



Universidad de Valladolid



ESTUDIO DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA FOTOFobia DURANTE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL POST CIRUGÍA REFRACTIVA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Realizado por:

Luisa F. Giraldo Agudelo.

Tutores:

Dra. Yolanda Diebold Luque

Dr. Miguel J. Maldonado López

Valladolid, Septiembre 2013

Agradecimientos:

- A la Dra. Diebold y al Dr. Maldonado tutores de este trabajo por su tiempo y su compromiso.
- A todo el Grupo de Superficie Ocular del IOBA, especialmente a Antonio López, Mario Crespo y Laura García, por ayudarme con el manejo práctico del laboratorio.
- A Itziar Fernández por su asesoría en los aspectos estadísticos del trabajo.
- A todos los donantes, ya que gracias a su participación voluntaria se ha podido llevar a cabo este trabajo.
- A todo el personal científico y administrativo del IOBA por su colaboración.

Financiación:

La realización de este proyecto ha sido posible gracias a la siguiente financiación:

1. Proyecto "Combinación de hidrogeles biomiméticos y nanopartículas como plataformas terapéuticas avanzadas para enfermedades oculares". Ministerio de Ciencia e Innovación, CICYT MAT-2010-20452-C03-01. Investigador responsable: Dra. Yolanda Diebold Luque. Duración: desde 01/01/2011 hasta 31/12/2013.
2. Proyecto "Análisis Experimental de la Micro-Tomografía por Bioimpedancia para la detección de alteraciones de las capas de la córnea in vivo". Ministerio de Ciencia e Innovación, SAF2009-14724-C02-01. Investigador responsable: Dr. Miguel J. Maldonado López. Duración: desde 01/01/2010 hasta 31/12/2013.

Autorización:

La propuesta de TFM fue revisada y aprobada por la Comisión de Investigación del IOBA en reunión de 31 de enero de 2013. El consentimiento informado que se ha usado en este estudio se presentó al Comité Ético de Investigación Clínica de la UVA previamente a su empleo.

ÍNDICE:

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Superficie ocular y mediadores inflamatorios
- 1.2 Ácido hialurónico y sus receptores
- 1.3 Cirugía refractiva (ASA: *Advance Surface Ablation*), cicatrización y fotofobia postoperatorias

2. JUSTIFICACIÓN

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

4. MATERIALES Y METODOS

- 4.1 Diseño del estudio
- 4.2 Pacientes y controles (criterios de inclusión y exclusión)
- 4.3 Datos demográficos e historia clínica
- 4.4 Pruebas realizadas, materiales y equipos
- 4.5 Recolección de lágrima
- 4.6 Detección de sCD44 mediante ELISA
- 4.7 Encuesta para valorar fotofobia
- 4.8 Análisis estadístico

5. RESULTADOS

- 5.1 Resumen de los datos de pacientes y controles
- 5.2 Análisis de severidad de la fotofobia en las primeras 72 horas post ASA
- 5.3 Detección de la fracción soluble del receptor CD44 de ácido hialurónico en lágrima de donantes del grupo I (pacientes sometidos a ASA)
- 5.4 Detección de la fracción soluble del receptor CD44 de ácido hialurónico en lágrima de donantes del grupo II (control)

- 5.5 Análisis de detección de sCD44 (detectado vs no detectado) comparando Grupo I (pacientes) y Grupo II (controles)
- 5.6 Análisis de correlación de los niveles de sCD44 en relación con la fotofobia a las 24, 48, 72 horas postoperatorias.
- 5.7 Comparación de los niveles cuantitativos de sCD44 en los pacientes usuarios de LC vs los que no los usan
- 5.8 Comparación de los niveles cuantitativos de sCD44 según el tiempo sin usar LC
- 5.9 Comparación de los niveles de sCD44 con el uso de MMC durante la cirugía de ASA
- 5.10 Comparación de los niveles de sCD44 en ngM1 y la diferencia ngM2 menos M1 según el sexo
- 5.11 Diferencias en los niveles de sCD44 basales ngM1 y edad según el Grupo I (pacientes) y Grupo II (controles)
- 5.12 Comparación de los niveles de sCD44 basal ngM1 y la diferencia ngM2 menos M1 según el uso o no de ACO (anticonceptivos orales)
- 5.13 Comparación entre niveles de sCD44 y presencia o ausencia de alergias en grupo control y grupo de pacientes
- 5.14 Comparación entre niveles de sCD44 y la estación climatológica en la cual se recogieron las muestras (invierno – verano)
- 5.15 Comparación entre los niveles de sCD44 y el periodo de conservación de las muestras

6. DISCUSIÓN

7. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

9. ABREVIATURAS

10. ANEXOS

I. Consentimiento informado

II. Encuesta OSDI

III. Escala visual análoga para fotofobia

IV. Encuesta para valoración cuantitativa global de fotofobia a las 72 horas post
ASA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Superficie ocular y mediadores inflamatorios

Actualmente se define la superficie ocular como “Unidad Funcional Lagrimal” (UFL) constituida por la película lagrimal, la córnea, el limbo y la conjuntiva como sus principales componentes. Sumados a estos se encuentran las glándulas lagrimales principales y accesorias (Figura 1). Todo el sistema se integra gracias a la acción reguladora de los sistemas: neuroendocrino e inmune con el objetivo de mantener el equilibrio entre la producción de lágrima, la calidad de la misma y conservar la estructura y función de todos los componentes, principalmente de la córnea (Stern et al, 1998)

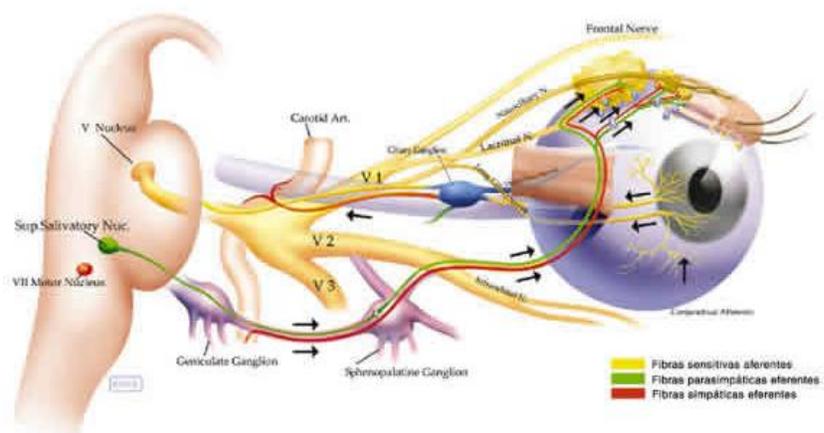


Figura 1. Unidad funcional lagrimal integrada

Los procesos inflamatorios de diferente etiología (alérgica, infecciosa, traumática, postquirúrgica, entre otros) rompen la homeostasis de la UFL, alterando la barrera corneal con la consecuente disfunción visual (Stern et al, 2004). La mayoría de estos procesos inflamatorios pueden resolverse de manera aguda; sin embargo, algunos casos pueden tomar un curso crónico y acarrear consecuencias devastadoras para la salud visual del paciente, por ejemplo, los cuadros de ojo seco severo (Schaumberg et al, 2003).

En la patología de superficie ocular existe entonces un desequilibrio entre los mediadores (citoquinas, quimoquinas y sus receptores, entre otros) pro y anti- inflamatorios. Se han demostrado, niveles elevados o sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias, como las interleuquinas (IL): IL-6, IL-1 α , IL-1 β o el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (McDermott et al, 2005). En particular la IL-6 ha sido detectada en lágrima en diferentes procesos inflamatorios como el ojo seco grave (Stern et al, 2010).

Dentro del contexto de inflamación de la UFL, la malla trabecular y la retina cada vez adquiere mayor interés el papel del ácido hialurónico (AH) y sus receptores (Johnson et al, 2009; Menezes et al, 2009; Choi et al, 2004).

