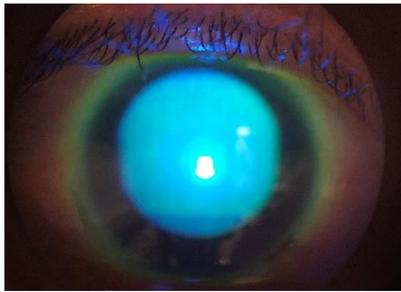
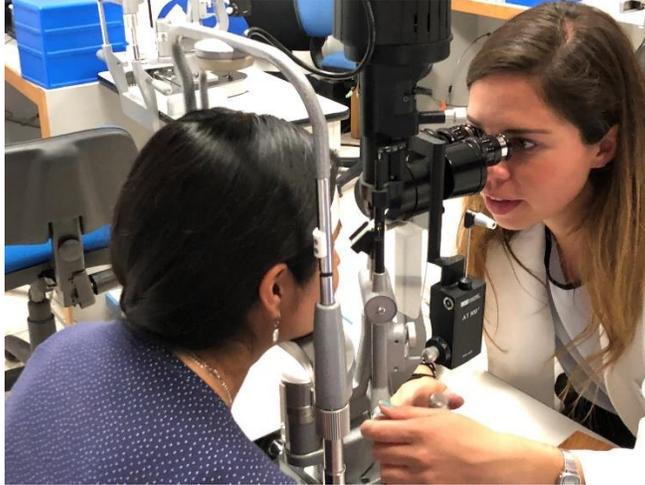


Figura 6. Evaluación del tiempo de ruptura de la película lagrimal. A. Médico oftalmólogo revisando superficie ocular del sujeto de estudio a través de la lámpara de hendidura. B. Superficie ocular teñida de fluoresceína (color verde). C. Superficie ocular con escasa tinción de fluoresceína (color verde solo a nivel de los bordes libres del parpado).

PROCESAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LA MUESTRA DE LÁGRIMA.

Para la determinación de ácido ascórbico (AA) y capacidad antioxidante total (CAT) en lágrima se utilizó el método FRASC conforme lo establecido por Man Choy y colaboradores (OxiSelect™ Ascorbic Acid Assay Kit (FRASC)). Se utilizó una placa de 96 pozos y para cada muestra se utilizaron 2 pozos (“AO+” y “AO-”).

Control de calidad en la exactitud y precisión de resultados en la determinación de AA y CAT.

Para el procesamiento e interpretación de resultados se realizó una curva estandar en la misma placa en conjunto con el procesamiento de muestras. Para la curva se realizó inicialmente la preparación de AA a diferentes concentraciones conocidas. Para ello se utilizaron 35 mg/mL de AA llevandolo a 2mM de AA. Al pozo #1 se colocaron 100 μ L de 2mM de AA y se añadieron 900 μ L de buffer, resultando una concentración final de 200 μ M de AA. Para el pozo #2 se tomaron 500 μ L del pozo #1 más 500 μ L de solución buffer. Para el pozo #3 se tomaron 500 μ L del pozo #2 más 500 μ L de solución buffer. Así subsecuentemente hasta el pozo #8. Para el pozo #9 se colocó únicamente 500 μ L de solución buffer. Las concentraciones finales de cada pozo se muestran en la tabla.

Determinación por colorimetría

Para el procesamiento de las muestras de lágrima, a cada pozo se añadieron 100 μL de ácido ascórbico (Ascorbic Acid Standard) y posteriormente se añadieron 100 μL de la muestra de lágrima. A los pozos "AO+" se añadió ascorbato oxidasa. Se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100 μL de reactivo de reacción a todos los pozos. Se mezcló y dejó incubar por 3 minutos. En la imagen 5 se muestra la placa de 96 pozos con las muestras.

Tabla 2. Concentración de ácido ascórbico utilizada para la curva estandar.

Número de pozo	Concentración final de ácido ascórbico (μM)
1	200
2	100
3	50
4	25
5	12.5
6	6.25
7	3.13
8	1.56
9	0

La placa de 96 pozos se colocó en el espectrofotómetro para realizar lectura con una absorbancia de 540 nm. Los resultados fueron arrojados en densidad óptica (OD), fueron registrados en archivo de hoja de cálculo para su posterior análisis.

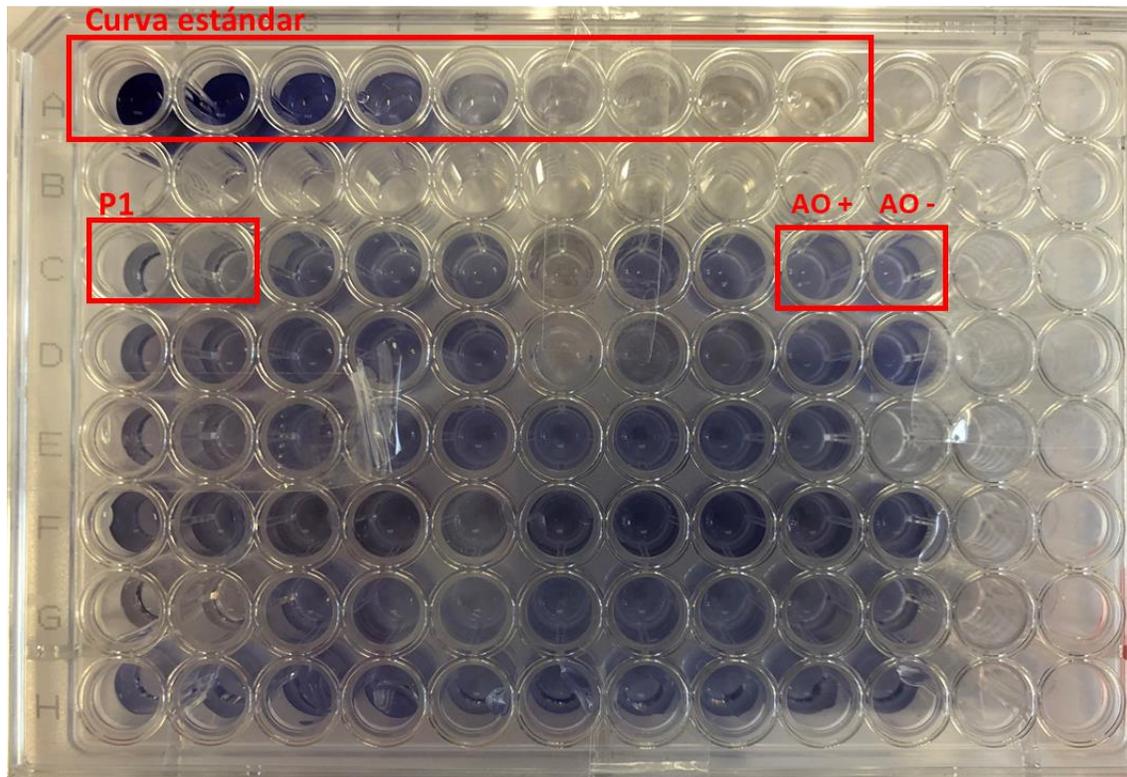


Figura 7. Placa de 96 pozos con las muestras. En los pozos A1 al A9 se encuentra la curva estándar. En los pozos C1 a H10 se encuentran las muestras de los sujetos por pares. Uno para “AO+” y otro para “AO-“.