1.2 Ácido hialurónico y sus receptores

Es un mucopolisacárido ácido único, el cual ha demostrado actividad a nivel de la UFL en los procesos de regeneración del epitelio corneal (Gomes et al, 2004). Fue descubierto inicialmente en humor vítreo (Meyer et al, 1934). A diferencia de los demás glicosaminoglicanos, no tiene uniones covalentes con proteínas del grupo "core" ni con grupos sulfato. Se ha demostrado su producción a nivel del estroma corneal en cultivos celulares, células endoteliales de córnea durante el periodo embrionario temprano y en el estroma anterior de corneas adultas que han sufrido algún tipo de daño (Conrad et al, 2010). Es sintetizado en la membrana plasmática y tiene la misma composición en cualquiera de los tejidos donde se ha aislado. Puede unirse de manera no covalente a múltiples variantes de proteoglicanos, al TSG-6 (*Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 Protein*), a la fibronectina, a los receptores CD44 (glicoproteína de superficie celular); y RHAMM (*Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility*) (Sohr et al, 2008), y la molécula de adhesión intracelular - 1 (ICAM-1), entre otros. Existe evidencia de la presencia de AH tanto a nivel intra como extracelular, como el resto de los glicosaminoglicanos, tiene influencia en múltiples funciones biológicas, incluyendo, división celular, diferenciación,

transducción de señales, adhesión, migración, extensión y regeneración de nervios periféricos y respuesta a factores de crecimiento de manera variable según la composición de la matriz extracelular a la cual se asocia (Conradl et al, 2010).

Los receptores para el AH constituyen una amplia familia de receptores tanto transmembrana como solubles, denominados hialadherinas (Toole et al, 1990; Turley et al, 1999). En general las hialadherinas se pueden clasificar en dos grandes grupos: un grupo incluye las ligadas a la membrana celular, entre otros: CD44, receptor del ligando C1q, RHAMM, versican, agrecan, proteína cerebral ligante de AH, brevican y TSG-6 (Tammi et al, 2002), LYVE-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*), IMP-150 (proteína integral de membrana) y un segundo grupo incluye las segregadas a la matriz extracelular: la fracción soluble de CD44 (sCD44) , sCD44 recombinado e isoformas de RHAMM, entre otras.

Las hialadherinas poseen diferencias significativas según el tejido en el cual se expresen y su localización celular, especificidad, afinidad y regulación (Day et al, 2002). El LYVE-1 es exclusivo del endotelio de los vasos linfáticos y parece estar asociado a la degradación del AH. El TSG-6 es secretado en respuesta a un estímulo inflamatorio (por ejemplo, se ha detectado en articulaciones de pacientes con artritis). La proteasa ligando de AH a nivel plasmático se ha visto involucrada en la cicatrización de heridas en las cuales, a su vez, los niveles de AH son mayores (Vostrov et al, 2000). Las IMP-150 y SPARCAN (proteoglicano - condroitin sulfato) han sido aisladas en retina humana expresadas por los fotorreceptores y en la matriz extracelular (Kuehn et al, 1999). El RHAMM, también llamado CD168 o HMMR (Hyaluronan Mediated Motility Receptor), participa en la motilidad celular. Se encuentra tanto en la membrana celular como en el citoplasma y el núcleo en isoformas solubles. Se puede expresar en la superficie de leucocitos activados y de fibroblastos vecinos a estos durante la inflamación. También, se ha detectado en tejido mamario, en el cual, se asocia con riesgo elevado de tumores por su conexión con la proteína p53 supresora de tumores (Turley, 1982; Hardwick et al, 1992; Sohr et al 2008).

En una subpoblación de hialadherinas, entre ellas sCD44, se ha documentado actividad antitumoral mediada por citotoxicidad. Esta actividad era más destacada para el sCD44 que para otra hialaderinas y era inhibida por el AH, de manera que las células con alta concentración pericelular de AH eran resistentes a estas moléculas. (Yu et al, 1997; Rubinstein et al, 2004; Liu et al, 2001; Liu et al, 2004).

El principal receptor para el AH es el CD44 o Antígeno Hermes (Aruffo et al, 1990). Es una glicoproteína transmembrana monopaso que puede expresarse de manera activa o inactiva. Posee también afinidad por metaloproteinasas y colágeno entre otros ligandos. Se expresa en células de origen neuroectodérmico y mesenquimal (linfocitos, fibroblastos, células epiteliales, queratinocitos, células endoteliales). Posee diversas funciones incluyendo adhesión, organización y recambio de la matriz extracelular y participa en la migración de linfocitos durante la inflamación y en la metástasis de tumores malignos (Naor et al, 1997). A su vez, puede existir en numerosas isoformas y sus propiedades están definidas por cada una de estas isoformas y el tipo de célula en el cual se expresa (Day et al, 2002). A nivel ocular se considera un potencial marcador celular para el glaucoma primario de ángulo abierto, en el cual hay disminución de los niveles de ácido hialurónico en la malla trabecular (Choi et al, 2004). Entre sus múltiples localizaciones se encuentra la superficie ocular.

En corneas normales o sanas el CD44 se expresa predominantemente en la membrana basal de células epiteliales y queratinocitos, al igual que sobre las células del endotelio vascular del limbo esclerocorneal, pero no se expresa en las células endoteliales de la cornea. Se ha observado un aumento en la expresión de CD44 en el epitelio de córneas con inflamación consecuencia de traumatismos o el rechazo de aloinjertos. Además, las células endoteliales remanentes se tornan positivas para la detección de CD44 en la descompensación primaria o secundaria del endotelio corneal Sin embargo, en algunas córneas con queratitis, queratocono y distrofias endoteliales en las que aun hay una

relativa integridad de la morfología y el número de células, la detección de CD44 persiste negativa (Zhu et al, 1997).

La presencia tanto del CD44 como de otro receptor importante de AH, el RHAMM, ha sido descrita a nivel de la UFL en la córnea y el limbo (Hughes et al, 2006; Ahmad et al, 2008; Hornof et al, 2008). El Grupo de Superficie Ocular del IOBA ha detectado presencia de RHAMM y CD44 en conjuntiva y córnea humana sanas, y en modelos de cultivos celulares (García et al, 2012).

La isoforma sCD44 constituye el dominio extracelular del CD44, en el cual se encuentra el modulo de unión a ácido hialurónico (Isacke et al, 2002). Es liberado por proteólisis desde la membrana celular como forma soluble. Particularmente, en su forma hipofosforilada, se ha descrito como un potente citotóxico específico sobre la malla trabecular y las células ganglionares de la retina (Nolan et al, 2013). Se han detectado concentraciones elevadas de sCD44 en humor acuoso en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto. Estas elevadas concentraciones causan citotoxicidad sobre las células de la malla trabecular mediante inhibición del crecimiento celular y puede revertirse mediante la administración de anticuerpos anti sCD44 o de ácido hialurónico (Choi et al, 2004).

El sCD44 también ha sido detectado en lágrima humana. Además, se ha detectado de manera variable la presencia de CD44 y sCD44 en condiciones de inflamación in vitro (García et al, 2012).

1.3 Cirugía refractiva ASA (*Advance Surface Ablation*), cicatrización y fotofobia postoperatorios.

La queratectomía fotorefractiva (PRK) fue introducida hace mas de 25 años como técnica de cirugía refractiva corneal mediante láser excimer. El advenimiento de la queratomileusis asistida por láser in situ (LASIK) generó un descenso en la popularidad de

la PRK. Sin embargo, se reconoce científicamente que las técnicas de ablación de superficie corneal tienen muchas ventajas potenciales, incluida la preservación de la biomecánica y la ausencia de las complicaciones asociadas al "flap" (epitelio y estroma). Existe actualmente un resurgir de las técnicas de ablación superficial; sin embargo, las principales limitaciones de la PRK persisten y abarcan: dolor postoperatorio, fotofobia, retraso en la cicatrización epitelial y el "haze" estromal postoperatorio. Sobre las técnicas de ablación superficial se han desarrollado múltiples modificaciones, relacionadas principalmente con la técnica de resección del epitelio, que puede ser por desbridamiento mecánico o mediante el uso de alcohol. Otras alternativas son: la PRK transepitelial, en la cual la ablación del epitelio se hace mediante láser fototerapéutico (PTK) seguida de ablación del estroma con láser excimer, y el Epi-LASIK, en el que se utiliza un epiqueratomo para retirar el epitelio. Estudios previos sobre ablación superficial asistida con alcohol han demostrado, mediante escala visual análoga de cero a diez para la valoración de la fotofobia (0, menor intensidad; 10, mayor intensidad) puntuaciones más elevadas en el día 1 postoperatorio en comparación con el día tres postoperatorio, un cierre epitelial asociado al tercer día del postoperatorio del 57 %, y la necesidad de permanecer con lente de contacto terapéutica al tercer día del 43 %; sin embargo, no encontraron evidencia significativa respecto al efecto de la mitomicina C (MMC) sobre la cicatrización y el dolor o la fotofobia postoperatorios (Loannis et al, 2012).