INTERPRETACIÓN DE LA MUESTRA DE LÁGRIMA.

La determinación de capacidad antioxidante total (CAT) se determinó por la OD del pozo sin enzima ascorbato oxidasa (AO-). El resultado se reportó en nanómetros.

La determinación de ácido ascórbico contenido en cada muestra, se midió la diferencia de OD del pozo (AO-) - (AO+). El resultado se extrapoló a la curva

estándar, en la cual refiere la concentración dependiendo de la OD obtenida. El resultado se reportó en $\mu\text{M} / \text{L}$ (figura 8).

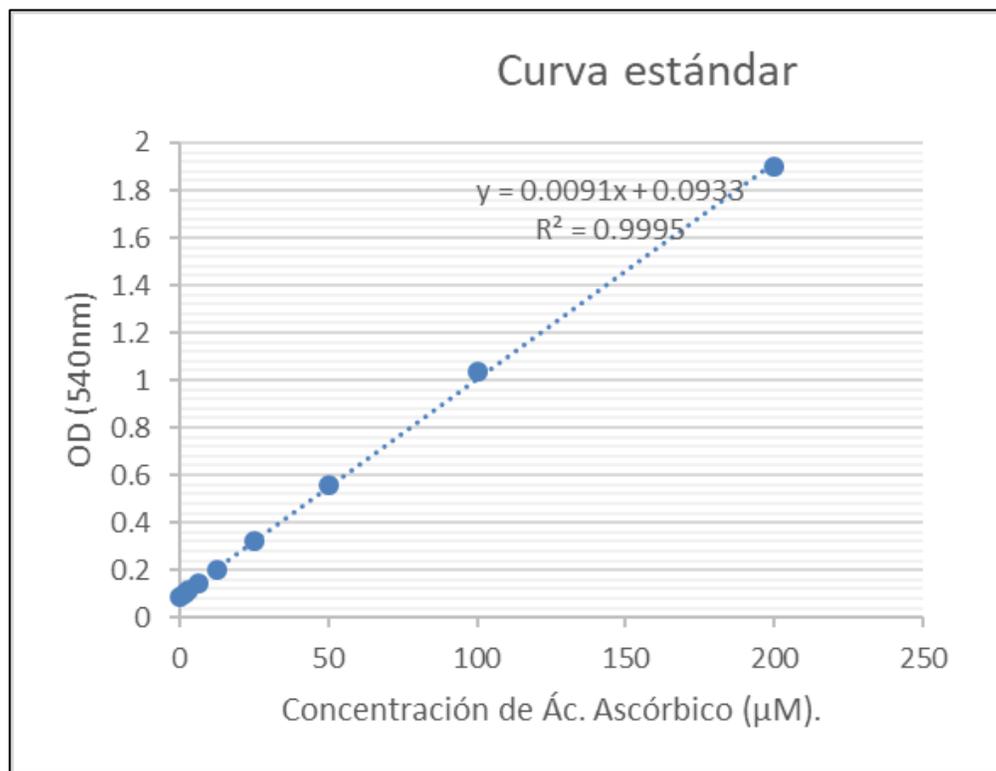


Figura 8. Curva estándar de la concentración de ácido ascórbico con respecto a la densidad óptica.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DEL CUESTIONARIO OSDI

Para el análisis de cuestionario se siguió conforme a lo reportado por Schiffman *et al*, siendo que el resultado de la evaluación OSDI se clasificó de la siguiente forma.

Tabla 3. Clasificación del ojo seco conforme el resultado de la puntuación del cuestionario OSDI.

Puntuación del resultado de evaluación OSDI	Clasificación de resultado
0 a 12	Normal
13 a 32	Leve
33 a 100	Severo / Moderado

VALORACIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR

Prueba de Schirmer con y sin anestesia.

La prueba de Schirmer permite identificar de manera cuantitativa la producción de lágrima. Cuando se realiza sin anestesia tópica, se evalúa la producción de lagrima basal y refleja. A diferencia de cuando se aplica anestesia tópica, en la cual se evalúa de forma exclusiva la producción basal. Para ambos casos, cuando la producción de lágrima en 5 minutos es menor a 5 mm, se consideró como cantidad de lagrima producida disminuida.

Tiempo de ruptura de la película lagrimal

Esta prueba permite identificar la calidad de la lágrima producida, a través de la medición de tiempo en que dicha película lagrimal se mantiene integra sobre la

superficie ocular. Cuando la integridad se ve afectada en menos de 5 segundos, se considera que la calidad es inadecuada.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Se realizó invitación a los pacientes que acudieron a consulta oftalmológica integral. Posterior a la invitación de los sujetos y pacientes para participar en el protocolo de estudio se explicó la descripción general del estudio, el personal involucrado en el proyecto, procedimientos que se realizarían, motivo del estudio, criterios para participar, riesgos a los que estarían expuestos, objetivos y beneficios que se alcanzarían con su participación. Posteriormente se entregó el consentimiento informado, se les pidió que lo leyeran y solo si estaban de acuerdo y deseaban continuar con el proceso debían firmar. Así mismo, se solicitó la firma de 2 testigos.

Aquellos que decidieron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado, se entregó copia del consentimiento firmado y el original fue resguardado. En el anexo 1 se muestra el consentimiento informado empleado a cada participante.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos que, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológico-infecciosas representan un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente; los residuos que se deriven serán manejados en términos de la propia ley, su reglamento y normas oficiales mexicanas que expida la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, previa opinión de diversas dependencias que tengan alguna injerencia en la materia correspondiéndole a la citada SEMARNAT su regulación y control.

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) serán manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-0870ECOL-SSA1-2002. La disposición de residuos se resume en la tabla 2.

Tabla 4. Disposición de residuos de acuerdo con su estado físico.

Tipo de residuo	Estado físico	Envasado	Color
Sangre	Líquido	Recipientes herméticos	Rojo
Cultivos	Sólido	Bolsas de polietileno	Rojo
Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
Patológicos	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
Residuos no anatómicos	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

Durante la realización de los ensayos experimentales del presente trabajo de investigación, se vigilará el cumplimiento de las siguientes Normas Oficiales Mexicanas (NOM):

NOM-017-STPS-2008 Para el equipo de protección personal- Selección, uso y manejo en los centros de trabajo.

NOM-005-STPS-1998. Para las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

NOM-018-STPS-2000. Para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas en los centros de trabajo.

NOM-087-ECOL-SSA1-2002. (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002). Para la protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos-biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.

FINANCIAMIENTO Y SITIO DE LA INVESTIGACIÓN

Fue otorgado por el departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM, el Programa de Maestría y Doctorado de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud de la UNAM y la “Fundación Conde de Valenciana” IAP.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de interés en los participantes en el estudio.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Se reclutaron 28 sujetos de estudio, con una edad promedio de 24 años. Conforme al resultado obtenido del cuestionario OSDI, 15 obtuvieron un resultado menor o igual a 12 puntos, 5 obtuvieron de 13 a 32 puntos y 8 obtuvieron un resultado de igual o mayor a 33 puntos.

En el grupo de sujetos sanos, la edad promedio fue de 21 años, la calificación promedio del cuestionario OSDI de 5 puntos, el promedio de la prueba de Schirmer I fue 28 mm, Schirmer II de 23 mm y el tiempo de ruptura de película lagrimal (TBUT) de 7 segundos.

En el grupo de pacientes con ojo seco leve, la edad promedio fue de 31 años, la calificación promedio del cuestionario OSDI de 20 puntos, el promedio de la prueba de Schirmer I fue 16.5 mm, Schirmer II de 15.5 mm y el TBUT de 4.5 segundos.

En el grupo de pacientes con ojo seco moderado/severo, la edad promedio fue de 25 años, la calificación promedio del cuestionario OSDI de 50 puntos, el promedio de la prueba de Schirmer I fue 19.5 mm, Schirmer II de 21 mm y el TBUT de 5.5 segundos.

En la tabla 4 se muestran los resultados de las variables clínicas de todos los grupos de estudio.

Tabla 4. Resultados de las variables clínicas realizadas en sujetos de estudio.

	Normal (OSDI 0-12) n=15 (54%)			Lev-Mod (OSDI 13-32) n=5 (18%)			Severo (OSDI 33-100) n=8 (28%)		
	Promedio	D.E.	p	Promedio	D.E.	p	Promedio	D.E.	p
Edad (años)	21	3	>0.05	31	5	>0.05	25	6	>0.05
OSDI	5	3	<0.05*	20	5	>0.05	50	7	>0.05
Schirmer I (mm)	28	12	<0.05*	16.5	17	>0.05	19.5	11.5	>0.05
Schirmer II (mm)	23	12	<0.05*	15.5	15	NV	21	11	>0.05
TBUT (s)	7	2.6	>0.05	4.5	3.5	>0.05	5.5	1.9	>0.05

Se muestran clasificados en OSDI normal, OSDI leve y OSDI moderado/severo. En cada categoría, por columna se muestra el promedio, la desviación estándar y la significación estadística. En cada fila se muestra la edad (años), la calificación OSDI, Schirmer I, Schirmer II y tiempo de ruptura de película lagrimal.

Para las pruebas de Schirmer I, Schirmer II y tiempo de ruptura de la película lagrimal no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de los 3 grupos. Las figuras 9, 11 y 13 muestran los resultados de estas pruebas por cada grupo OSDI.

Se hizo una correlación entre la cantidad de lágrima basal y refleja y el resultado del cuestionario OSDI. Los análisis se muestran en las figuras 10, 12 y 14, no encontrando una correlación significativa en las variables estudiadas.

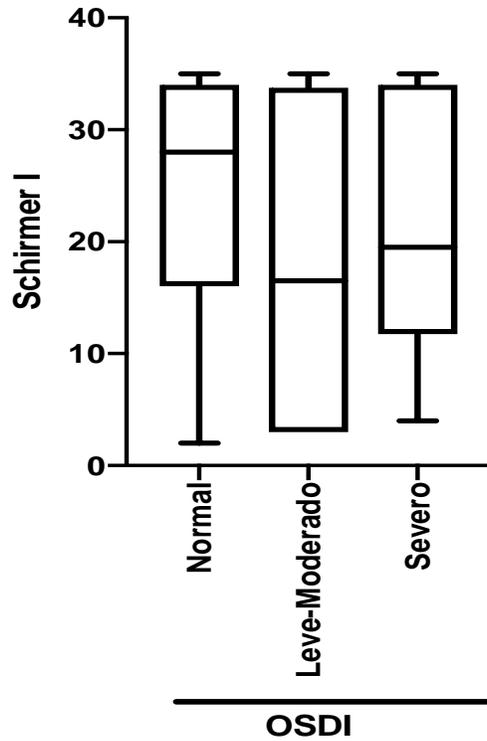


Figura 9. Producción de lágrima (basal y refleja). Se muestra la cantidad de lágrima producida en cada grupo de estudio.

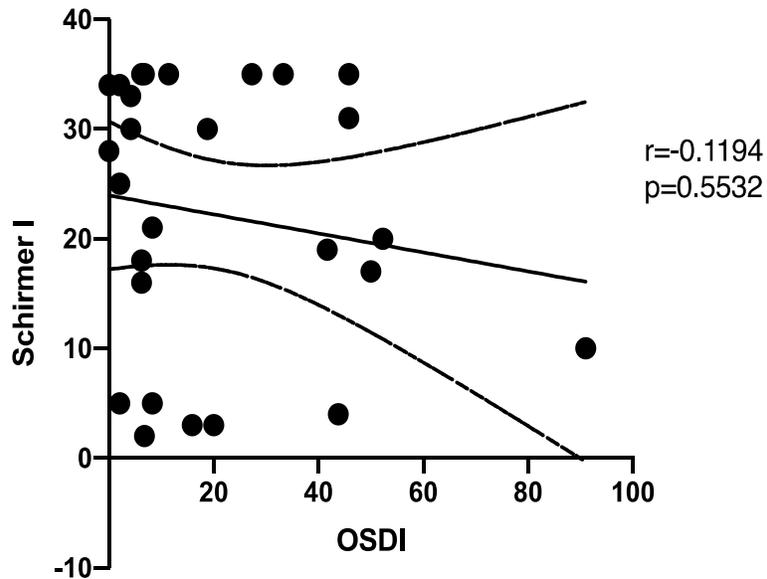


Figura 10. Correlación entre la producción de lágrima (basal y refleja) y el resultado OSDI.

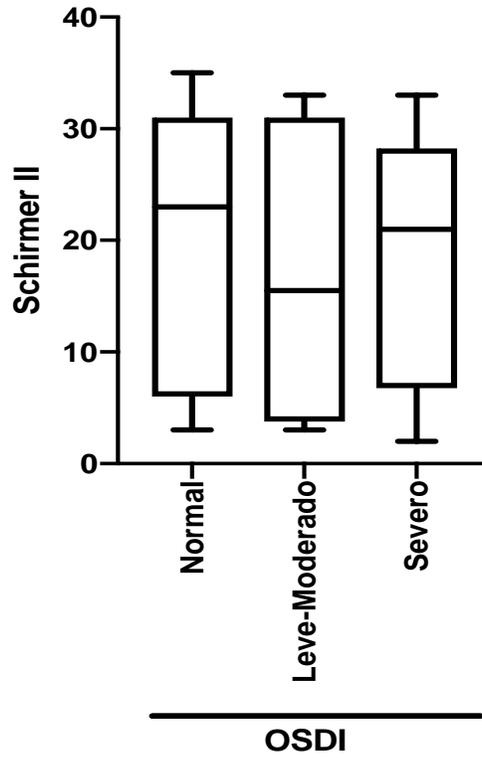


Figura 11. Producción de lágrima (basal). Se muestra la cantidad de lágrima producida en cada grupo de estudio.