Las técnicas de ablación superficial se han asociado con el uso profiláctico de la MMC al 0,02 % durante 30 segundos, como medida para reducir la aparición de haze estromal postoperatorio (Carones et al, 2002). Se ha demostrado la eficiencia de la MMC para prevenir la formación o la recurrencia de haze principalmente en ojos con alta miopía, cirugía refractiva previa o cicatrices corneales (Shalaby et al, 2009).

La evidencia señala, que gracias a las técnicas conocidas como ASA (Ablación Superficial Avanzada - *Advance Surface Ablation*) la cirugía con láser excimer también se puede realizar en algunos pacientes con córneas delgadas o debilitadas por determinadas

distrofias (distrofia de la membrana basal epitelial, o cicatrices corneales), así como en pacientes con riesgo de sufrir traumatismos oculares, incluso aquellos con queratotomía radial previa. Estas técnicas ofrecen ventajas como son el aumento en los pacientes potencialmente candidatos a cirugía refractiva corneal, la reducción de haze, la mejora en la calidad de visión y la menor inducción de aberraciones de alto orden. Sin embargo, el dolor y la fotofobia en el postoperatorio temprano siguen siendo dos quejas pendientes de resolver (Trattler et al, 2008).

La fotofobia entendida ampliamente como un estado sensorial en el que la luz causa "molestia" en el ojo, también puede causar una reacción de rechazo sin dolor. Ciertas enfermedades del segmento anterior como la iritis, la ciclitis y la blefaritis son causas conocidas de fotofobia. Lebensohn encontró que mientras más superficial es la lesión corneal, más severa es la fotofobia. Este trastorno se debe, presumiblemente, a la irritación directa de las ramas aferentes del nervio trigémino que inervan la córnea (Lebensohn et al., 1934; Karmel et al., 2011).

Las ramas aferentes de la porción oftálmica (V1) del ganglio trigémino transmiten la información dolorosa del ojo. La conjuntiva, la córnea, la esclera y la úvea están inervadas densamente con fibras del trigémino, altamente sensibles al dolor. Cualquier estímulo doloroso a estas áreas invariablemente provoca fotofobia (Kathleen et al, 2012).

En el campo de la cirugía refractiva, los antiinflamatorios tipo AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) han demostrado disminuir el dolor postoperatorio y la fotofobia (Kim et al, 2010; Solomon et al, 2004, Hassan et al, 2012).

Además de la inervación mediada por el nervio trigémino asociada a la fotofobia, en el postoperatorio de cirugía refractiva está involucrado el proceso de cicatrización corneal. Se ha descrito que el cierre completo del epitelio corneal, se alcanza en una semana (Loannis et al, 2012). Al tercer día postquirúrgico de ASA asistida con alcohol,

aproximadamente 43% de los pacientes no ha alcanzado el cierre epitelial completo y requieren lente de contacto terapéutica (Aslanides et al 2012) (Figura 2)

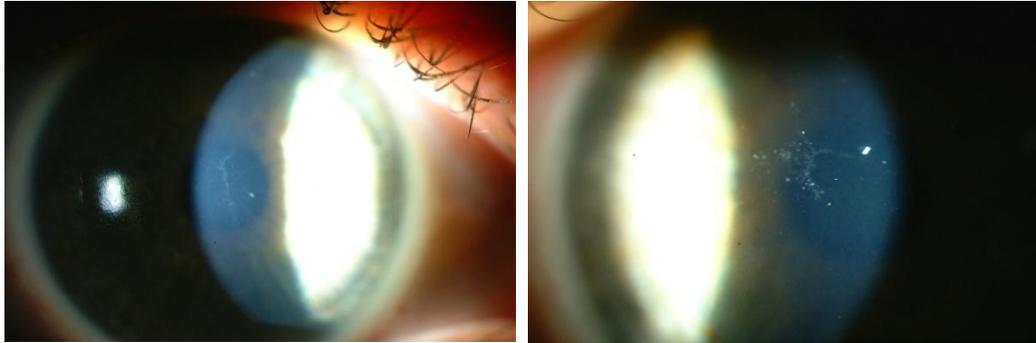


Figura 2. Estado de la córnea (frentes de cicatrización epitelial unidos) 72 horas tras ASA.

Después del traumatismo corneal, la cicatrización es el resultado de una compleja cascada que inicia inmediatamente después del daño epitelial en la cual participan múltiples moléculas entre ellos factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y proteasas, incluyendo IL-1, TNF α , proteínas de hueso morfogénico 2 y 4 (BMP2, BMP4), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) (Paulette et al, 2012). Ocurren interacciones celulares complejas en las células de la córnea, dando lugar a una respuesta biológica altamente variable. Entre los procesos mejor caracterizados están la apoptosis y la necrosis de los queratocitos, la proliferación y la migración de células inflamatorias y la generación de miofibroblastos. Estas interacciones celulares están involucradas en la reorganización de la matriz extracelular, la remodelación estromal, y la contracción de la herida (Netto et al, 2005).

En la actualidad, existen indicios pero no está claro si existe alguna relación entre la cicatrización corneal y la fotofobia.

2. JUSTIFICACIÓN

Los defectos refractivos en conjunto, constituyen uno de los motivos de consulta en oftalmología de mayor auge en las últimas décadas. Con la dinámica social actual y el nivel de exigencia cada vez más alto de los pacientes respecto a su calidad de visión, la cirugía refractiva es el objeto de múltiples innovaciones que pretenden mejorar las diferentes técnicas para optimizar los resultados funcionales y estéticos. Además, buscan la identificación y el manejo de los efectos adversos y las complicaciones asociadas.

En estudios preliminares que se han realizado por el Grupo de Cirugía Refractiva y Calidad de Visión del IOBA, cuando se ha indagado qué fenómeno acusaba más a los pacientes en el post operatorio de cirugía refractiva del tipo ablación de superficie corneal, la fotofobia fue puntuada por encima del puro dolor. De manera que uno de nuestros objetivos es demostrar de manera cualitativa y cuantitativa la percepción de fotofobia y su curva de severidad relacionada con las primeras 72 horas post operatorias en las que el estado inflamatorio de los tejidos es, en teoría, mayor por el traumatismo quirúrgico.

El Grupo de Superficie Ocular del IOBA tiene tradición en estudios relacionados con la inflamación y sus miembros han podido detectar biomarcadores de este proceso en células de conjuntiva, de epitelio corneal y en lágrima (Stern et al, 2004; McDermott et al, 2005; Enriquez de Salamanca et al, 2008). Como potenciales biomarcadores se podrían considerar los receptores de AH y sus variaciones en los tejidos de la superficie ocular, como ya se ha mencionado (Garcia et al, 2012; Hughes et al, 2006; Ahmad et al, 2008; Hornoff et al, 2008).

Como se presume que la fotofobia puede estar desencadenada por medio de mecanismos inflamatorios, a nivel de la superficie ocular, el descubrir si existe relación entre fotofobia y dichas moléculas abre las puertas hacia el establecimiento de una nueva diana terapéutica o podría considerarse un potencial predictor de fotofobia en caso de existir un grado de variabilidad notable entre los pacientes con esta molestia tras la cirugía refractiva de ablación superficial.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Existe relación entre la severidad de la fotofobia en las primeras 72 horas postoperatorias de cirugía refractiva tipo ASA y los niveles en lágrima de sCD44 como marcador de laboratorio relacionado con la inflamación.