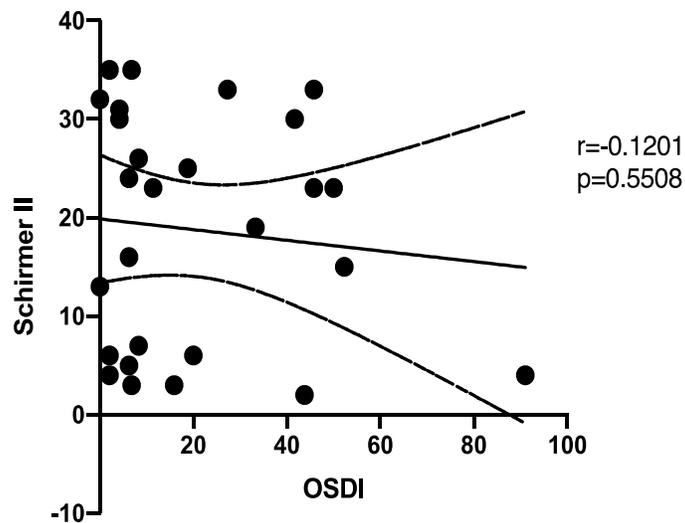


Figura 12. Correlación entre la producción de lágrima (basal) y el resultado OSDI.

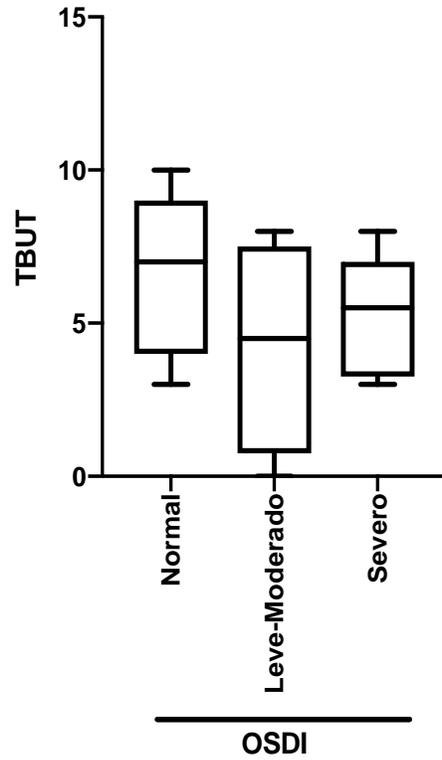


Figura 13. Calidad de lágrima. Tiempo de ruptura de la película lagrimal en cada grupo de estudio.

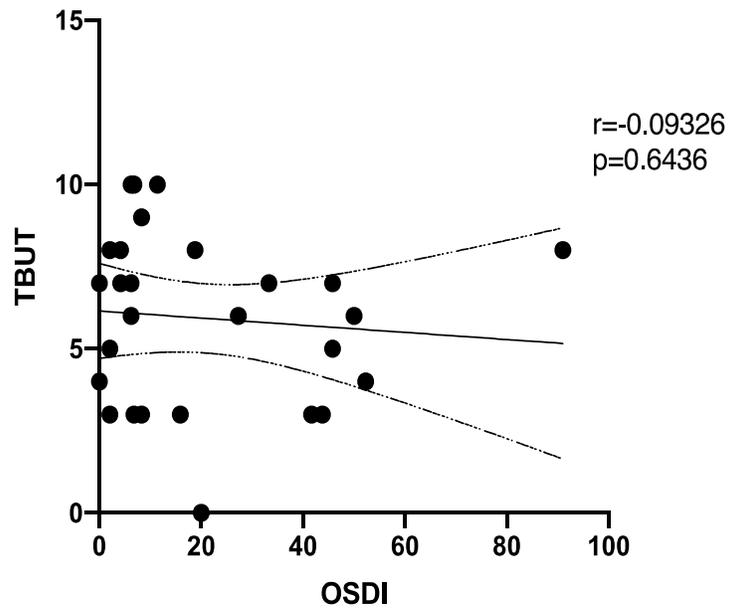


Figura 14. Correlación entre el tiempo de ruptura de la película lagrimal y el resultado OSDI.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LÁGRIMA DE LOS SUJETOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

La capacidad antioxidante total (CAT) en lágrima se midió por colorimetría conforme se describió en el apartado de métodos. La CAT promedio en el grupo de sujetos sanos fue de 0.199, en el grupo leve fue de 0.176, en el grupo moderado/severo fue de 0.144. La figura 15 muestra el CAT por cada grupo de estudio. La correlación entre la CAT y el resultado OSDI fue de 0.315. La figura 16 muestra esta correlación.

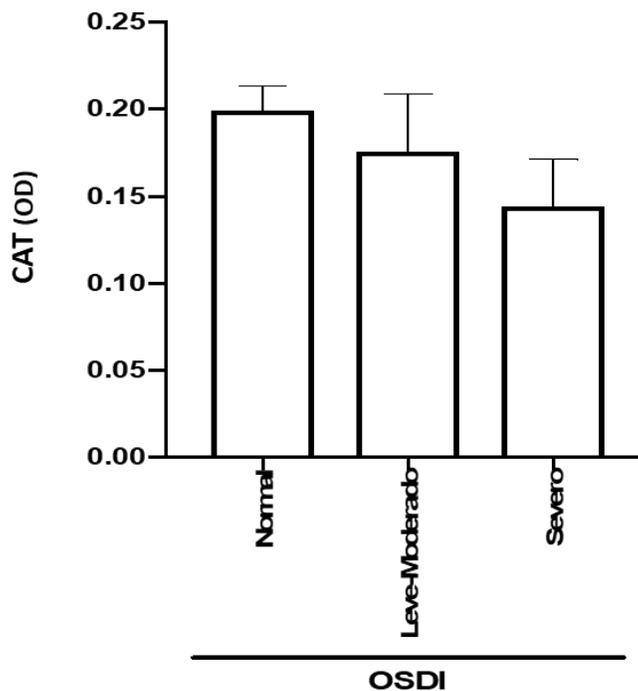


Figura 15. Capacidad antioxidante total lagrimal en cada grupo de estudio.

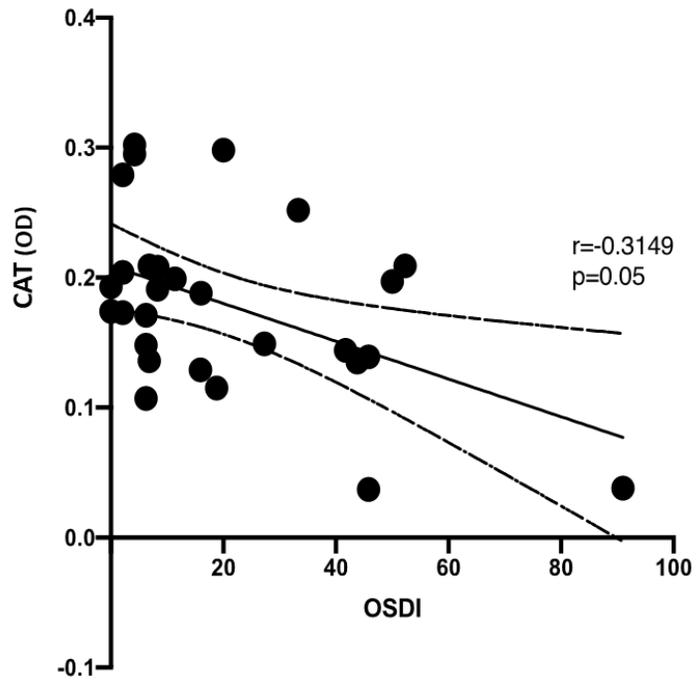


Figura 16. Correlación entre la capacidad antioxidante total lagrimal y el resultado OSDI.

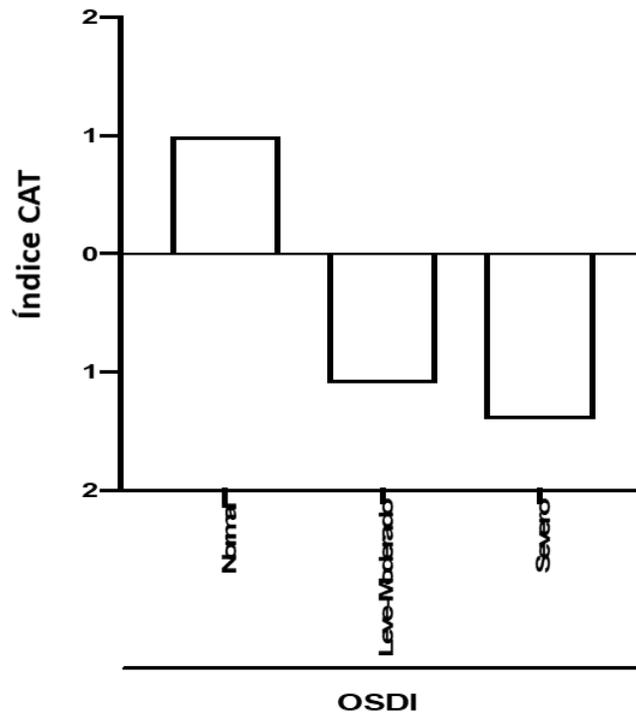


Figura 17. Índice de la capacidad antioxidante total lagrimal y el resultado OSDI.

La concentración de ácido ascórbico (AA) obtenido en el grupo de sujetos sanos fue de 104.8 $\mu\text{M} / \text{L}$, en el grupo leve fue de 395.2 $\mu\text{M} / \text{L}$ y en el grupo moderado/severo fue de 61 $\mu\text{M} / \text{L}$. La figura 18 muestra la concentración de AA por grupo de estudio. La correlación entre el AA y el OSDI fue de 0.155, esta correlación se muestra en la figura 19.

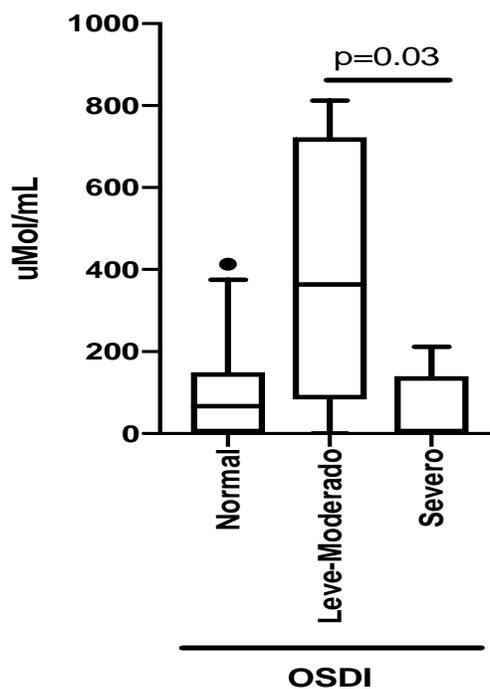


Figura 18. Concentración de ácido ascórbico en cada grupo de estudio.

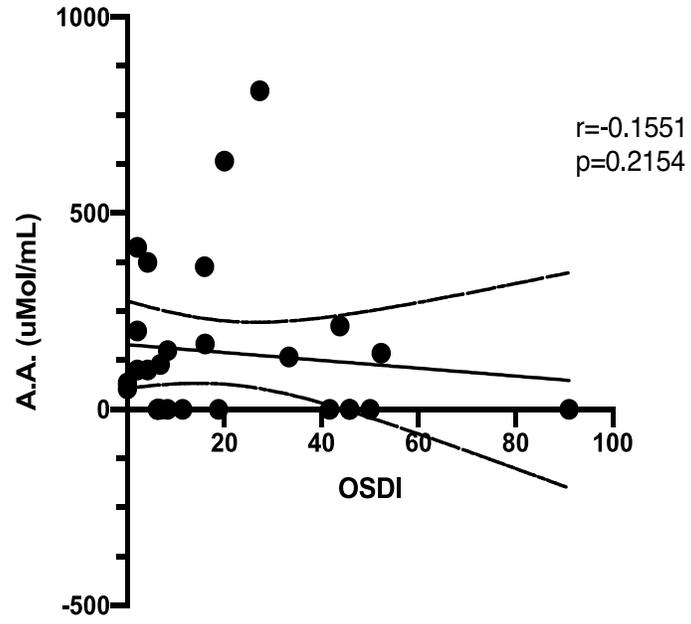


Figura 19. Correlación de la concentración del ácido ascórbico y el resultado OSDI.

DISCUSIÓN

La producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno es alta en el ojo, ya que está expuesto con el exterior, así como expuesto inherentemente a procesos de fotooxidación por la luz ultravioleta. Debido a lo anterior, es importante que el sistema ocular cuente con una serie de agentes antioxidantes para mitigar el estrés oxidativo. En este estudio se determinó en diferentes grados de severidad de ojo seco la capacidad antioxidante total (CAT) y su correlación con las pruebas clínicas diagnósticas de rutina. Como se esperaba, no se encontraron biomarcadores clínicos relacionados con Schirmer I, Schirmer II y TBUT que permitieran identificar el grado de sintomatología clínica evaluado por (Tsubota, Yokoi, Shimazaki, & Watanabe, 2017)

En este estudio se encontró que la CAT en lágrima fue mayor en el grupo de sujetos sanos en comparación con los grupos de sujetos con síntomas de ojo seco. Estos resultados sugieren que los sujetos sanos, siendo los que no presentan o presentan en menor cantidad síntomas de irritación ocular, visión borrosa, lagrimeo, prurito o fotofobia tienen una mayor capacidad antioxidante total. En nuestros resultados encontramos una relación negativa significativa entre CAT y el grado de severidad por cuestionario OSDI, siendo que a mayor CAT menor severidad, por lo que la determinación de CAT podría ser un biomarcador objetivo temprano de ojo seco lo que no se ha conseguido con los estudios de Schirmer y TBUT. (Tsubota, Yokoi, Shimazaki, & Watanabe, 2017)

En los sujetos sanos se determinó una concentración promedio de AA conforme lo reportado por Man Choy y colaboradores. Los niveles de AA no presentaron correlación con el nivel de severidad de síntomas. Esto pudiera presentarse debido a que el AA se metaboliza rápidamente y vuelve a ser incluido en el ciclo de oxidoreducción (May, Qu, Neel, & Li, 2003).