Objetivo general

Determinar si existe un pico máximo de severidad de la fotofobia entre las 48 y 72 horas posteriores a ASA, asociado a elevación en los niveles de sCD44 como biomarcador de inflamación.

Objetivos específicos

1. Definir la severidad de la fotofobia de manera cuantitativa en las primeras 72 horas del postoperatorio de ASA.
2. Determinar la presencia de sCD44, sus niveles y su variabilidad en la lágrima de sujetos sanos (controles).
3. Detectar posibles cambios en los niveles de sCD44 en la lágrima de pacientes sometidos a cirugía refractiva, comparando las concentraciones en el preoperatorio inmediato y con las concentraciones 72 horas postoperatorias durante el proceso de inflamación y cicatrización del epitelio corneal.

4. Determinar si existe asociación entre el posible cambio en los niveles pre y postquirúrgicos de sCD44 con el grado de fotofobia a las 72 horas postoperatorias.

5. Determinar si existe correlación directa o inversa entre los niveles basales de sCD44 y la fotofobia postoperatoria y así definir un potencial biomarcador predictor de este síntoma en los pacientes sometidos a ASA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

El estudio fue diseñado como un estudio observacional descriptivo, realizado durante ocho meses (enero 2013 – agosto 2013), en el que se comparó un grupo de casos (pacientes sometidos a cirugía refractiva) y un grupo de controles (voluntarios no sometidos a cirugía). Todos los individuos del grupo de casos recibieron tratamiento bilateral, en el mismo acto quirúrgico con ASA (Ablación corneal superficial avanzada) realizado por el mismo oftalmólogo experto en cirugía refractiva y calidad de visión (Dr. MJML), con los mismos equipos y la misma preparación pero en diferentes sesiones, una mensual (cinco en total). Las pruebas clínicas, la recolección de muestras, la administración de encuestas y la revisión de historias clínicas tanto del grupo control como del grupo de pacientes fueron realizados por Dr. MJML y el autor de este trabajo de fin de máster LFGA (médico interno residente de segundo año de oftalmología) en las instalaciones del IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada).

4.2 Pacientes y controles

Los pacientes y controles para este estudio fueron reclutados en el IOBA, desde enero hasta julio del 2013. Antes de comenzar el estudio, el proyecto obtuvo la aprobación por parte de la Comisión de Investigación del IOBA y el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valladolid. Previo a la inclusión de los pacientes y donantes control en el estudio, cada uno firmó un consentimiento informado. Todos los protocolos y la experimentación se realizaron respetando las directrices de la Declaración de Helsinki.

El estudio se diseñó con dos brazos con el objetivo de incluir tanto varones como mujeres para constituir dos grupos:

Grupo I: pacientes sometidos a ASA

Grupo II: controles

con los criterios de inclusión y exclusión que se exponen en el siguiente epígrafe.

4.2.1 Criterios de inclusión y exclusión

Grupo I (pacientes sometidos a ASA)

Criterios de inclusión:

- Mayor de 18 años y menor de 45 años
- Pacientes que entienden y firman el consentimiento informado
- Agudeza visual lejana corregida mediante test de Snellen de 0,7 o mayor
- Defecto refractivo (miopía, miopía con astigmatismo, astigmatismo mixto) sin cirugías previas
- Refracción estable durante los 12 meses previos a la cirugía
- Pacientes que donan el volumen de lágrima suficiente para el protocolo (8 µl con ambos ojos en 2 sesiones, en total 16 µl)

Criterios de exclusión:

- Pacientes que niegan su consentimiento para el estudio
- Pacientes en los cuales no es posible recolectar el volumen de lágrima suficiente

- Uso de lentes de contacto durante los últimos siete días preoperatorios
- Instilación de cualquier colirio tópico durante la última hora antes de la recolección de la lágrima
- Ojos con patología previa del epitelio corneal
- Queratocono
- Glaucoma
- Patología de segmento posterior
- Proceso inflamatorio activo
- Uso de antiinflamatorios sistémicos o tópicos

Grupo II (controles)

Criterios de inclusión:

- Mayor de 18 años y menor de 45 años
- Voluntarios que entienden y firman el consentimiento informado
- Individuos sin patología ocular inflamatoria conocida
- Ausencia de enfermedades sistémicas de base inflamatoria
- Ausencia de tratamientos sistémico como antiinflamatorios

Criterios de exclusión:

- Antecedente de cirugía refractiva
- Síndrome de ojo seco
- Ojos con patología previa del epitelio corneal
- Queratocono
- Glaucoma
- Patología de segmento posterior
- Usuario de lentes de contacto

- Usuario de colirios oftalmológicos de cualquier tipo
- Hallazgos patológicos en la biomicroscopía de polo anterior.
- Test de Schirmer con anestesia menor de 5 milímetros.
- OSDI®(*Ocular Surface Disease Index*®) Instrumento validado para medir la severidad de la clínica de ojo seco: mayor de 10 puntos.

4.3 Datos demográficos e historia clínica

Del grupo de pacientes candidatos a ASA, se recopilaron los siguientes datos de la historia clínica y mediante encuesta:

- Sexo y edad
- Antecedentes de alergia o atopia
- Cirugías oftalmológicas previas
- Uso de lentes de contacto: tipo, intolerancia o antecedente de conjuntivitis papilar gigante y cuándo fue la última vez que utilizó las lentes de contacto antes de la cirugía
- Uso de medicamentos sistémicos (psicótropos, antihistamínicos, anticolinérgicos, diuréticos, derivados del retinol, anticonceptivos orales)
- Uso de medicamentos tópicos

Se recolectaron los mismos datos en los controles mediante encuesta dirigida, exceptuando el apartado relacionado con el uso de lentes de contacto.

4.4 Pruebas realizadas, materiales y equipos

La evaluación preoperatoria de los pacientes incluyó:

- Agudeza visual corregida mediante optotipos de Snellen
- Paquimetría
- Topografía corneal
- Refracción
- Medida de la presión intraocular
- Test de Schirmer con anestésico tópico
- Exploración en lámpara de hendidura (biomicroscopía de segmento anterior y fondo de ojo)

En la sala prequirúrgica se premedicó a todos los pacientes con alprazolam vía oral (Trankimazin® 0,50 mg comprimidos, Pfizer *Manufacturing Belgium NV/SA*), se les realizó la encuesta OSDI© y se recolectó la primera muestra de lagrime basal (M1) previo a la administración de colirio anestésico oxibuprocaina hidrocloreuro mas tetracaína hidrocloreuro (Colircusi Anestésico Doble ALCON®) y a la desinfección con solución yodada al 0,5 % del campo quirúrgico.

En la cirugía se delimitó el epitelio central (9 mm) con alcohol al 18 % durante 30 segundos, se retiró por completo el epitelio y se moldeó el estroma con láser excimer (*Allegretto® Wave Eye-Q platform*, laboratorios Alcon Inc.), no se reposiciona el epitelio por lo cual se adapta una lentilla terapéutica (*Acuvue Oasys hidraclear plus Senofilcon A® Johnson & Johnson*), registró información acerca del uso tópico de mitomicina C 0,02 % a nivel del estroma corneal y las incidencias reseñables.

En el postoperatorio el paciente sale de cirugía con un formato escrito de pautas postoperatorias que incluyen: alprazolam (Trankimacin®) 0,50 mg durante 2 noches, Vitamina C efervescente (Redoxón®) 1 mg por día, Vitaminas B12,B6,B1 (Hidroxil®) 1 comprimido día 30 días, ofloxacino en colirio al 0,3 % (Exocin®, Allergan) 1 gota 4 veces al

día 2 semanas, dexametasona coliro monodosis 0,1 % (Dexafree®, THEA) 1 gota 3 veces al día 2 semanas, Hialuronato sódico en gel 0,18 % (Vismed Gel®, TRB Chemedica Ltd. Reino Unido) 1 gota 4 veces al día 2 semanas.