Posteriormente al evaluar la concentración de AA, se encontró que el grupo de OSDI leve presentó una mayor cantidad de AA comparado con el grupo de OSDI moderado/severo, habiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.03$). Se ha demostrado que el AA induce la reducción de inflamación y marcadores de fibrosis hepática en modelos animales (Abhilash, Harikrishnan, & Indira, 2013). Nuestros resultados sugieren que el AA aumenta de manera inicial durante el curso natural de la enfermedad del síndrome de ojo seco, es posible que sea un mecanismo de regulación de la inflamación. Se requieren más estudios en modelos animales para demostrar lo anterior.

El impacto de la determinación de radicales libres en la superficie ocular y de sus mecanismos de regulación otorgados por los antioxidantes en lágrima en los diferentes estadios del síndrome de ojo seco y de sujetos sanos nos ha permitido establecer rangos o puntos de cohorte que pudieran estar asociados a la sintomatología clínica. Conocer estos puntos de cohorte permitirá realizar intervenciones oportunas por parte de los médicos oftalmólogos para prevenir el daño a la superficie ocular, así como el evitar el uso permanente de lubricantes oculares que, sin bien mejoran la inflamación ocular y disminuyen los niveles de enzimas antioxidantes (Jee, Park, Kim, & Kim, 2014), no modifican la fisiopatología

del síndrome de ojo seco. Ahora sabemos que el mejorar los niveles de CAT en la superficie ocular tendrá un impacto en mejorar la sintomatología desde un nivel molecular al estabilizar el balance oxido-reducción. El presente estudio sugiere que los tratamientos que modifiquen la bioquímica del síndrome de ojo seco deberán enfocarse en restaurar el balance entre antioxidantes y oxidantes.

CONCLUSIONES

No se encontró relación entre la severidad de los síntomas y los niveles de ácido ascórbico, cantidad y calidad de lágrima producida.

Los sujetos con mayor severidad sintomática en el síndrome de ojo seco presentaron una menor capacidad antioxidante total (CAT) en lágrima en comparación con sujetos sanos.

PERSPECTIVAS

El ácido ascórbico no tuvo un papel primordial como parte de la capacidad antioxidante total en la lágrima de los sujetos de estudio, lo que sugiere la participación de otras moléculas antioxidantes, como el ácido úrico o la enzima superóxido dismutasa, ya que estas han sido reportadas como las más frecuentes en lágrima después del ácido ascórbico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhilash, P., Harikrishnan, R., & Indira, M. (2013). Ascorbic acid is superior to silymarin in the recovery of ethanol-induced inflammatory reactions in hepatocytes of guinea pigs. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(4), 785-798.
- Augustin, A. J., Spitznas, M., Kaviani, N., Meller, D., Koch, F. H., Grus, F., & Göbbels, M. J. (1995). Oxidative reactions in the tear fluid of patients suffering from dry eyes. *Graefe's Archives in Clinical Experimental Ophthalmology*, 233(11), 694-698.
- Bai, Y., Ngo, W., Gu, B., Zhang, Y., & Nichols, J. J. (2018). An imaging system integrating optical coherence tomography and interferometry for in vivo measurement of the thickness and dynamics of the tear film. *Biomed Eng Online*, 17(1), 164-177.
- Behndig, A., Svensson, B., Marklund, S., & Karlsson, K. (1998). Superoxide Dismutase Isoenzymes in the Human Eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(3), 471-475.
- Bolaños Jiménez, R., Navas, A., López Lizarraga, E., de Ribot, F., Peña, A., Graue Hernández, E., & Garfias, Y. (2015). Ocular Surface as Barrier of Innate Immunity. *The Open Ophthalmology Journal*, 15(9), 49-55.
- Bum-Joo, C., Dong, J., Won, K., Min, S., Eun, K., Man, K., & Ho, H. (2019). Direct Visualization of Continuous Meibum Secretion From. *Cornea*, 38, 1245-1252.
- Butovich, I. A. (2013). Tearfilm lipid. *Experimental Eye Research*, 117, 4-27.
- Cejka, C., & Cejkova, J. (2015). Oxidative Stress to the Cornea, Changes in Corneal Optical Properties, and Advances in Treatment of Corneal Oxidative Injuries. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Conrady, C. D., Joos, Z. P., & Patel, B. C. (2016). The Lacrimal Gland and Its Role in Dry Eye. *Journal of Ophthalmology*, 2016.
- de Souza, G. A., Godoy, L. M., & Mann, M. (2006). Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biology*, 7(8).
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47-95.
- Gachon, A., Richard, J., & Dastugue, B. (1982). Human tears: normal protein pattern and individual protein determinations in adults. *Current eye reaserch*, 2(5), 301-308.
- Galicia Carreon, J., Santacruz, C., Hong, E., & Jiménez Martínez, M. C. (2013). The ocular surface: from physiology to the ocular allergic diseases. *Revista alergía México*, 60(4), 172-183.

- García, N., Tesón, M., Enríquez de Salamanca, A., Mena, L., Sacristán, A., Fernández, I., . . . González García, M. (2014). Basal values, intra-day and inter-day variations in tear film osmolarity and tear fluorescein clearance. *Current Eye Research*, 39(7), 673-679.
- Huang, J.-Y., Yeh, P.-T., & Hou, Y.-C. (2016). a randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral antioxidant supplement therapy in patients with dry eye syndrome. *Clinical Ophthalmology*, 25, 313-329.
- Iskander, D., Collins, M., & Davis, B. (2005). Evaluating Tear Film Stability in the Human Eye With High-Speed Videokeratoscopy. *Transactions on biomedical engineering*, 52(11).
- Jee, D., Park, S., Kim, M., & Kim, E. (2014). Antioxidant and Inflammatory Cytokine in Tears of Patients With Dry Eye Syndrome Treated With Preservative-Free Versus Preserved Eye Drops. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55(8), 5081-5089.
- Kattappagari, K., Teja, C., Kommalapati, R., Poosarla, C., Gontu, S., & Reddy, B. (2015). Antioxidants health and diseases: A review. *Journal of Orofacial Science*, 7(2), 71-75.
- Lassen, N., Black, W., Estey, T., & Vasiliou, V. (2008). The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(2), 100-112.
- Man Choy, C. K., Benzie, I. F., & Cho, P. (2000). Ascorbic Acid Concentration and Total Antioxidant Activity of Human Tear Fluid Measured Using the FRASC Assay. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(11), 3293-3298.
- Massingale, M. L. (2009). Analysis of Inflammatory Cytokines in the Tears of Dry Eye. *Cornea*, 28(9).
- Matés, J., Pérez Gómez, C., & Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595-603.
- May, J., Qu, Z.-c., Neel, D., & Li, X. (2003). Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1640(2-3), 153-161.
- Mizoguchi, T., Arita, R., Fukuoka, S., & Morishige, N. (2017). Morphology and Function of Meibomian Glands and Other Tear Film Parameters in Junior High School Students. *Cornea*, 36, 922–926.
- Mudgil, P., Torres, M., & Millar, T. J. (2006). Adsorption of lysozyme to phospholipid and meibomianlipid monolayer films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 48(2), 128-137.
- Noori, S. (2012). An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Open Access Scientific Reports*, 1(8).
- Pisoschi, A., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Pucker, A. D., & Haworth, K. M. (2015). The Presence and Significance of Polar Meibum and Tear Lipids. *The Ocular Surface*, 13(1), 26-42.