A las 72 horas, en la consulta de revisión, se recolectó lágrima basal (sin anestésico y sin colirios en la última hora) con microcapilares de vidrio con capacidad para 4 µl (Microcaps Drummond®, Lambdas), y de cada donante se recogieron en total 16 µl de lágrima. Se dividió la recolección en dos tiempos así: para los pacientes la muestra número 1 (M1) se recolectó en la sala preoperatoria 15 minutos antes de la cirugía de ASA, la muestra número 2 (M2) se recolectó a las 72 horas en la consulta de revisión. Para los controles se recolectó M1 en un momento cero (aleatorio) y M2 a las 72 horas; ambas muestras se recolectaron en las consultas del IOBA.

Test de Schirmer:

Demuestra disminución en la producción acuosa de la lágrima. Para nuestro estudio se realizó tanto a los pacientes como a los controles test de Schirmer tipo II con anestésico tópico (Anestésico Doble Colircusi Alcon®) mediante tiras milimetradas estándar para test de Schirmer de Alcon. Se considera patológico si la tira métrica ubicada en el fondo de saco se humedece menos de 5 milímetros después de 5 minutos con los ojos cerrados.

Biomicroscopía de polo anterior:

Se realizó en todos los voluntarios del Grupo I (pacientes de ASA) por el cirujano y en todos los voluntarios del Grupo II (controles) por LFGA.

Se evaluó la presencia de:

- Alteraciones anatómicas de la glándula lagrimal principal
- Alteraciones anatómicas de los párpados y pestañas, presencia de blefaritis anterior o posterior
- Integridad de la córnea y la conjuntiva
- Presencia de reacción inflamatoria en cámara anterior

Cuestionario OSDI© (Ocular Surface Disease Index©):

Instrumento validado para medir la severidad de la enfermedad del ojo seco (normal, leve a moderada y severa) y su efecto sobre la función visual. Se representa en una escala del 0 al 100 y las puntuaciones más altas representan mayor discapacidad visual. Este índice ha demostrado sensibilidad y especificidad para diferenciar entre sujetos sanos y pacientes con ojo seco.

4.5 Recolección de lágrima por capilaridad y conservación de las muestras

La recolección de las muestras de lágrima fue realizada por LFGA a los donantes de ambos grupos. En el Grupo I (pacientes) la primera muestra se recolectó en la sala de quirófano, previo a la cirugía de ASA y la segunda muestra se recolectó en la consulta de revisión a las 72 horas postquirúrgicas. La recolección del Grupo II (controles) se realizó en el transcurso de los 7 meses de estudio en un momento "cero" y a las 72 horas de la recolección inicial.

Tanto las muestras del Grupo I como las del Grupo II fueron recolectadas, conservadas y procesadas en las instalaciones del IOBA de manera estandarizada.

Técnica de recolección de lágrima por capilaridad:

Se describe a continuación la técnica de recolección de lágrima por capilaridad utilizada en todos los participantes del estudio (Figura 3)



Figura 3. Recolección de lágrima por capilaridad

- Previo a la recolección de lágrima se evitó el uso de anestésico, sueros o colirios tópicos con el fin de preservar la estructura, composición y concentración de los solutos en la lágrima.
- Se inclinaba la cabeza del donante 45 grados hacia el lado del ojo a estudiar para facilitar el drenaje de la lágrima hacia el canto externo, donde estaba situado el capilar en contacto continuo con el menisco lagrimal. Se evitó la tracción del párpado inferior y el contacto del capilar con la conjuntiva para no forzar la producción de lágrima refleja. Se recogieron 4 μ l de lágrima en cada ojo.
- Se depositó la lágrima de ambos ojos en total 8 μ l en un microtubo para su conservación. de 0,5 ml (no heparinizados, no estériles) en una dilución de 8:20, ya que a cada microtubo se adicionaron 12 μ l de *Assay Buffer* (Millipore Corporation, EE.UU) para mantener estables las condiciones de pH (7,3 – 7,7) y los componentes moleculares de la lágrima y para obtener un volumen final de 20 μ l, necesario para la correcta conservación y lectura

de la muestra en el espectrofotómetro. Cada microtubo fue correctamente rotulado con un código de identificación para cada donante.

Conservación de las muestras:

Se congelaron las muestras de lágrima, inmediatamente después de su recolección, a una temperatura de -80°C para su conservación hasta el momento del análisis. La mitad de las muestras (aquellas recogidas entre los meses de enero y abril), incluidos controles y pacientes, se conservó durante 5 meses; la otra mitad de las muestras (aquellas recogidas entre los meses de mayo y julio) se conservó durante 2 meses, hasta realizar las pruebas de laboratorio.

4.6 Detección de sCD44 mediante ELISA

Para medir la cantidad de sCD44 presente en la lágrima de todos los participantes en el estudio, se realizó una prueba de ELISA (*enzyme – linked immunoabsorbent assay*). Se utilizó un kit de ELISA específico: “*Human sCD44std Instant ELISA*” (eBioscience® Bender MedSystems GmbH, Austria) (Figura 4).



Figura 4. Elementos para realizar el ELISA específico para sCD44 humano

Se aplicó el protocolo recomendado por el fabricante, que incluye los siguientes pasos:

1. Dilución de la muestra: 8 μ l de lágrima basal en 12 μ l de buffer.
2. Añadir agua destilada a todos los pocillos (estándar y muestras):
Muestras: 130 μ l
Estándar: 180 μ l
3. Cubrir los pocillos durante 3 horas a temperatura ambiente (18-25 grados centígrados). Durante este periodo, agitar a 100 R.P.M.
4. Eliminar el líquido y lavar 3 veces cada pocillo con 400 μ l de buffer de lavado específico diluido en agua destilada. Después del último lavado utilizar papel absorbente para remover el exceso de solución de líquido. No dejar secar completamente los pocillos.
5. Añadir 100 μ l del reactivo en cada pocillo, incluidos los vacíos.
6. Incubar los pocillos a temperatura ambiente durante 10 minutos. Evitar la exposición directa a la luz intensa. Es recomendable interrumpir la reacción cuando el estándar mayor desarrolla un color azul oscuro.
7. Interrumpir la reacción adicionando rápidamente 100 μ l de la solución de freno en cada pocillo.
8. Leer inmediatamente en un Espectrofotómetro (*SpectraMax M5, Molecular Devices, Soft Max[®]Pro 4.8*) y los resultados se obtuvieron en ng/ml.

Las pruebas de laboratorio se realizaron en 2 sesiones. Se realizó un primer experimento con muestras recogidas en los 5 meses previos y un segundo experimento con muestras recogidas en los 2 meses siguientes.

4.7 Encuesta cuantitativa para valorar fotofobia

Para este estudio, se diseñó una escala para valoración de fotofobia (EVF) a partir de una encuesta. Dicha encuesta estaba compuesta por 15 ítems, que calificaron la intensidad de fotofobia durante las primeras 72 horas del postoperatorio de ASA.

Cada ítem se puntuó de 1 a 5 según la frecuencia con la cual lo refería el paciente:

- 1: nunca
- 2: a veces
- 3: mitad del tiempo
- 4: casi siempre
- 5: siempre

El intervalo va de 0 a 60, siendo 0 la ausencia de fotofobia y 60 la máxima molestia experimentada por el paciente. A su vez, las puntuaciones fueron agrupadas en 3 grupos aleatoriamente:

- 1-20: fotofobia leve
- 21-40: fotofobia moderada
- 41-60: fotofobia severa

Se correlacionó esta información con una escala visual análoga para fotofobia (EVA), similar a la utilizada en la valoración del dolor, la cual se puntuó de 0 a 10 y se dividió en 4 rangos (Blake et al, 2005):

- 0: sin fotofobia
- 1-3: fotofobia leve
- 4-7: fotofobia moderada
- 8-10: fotofobia intensa

Ambas encuestas se realizaron a todos los pacientes a las 72 horas postquirúrgicas con la guía de LFGA. La EVA evaluó de manera independiente las primeras 24, 48 y 72 horas.

4.8 Análisis Estadístico

El análisis de los resultados se realizó empleando el sistema estadístico de IBM© SPSS® versión 20.0 (*Statistical Procedures for the Social Sciences software SPSS 20.0, EE.UU*). Las variables estudiadas se agruparon en medias y error estándar de la media para cada conjunto de muestras.

Se consideraron estadísticamente significativos valores de "p" iguales o inferiores a 0,05.

Para determinar las diferencias estadísticamente significativas se utilizaron los siguientes tests según las características de las variables y el tamaño de la muestra: Rho de Spearman para el análisis de correlación bivariada entre las escalas de ftofobia EVA y EVF, los niveles de sCD44 en muestra 1 (ngM1) y muestra 2 (ngM2) y el diferencia ngM2 - ngM1. Se utilizó la prueba t de Student (asumiendo varianzas iguales mediante la prueba de Levene) para el contraste de hipótesis entre variables cuantitativas (niveles de sCD44: ngM1, ngM2, diferencia ngM2-ngM1) con respecto a variables cualitativas (grupo, tiempos sin usar lentes de contacto, uso de MMC en la cirugía, sexo, alergias, estación y tiempo de conservación). Y por último el test de Chi cuadrado se utilizó para el contraste de hipótesis entre el uso de lentes de contacto, tiempo sin usar lentes de contacto antes de la cirugía, uso de anticonceptivos orales, alergias, época de recogida de la muestra (variable: estación) y el tiempo de conservación con la detección (M1 positivo y M2 positivo) o ausencia (M1 negativo y M2 negativo) de sCD44.

5. RESULTADOS

5.1 Resumen de los datos de pacientes y controles

La tabla 1 resume los datos generales obtenidos de los individuos incluidos en el estudio.

Se recogieron muestras de un total de 42 donantes (20 pacientes de cirugía refractiva ASA y 22 controles) de entre 20 y 40 años (26 mujeres y 16 hombres). A su vez, se agruparon en experimento 1, realizado con muestras recogidas entre los meses de enero y abril (12 pacientes y 12 controles) que fueron congeladas y conservadas durante 5 meses, y en experimento 2 con muestras recogidas entre mayo y julio (8 pacientes y 10 controles) congeladas y conservadas durante 2 meses. La distribución por sexo y edad no tuvo diferencias significativas en ninguno de los dos grupos.

Dentro de los fármacos sistémicos referidos por los pacientes, pero no por los controles, encontramos: salbutamol $n = 1$; atorvastatina $n = 1$; levotiroxina $n = 2$; valsartan $n = 1$; doxorubicina $n = 1$. Solo destacó el uso de anticonceptivos orales (ACO) en ambos grupos $n = 10$ (pacientes: 6 y controles: 4).

Se resumen a continuación las alergias sistémicas que refirieron ambos grupos:

- Pacientes : avellanas, ácaros $n = 1$; melón $n = 1$; pelo de gato $n = 1$; colorantes $n = 1$.
- Controles: polen, gramíneas y ácaros $n = 1$; penicilina $n = 1$; tiomerzal $n = 1$; fenobarbital $n = 1$.

Dentro del grupo de pacientes se describió el uso de lentes de contacto. De los 20 pacientes, 16 eran usuarios de lentes de contacto blandas ($n = 14$) o de tipo no identificado por el paciente ni en informes de historia clínica ($n = 2$). Respecto al tiempo sin uso de las lentes de contacto antes de la cirugía se conformaron dos grupos: un grupo

se caracterizó porque la última vez que uso las lentes fue > 3 meses antes de la cirugía (n = 7) y el segundo grupo usó las lentes por última vez entre 7 días y 3 meses antes de la cirugía (n = 9). Los pacientes que usaron las lentes de contacto en los últimos 7 días prequirúrgicos no fueron incluidos en este estudio.

Tabla 1. Resumen de datos basales de los pacientes y los controles

GRUPO DE PACIENTES							GRUPO DE CONTROLES					AMBOS GRUPOS	
	EDAD	SEXO	LC	TIEMPOSIN LC	ALERG	ACO		EDAD	SEXO	ALERG	ACO	ESTACIÓN	CONSER- VADO
P1	32	M	SI	7días-3 meses	NO	NO	C1	30	F	NO	SI	INVIERNO	5 meses
P2	25	F	SI	> 3 meses	NO	SI	C2	34	F	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P3	26	F	NO		NO	NO	C3	27	M	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P4	39	F	SI	7días-3 meses	NO	NO	C4	28	M	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P5	27	F	SI	7días-3 meses	NO	SI	C5	27	F	NO	SI	INVIERNO	5 meses
P6	34	F	SI	7días-3 meses	NO	NO	C6	28	F	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P7	41	F	SI	> 3 meses	NO	SI	C7	24	M	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P8	26	F	NO		NO	SI	C8	35	F	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P9	34	M	SI	> 3 meses	SI	NO	C9	40	F	SI	NO	INVIERNO	5 meses
P10	28	F	SI	7días-3 meses	NO	SI	C10	35	F	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P11	38	M	SI	> 3 meses	NO	NO	C11	28	F	SI	NO	INVIERNO	5 meses
P12	33	F	SI	7días-3 meses	NO	NO	C12	26	F	NO	NO	INVIERNO	5 meses
P13	31	M	NO		NO	NO	C13	24	F	SI	SI	VERANO	2 meses
P14	32	F	SI	7días-3 meses	SI	SI	C14	24	M	NO	NO	VERANO	2 meses
P15	38	M	SI	> 3 meses	NO	NO	C15	31	F	NO	NO	VERANO	2 meses
P16	20	F	SI	> 3 meses	SI	NO	C16	31	M	NO	NO	VERANO	2 meses
P17	23	F	SI	7días-3 meses	NO	NO	C17	38	M	NO	NO	VERANO	2 meses
P18	38	F	SI	7días-3 meses	NO	NO	C18	30	M	NO	NO	VERANO	2 meses
P19	40	F	SI	> 3 meses	NO	NO	C19	32	M	NO	NO	VERANO	2 meses
P20	33	M	NO		NO	NO	C20	33	M	NO	NO	VERANO	2 meses
							C21	29	F	NO	SI	VERANO	2 meses
							C22	32	M	SI	NO	VERANO	2 meses
Media	31,9	ratio F:M 2,3	11 SI	7 : > 3 meses	3 SI	6 SI		30,27 3	ratio F:M 1,2	4 SI	4 SI	I : 24	5 m: 24
			3 NO	9: 7días- 3meses	17 NO	14 NO				18 NO	18 NO	V: 18	2 m: 18

LC: Lente de contacto. ALERG: Alergias sistémicas. ACO: Anticonceptivos orales. M: Masculino. F: Femenino. I: Invierno. V: Verano.

5.2 Análisis de severidad de la fotofobia en las primeras 72 horas post ASA

Se recogieron en total 40 encuestas:

- 20 en repuesta a la Escala Visual Análoga (EVA) para fotofobia a las 24, 48 y 72 horas.
- 20 en respuesta a la Escala de Valoración de Fotofobia (EVF) a las 72 horas diseñada para el estudio.

Se calculó la calificación media de fotofobia con la EVA a las 24 horas: 7,3 (severa), a las 48 horas: 6,4 (moderada) y a las 72 horas: 4,25 (moderada). Con la EVF para las 72 horas la calificación media fue 27,3 (moderada).

Mediante correlación bivariada (tabla 2), no se observó una relación estadísticamente significativa entre la calificación dada por los pacientes para la fotofobia por EVA entre los distintos tiempos postoperatorios (a las 24, 48 y 72 horas); sin embargo, la correlación entre EVF y la EVA a las 72 horas mostró una clara significación estadística ($r_s=0.56$, $p = 0,011$) (tabla 2).