- Serra, H., & Cafaro, T. (2007). Ácido ascórbico: desde la química hasta su crucial función protectora en ojo. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(4), 525-532.
- Tsubota, K., Yokoi, N., Shimazaki, J., & Watanabe, H. (2017). New Perspectives on Dry Eye Definition and Diagnosis: A Consensus Report by the Asia Dry Eye Society. *Ocular surface*, 15(1), 65-76.
- Tutt, R., Bradley, A., Begley, C., & Thibos, L. N. (2000). Optical and Visual Impact of Tear Break-up in Human Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(13), 4117-4123.
- Venkata, S. (2009). Tear ascorbic acid levels and the total antioxidant status in contact lens wearers: A pilot study. *Indian Journal Ophtalmology*, 57(4), 289-292.
- Vera Díaz, F., & Doble, N. (2012). The human eye and adaptive optics. *Topics in adaptive optics*.
- Wakamatsu, T., Dogru, M., Matsumoto, Y., Kojima, T., Kaido, M., Ibrahim, O., . . . Tsubota, K. (2013). Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 54(1), 201-210.
- William, W. (2010). Tear biochemistry: a review. *The South African Optometrist*, 69(2), 100-106.
- Zhou, L., & Beuerman, R. W. (2017). The power of tears: how tear proteomics research could revolutionize the clinic. *Expert review of proteomics*, 14(3), 189-191.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO (versión 2)
I. INFORMACIÓN GENERAL
- Título del estudio
“Evaluación de especies reactivas de oxígeno, antioxidantes y citocinas proinflamatorias en lágrima en el síndrome de ojo seco”
- Nombre del Investigador Principal
Alden Almanza Gutiérrez
- Instituciones participantes
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Circuito de Posgrado S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510 Ciudad de México, teléfono 01 55 5622 1888.
Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana I.A.P. Chimalpopoca 14, Obrera, Cuauhtémoc, 06800 Ciudad de México, teléfono 01 55 5442 1700.
- Características de este documento
Este documento propone su participación en un estudio de investigación. Antes de que decida participar, usted debe entender por qué se está realizando este estudio, qué va a involucrar y cuáles son los riesgos y beneficios asociados. La información que se proporciona a continuación le ayudará a tomar una decisión informada. Por favor tome su tiempo para leerla cuidadosamente y realizar todas las preguntas que surjan. Una vez que haya leído el documento y se le hayan aclarado todas sus dudas, se le pedirá que lo firme si decide participar en el estudio. De igual forma, se le entregará un original de este documento. Este documento fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.
II. INFORMACIÓN ESPECÍFICA
- Descripción del estudio
El síndrome de ojo seco es un problema de salud pública, causando mayor riesgo de infecciones oculares, síntomas de malestar ocular, fatiga, alteración visual que interfiere con actividades cotidianas como leer, manejar o trabajar en computadora en aquellos pacientes que lo presentan. Algunos estudios han revelado, a nivel del ojo y de la lágrima, la disminución de moléculas protectoras y la elevación de otras moléculas inflamatorias conllevan a las molestias en los ojos de estos pacientes. Al realizar este estudio se podrán proponer estrategias de protección específicas o detección oportuna al daño ocular en una población con síndrome de ojo seco, evitando así la molestias y complicaciones en dicha enfermedad.

Para llevar a cabo este estudio es necesario tomar una muestra de lágrima y realizar una evaluación oftalmológica integral, la cual será realizada por un médico oftalmólogo, donde se valorará la producción y calidad (tiempo de ruptura lagrimal) de su lágrima. Estos procedimientos tomarán en conjunto 2 a 3 horas aproximadamente.

Pacientes que participen en el estudio deben contar con los siguientes criterios:

Para que usted pueda participar en el estudio debe contar con los siguientes criterios

- Diagnóstico clínico de ojo seco.
- Edad mayor o igual a 18 años.
- Haber contestado el cuestionario "OSDI" y obtener una puntuación mayor a 12.
- Aceptación de ingreso al estudio y firma de este Consentimiento Informado.

Sujetos sanos que participen en el estudio deben contar con los siguientes criterios:

- Voluntarios sanos con un resultado en el cuestionario "OSDI" igual o menor a 12.
- Edad mayor o igual a 18 años.
- No padecer enfermedades crónicas como diabetes mellitus, artritis, y hepatitis C.
- Aceptación de ingreso al estudio y firma de este Consentimiento Informado.

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Si por alguna razón usted se negara a participar en él, esto no tendría ninguna repercusión en su atención médica brindada en este hospital. A sí mismo en caso de participar y de considerarlo necesario, puede retirarse del estudio en el momento que lo desee y sin repercusión en su seguimiento futuro.

Este estudio tendrá una duración de 6 meses aproximadamente. Durante este tiempo se reclutarán a los participantes, se realizarán los estudios de laboratorio pertinentes, se analizarán los resultados obtenidos y finalmente se dará a conocer las conclusiones del estudio.

El participante no tiene que pagar nada, ya que los recursos materiales y humanos son proporcionados por el investigador y las instituciones participantes.

- Riesgos presentes al participar en el estudio

En el caso de las muestras de lágrima, se le aplicará en la superficie del ojo 20 microlitros de solución estéril y con un capilar (tubo de vidrio, muy delgado y muy pequeño) se absorberá la lágrima. No existen riesgo en este procedimiento, sin embargo, pudiera presentar molestia al momento de aplicar la solución en su ojo.

Para la medición de la producción de lágrima se colocará un pequeño papel filtro, estéril, marcado a manera de regla, entre el párpado inferior y su ojo por unos minutos. Este procedimiento pudiera generar molestia al momento de tener el papel en su ojo.

Para la medición del tiempo de ruptura de la película lagrimal, primero se colocará un tinte (fluoracilo) sobre el borde de su párpado y se le pedirá que parpadee para que se distribuya a lo largo de toda la superficie de su ojo. Posteriormente se le revisará a través de una lámpara de hendidura, la cual sirve para observar con mayor detalle la tinción que se le ha colocado. Este procedimiento pudiera generar molestia al momento de colocarle la tinción en su ojo.

- Limitaciones que tendrá durante el estudio

Para este estudio se le pide una muestra de lágrima en una solo ocasión.

- Beneficios del estudio

La información generada servirá para proponer marcadores moleculares en la lágrima que reflejen de manera más precisa el estado clínico del paciente con ojo seco. A su vez, esto permitirá contar con un diagnóstico certero y tratamiento oportuno, disminuyendo las complicaciones en los ojos de pacientes con ojo seco.

- Datos personales y resultados del estudio

La información que se obtenga será estrictamente confidencial y anónima y será utilizada exclusivamente para fines de investigación. Solo personal autorizado tiene acceso a su información. Los resultados obtenidos se pretenden publicar en revistas científicas afines al tema estudiado.

Todos los resultados se le darán a conocer individualmente, si usted lo solicita.

- Instituciones involucradas en el estudio

El presente estudio es parte del proyecto de Maestría del Investigador Principal. El programa de maestría pertenece a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la institución sede para el estudio es el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana, Ciudad de México.