Tabla 2. Correlación bivariada entre Escalas Ordinales para valorar fotofobia post ASA. $p \leq 0,05$

			EVA24	EVA48	EVA72	EVF
Rho de Spearman	EVA24	Coeficiente de correlación	1,000	,115	,085	,299
		Sig. (bilateral)	.	,629	,723	,200
		N	20	20	20	20
	EVA48	Coeficiente de correlación	,115	1,000	,160	,189
		Sig. (bilateral)	,629	.	,501	,425
		N	20	20	20	20
	EVA72	Coeficiente de correlación	,085	,160	1,000	,556
		Sig. (bilateral)	,723	,501	.	,011
		N	20	20	20	20
	EVF	Coeficiente de correlación	,299	,189	,556*	1,000
		Sig. (bilateral)	,200	,425	,011	.
		N	20	20	20	20

5.3 Detección de la fracción soluble del receptor CD44 de ácido hialurónico en lágrima de donantes del Grupo I (pacientes sometidos a ASA)

En total se recolectaron 40 muestras de lágrima de 20 pacientes sometidos a ASA. De la primera muestra (M1) o preoperatoria, recolectada en la sala de quirófano, 10 fueron positivas, es decir, se detectaron en ellas niveles de sCD44 de entre 0,288 ng/ml y 5,407 ng/ml (figura 5).

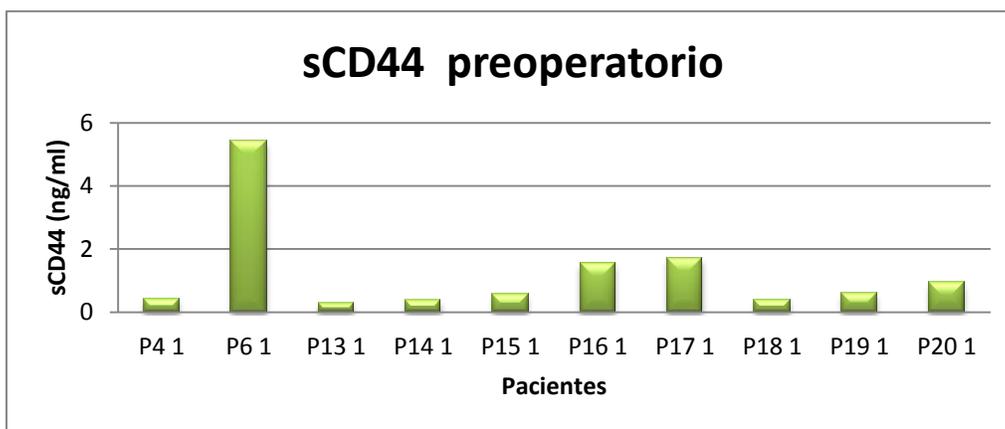


Figura 5. Pacientes con niveles positivos de sCD44 en el preoperatorio.

A las 72 horas de la recolección de M1, se recolectó la segunda muestra (M2) o postoperatoria y de ellas, 13 fueron positivas, con valores de sCD44 de entre 0,199 ng/ml y 6,622 ng/ml (figura 6). En el resto de las muestras no se obtuvieron niveles cuantificables de sCD44.

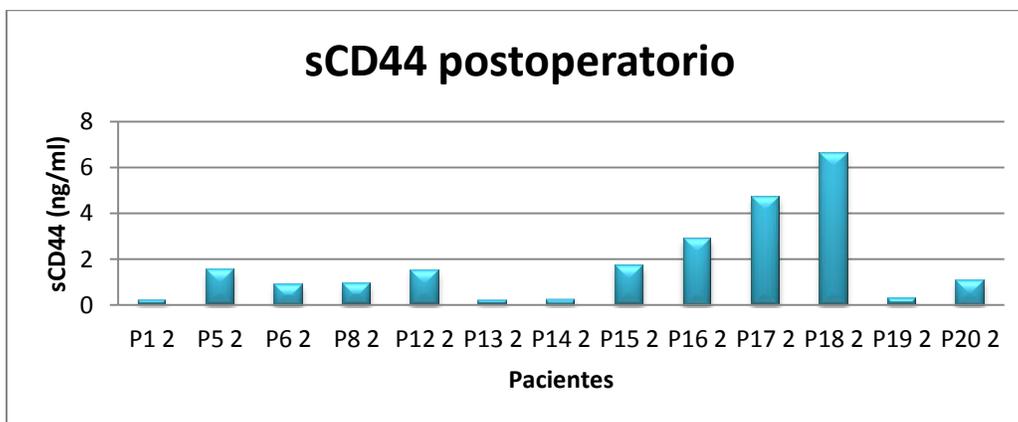


Figura 6. Pacientes con niveles positivos de sCD44 en postoperatorio.

Teniendo en cuenta lo obtenido tanto para M1 como para M2, un total de 57,5% de pacientes expresaban sCD44.

5.4 Detección de la fracción soluble del receptor CD44 de ácido hialurónico en lágrima de donantes del Grupo II (control)

En total se recolectaron 44 muestras de lágrima de 22 donantes control. En un momento cero se recolectó la primera muestra (M1) y de ellas, 10 fueron positivas, es decir, se detectaron niveles de sCD44 entre 0,158 ng/ml y 1,53 ng/ml (figura 7).

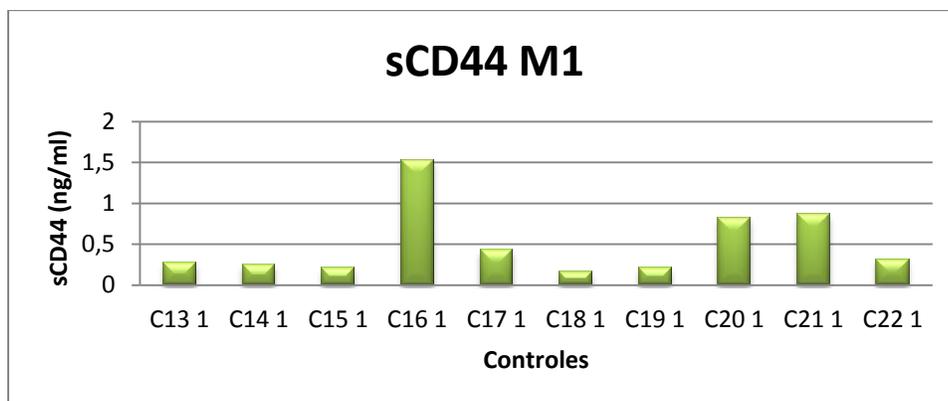


Figura 7. Controles con niveles positivos de sCD44 en muestra 1 (M1)

A las 72 horas de la recolección de M1, se recolectó la segunda muestra (M2) y 12 de ellas fueron positivas. Los niveles de sCD44 medidos en M2 variaron entre 0,175 ng/ml y 1,085 ng/ml (figura 8).

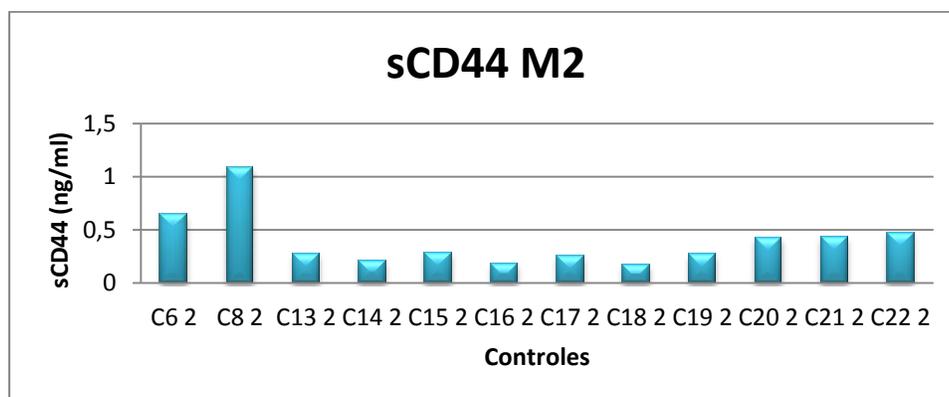


Figura 8. Controles con niveles positivos de sCD44 en muestra 2 (M2).

Teniendo en cuenta lo obtenido tanto para M1 como para M2, el 50 % de los donantes control expresaban sCD44.

La tabla 3 resume los datos de los donantes de los Grupos I y II en cuya lágrima se pudo detectar sCD44.