- Contacto para dudas y aclaraciones

Cualquier duda adicional que surja en el futuro será oportunamente aclarada. En caso de dudas favor de comunicarse con el Dr. Alden Almanza Gutiérrez (investigador principal), al teléfono: 54421700 ext. 3210, los días lunes a viernes de 09:00hrs a 14:00 horas o al número celular 0445518004328 en caso de emergencia. También puede comunicarse con el Dr. Yonathan Garfias Becerra, presidente del Comité de Ética en Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana al teléfono: 5442-1700 Ext. 3212.

III. Consentimiento para participar

- AL FIRMAR USTED DECLARA QUE:

1. He leído cuidadosamente (o me han leído mi representante legal) y he entendido el consentimiento informado.
2. Se me ha brindado información clara y tiempo suficiente para leer el consentimiento informado y aclarado todas mis dudas.
3. Mi participación es voluntaria y entiendo que soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento que lo decida.

4. No he sido sometido a ningún tipo de presión para participar en el estudio.
5. Libremente otorgo mi consentimiento para participar en este estudio.
6. Entiendo que la atención médica y los estudios clínicos que forman parte del protocolo especificados en esta forma de consentimiento informado durante el estudio serán de manera gratuita.
7. Confirmando que he recibido un original de este documento firmado y fechado y el otro original es resguardado por el médico del estudio.

PARTICIPANTE

Nombre y firma _____

Fecha _____

Huella digital del dedo índice derecho (en caso de no saber leer y escribir u otra situación que lo amerite)



TESTIGO 1

Nombre y firma _____

Fecha _____

Relación con el participante _____

Dirección _____

TESTIGO 2

Nombre y firma _____

Fecha _____

Relación con el participante _____

Dirección _____

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Nombre y firma _____

Fecha _____

Anexo 2. Cuestionario para valorar el Índice de Enfermedad de Superficie Ocular (OSDI).

EVALUACIÓN OSDI® Instrumento validado y aceptado por la FDA y el National Eye Institute de EE.UU.

Haga a su paciente las siguientes 12 preguntas y encierre el número en la columna que mejor represente cada respuesta. Posteriormente, sume la calificación obtenida en cada grupo de preguntas y llene las casillas A, B y C. Las casillas D y E deberán ser llenadas de acuerdo con las instrucciones junto a cada una de ellas.

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

	Todo el tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	A veces	Nunca	
1. ¿Ojos sensibles a la luz?	4	3	2	1	0	S/R
2. ¿Ojos que se sienten arenosos?	4	3	2	1	0	S/R
3. ¿Dolor o enrojecimiento de los ojos?	4	3	2	1	0	S/R
4. ¿Visión borrosa?	4	3	2	1	0	S/R
5. ¿Visión doble?	4	3	2	1	0	S/R

SUMA DE LA CALIFICACIÓN PARA LAS PREGUNTAS DEL 1 AL 5 **A**

B ¿Los problemas con sus ojos lo han limitado en la realización de cualquiera de las siguientes actividades durante la última semana?

	Todo el tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	A veces	Nunca	
6. ¿Leer?	4	3	2	1	0	S/R
7. ¿Manejar en la noche?	4	3	2	1	0	S/R
8. ¿Trabajar con la computadora o usar el cajero automático?	4	3	2	1	0	S/R
9. ¿Ver la televisión?	4	3	2	1	0	S/R

SUMA DE LA CALIFICACIÓN PARA LAS PREGUNTAS DEL 6 AL 9 **B**

C ¿Ha sentido molestia en sus ojos en cualquiera de las siguientes situaciones durante la última semana?

	Todo el tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	A veces	Nunca	
10. Cuando hace viento	4	3	2	1	0	S/R
11. ¿En lugares o áreas muy secas?	4	3	2	1	0	S/R
12. ¿En áreas con aire acondicionado?	4	3	2	1	0	S/R

SUMA DE LA CALIFICACIÓN PARA LAS PREGUNTAS DEL 10 AL 12 **C**

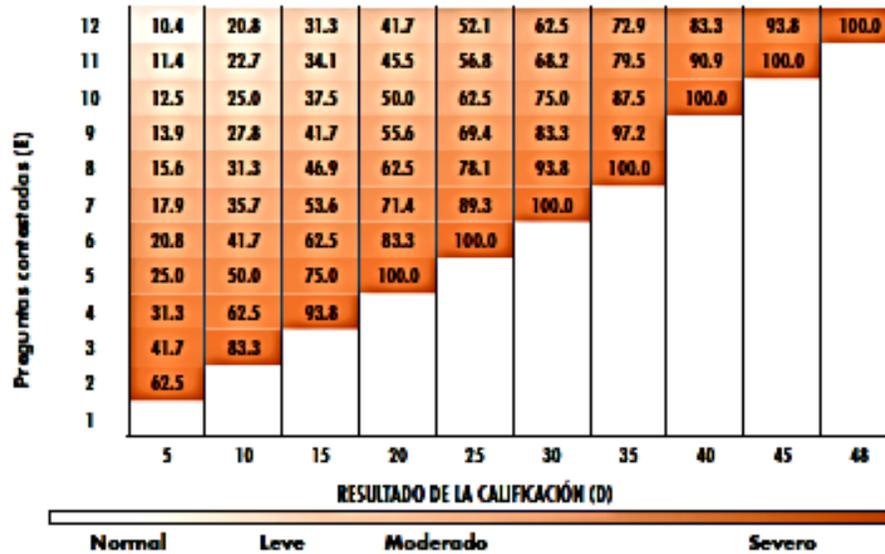
D= RESULTADO DE LA CALIFICACIÓN DE A + B + C **D**

E= CANTIDAD DE PREGUNTAS CONTESTADAS
No incluya las preguntas marcadas S/R. [Sin Respuesta] **E**

RESULTADO DE LA EVALUACIÓN OSDI®

El OSDI® es un instrumento válido y confiable para medir la severidad de la enfermedad del ojo seco y el efecto en la función relacionada con la visión. El OSDI® es evaluado en una escala de 0 a 100, siendo los resultados más elevados los que representen mayor impedimento.

En el siguiente cuadro, ubique los resultados D y E del cuestionario en el eje que corresponda. Localice el resultado de su paciente y compare la intensidad del color rojo con la guía inferior para determinar el grado de resequedad del ojo en normal, leve a moderado o severo.



*Los valores para determinar la severidad de la enfermedad del ojo seco se calcularon utilizando la fórmula OSDI®

$$\text{OSDI}^{\circ} = \frac{(\text{Resultado de la calificación}) \times 25}{(\text{No. de preguntas contestadas})}$$

Nombre del paciente: _____ Fecha: _____

¿Hace cuánto que el paciente padece ojo seco? _____

Comentarios del oftalmólogo _____

Cobque esta evaluación en el expediente del paciente para seguimiento del tratamiento en la siguiente visita.

© 2015 Allergan, Inc. © Marca Registrada de Allergan, Inc. Material para uso exclusivo del profesional de la salud.
Optiva® Marca: 2623C01315A, Optiva® Marca: 2729C01315A, Inc. Marca: NEB 01/46/2015