Tabla 3. Donantes con niveles detectables de sCD44

PACIENTES					CONTROLES				
	EDAD	SEXO	M1	M2		EDAD	SEXO	M1	M2
P1	32	M		X	C1	30	F		
P2	25	F			C2	34	F		
P3	26	F			C3	27	M		
P4	39	F	X		C4	28	M		
P5	27	F		X	C5	27	F		
P6	34	F	X	X	C6	28	F		X
P7	41	F			C7	24	M		
P8	26	F		X	C8	35	F		X
P9	34	M			C9	40	F		
P10	28	F			C10	35	F		
P11	38	M			C11	28	F		
P12	33	F		X	C12	26	F		
P13	31	M	X	X	C13	24	F	X	X
P14	32	F	X	X	C14	24	M	X	X
P15	38	M	X	X	C15	31	F	X	X
P16	20	F	X	X	C16	31	M	X	X
P17	23	F	X	X	C17	38	M	X	X
P18	38	F	X	X	C18	30	M	X	X
P19	40	F	X	X	C19	32	M	X	X
P20	33	M	X	X	C20	33	M	X	X
					C21	29	F	X	X
					C22	32	M	X	X

5.5 Análisis de detección de sCD44 (detectado vs no detectado) comparando Grupo I (pacientes) y Grupo II (pacientes)

Se comparó el dato de “presencia” (niveles detectables) frente a “ausencia” (niveles indetectables) de sCD44 en los dos grupos en M1 y en M2. No hubo diferencias

estadísticamente significativas entre los resultados detectables de sCD44 en los Grupos I y II ($p = 0,08$ para M1 y $p = 0,47$ para M2).

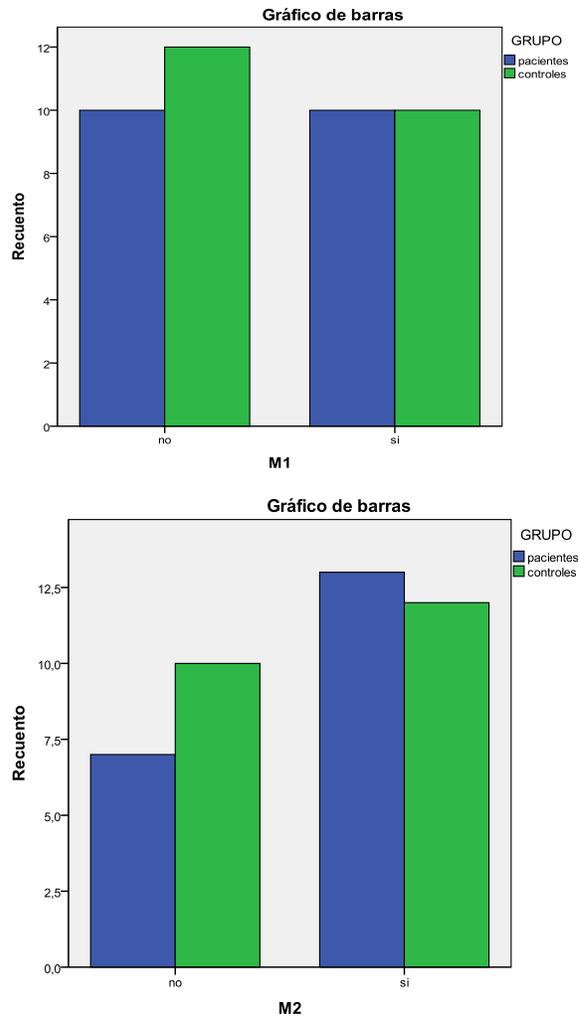


Figura 9. Comparación de M1 y M2 en ambos grupos

5.6 Análisis de correlación de los niveles de sCD44 en relación con la fotofobia a las 24, 48 y 72 horas postoperatorias

La Tabla 4 resume los resultados del análisis de correlación realizado. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles medidos de sCD44 en M1 y en M2 (ngM1 y ngM2), con una $p = 0,02$ (resaltado en verde en la tabla 4). Por otra parte,

también se encontró una correlación significativa y con una $p = 0,001$ entre los niveles medidos de sCD44 en M2 (ngM2) y la diferencia (el cambio) entre ngM2 y ngM1 (resaltado en verde en la tabla 4).

Tabla 4. Correlación entre severidad de ftofobia y niveles de sCD44

			EVA24	EVA48	EVA72	EVF	ngM1	ngM2	ngM2menosngM1
Rho de Spearman	EVA24	Coeficiente de correlación	1,000	,115	,085	,299	,253	-,062	-,439
		Sig. (bilateral)	.	,629	,723	,200	,281	,795	,053
		N	20	20	20	20	20	20	20
	EVA48	Coeficiente de correlación	,115	1,000	,160	,189	,035	,024	-,210
		Sig. (bilateral)	,629	.	,501	,425	,883	,921	,375
		N	20	20	20	20	20	20	20
	EVA72	Coeficiente de correlación	,085	,160	1,000	,556*	,175	,206	,006
		Sig. (bilateral)	,723	,501	.	,011	,462	,384	,981
		N	20	20	20	20	20	20	20
	EVF	Coeficiente de correlación	,299	,189	,556*	1,000	,264	,315	-,017
		Sig. (bilateral)	,200	,425	,011	.	,260	,176	,942
		N	20	20	20	20	20	20	20
	ngM1	Coeficiente de correlación	,253	,035	,175	,264	1,000	,515	-,153
		Sig. (bilateral)	,281	,883	,462	,260	.	,020	,519
		N	20	20	20	20	20	20	20
	ngM2	Coeficiente de correlación	-,062	,024	,206	,315	,515*	1,000	,681**
		Sig. (bilateral)	,795	,921	,384	,176	,020	.	,001
		N	20	20	20	20	20	20	20
	ngM2menosngM1	Coeficiente de correlación	-,439	-,210	,006	-,017	-,153	,681**	1,000
		Sig. (bilateral)	,053	,375	,981	,942	,519	,001	.
		N	20	20	20	20	20	20	20

Tabla 4. Correlación entre severidad de fobia y niveles de sCD44

			EVA24	EVA48	EVA72	EVF	ngM1	ngM2	ngM2menosngM1
Rho de Spearman	EVA24	Coeficiente de correlación	1,000	,115	,085	,299	,253	-,062	-,439
		Sig. (bilateral)	.	,629	,723	,200	,281	,795	,053
		N	20	20	20	20	20	20	20
	EVA48	Coeficiente de correlación	,115	1,000	,160	,189	,035	,024	-,210
		Sig. (bilateral)	,629	.	,501	,425	,883	,921	,375
		N	20	20	20	20	20	20	20
	EVA72	Coeficiente de correlación	,085	,160	1,000	,556*	,175	,206	,006
		Sig. (bilateral)	,723	,501	.	,011	,462	,384	,981
		N	20	20	20	20	20	20	20
	EVF	Coeficiente de correlación	,299	,189	,556*	1,000	,264	,315	-,017
		Sig. (bilateral)	,200	,425	,011	.	,260	,176	,942
		N	20	20	20	20	20	20	20
	ngM1	Coeficiente de correlación	,253	,035	,175	,264	1,000	,515	-,153
		Sig. (bilateral)	,281	,883	,462	,260	.	,020	,519
		N	20	20	20	20	20	20	20
	ngM2	Coeficiente de correlación	-,062	,024	,206	,315	,515*	1,000	,681**
		Sig. (bilateral)	,795	,921	,384	,176	,020	.	,001
		N	20	20	20	20	20	20	20
	ngM2menosngM1	Coeficiente de correlación	-,439	-,210	,006	-,017	-,153	,681**	1,000
		Sig. (bilateral)	,053	,375	,981	,942	,519	,001	.
		N	20	20	20	20	20	20	20

Confirmando este hallazgo, los niveles de sCD44 más elevados en M2 (ngM2) implicarían una mayor diferencia o cambio entre ambas muestras y, a su vez, se correlacionan con el grado de fotofobia a las 24 horas. Esta diferencia en los niveles de sCD44 se asocia a la fotofobia postquirúrgica pero no puede considerarse como un biomarcador predictor de fotofobia reproducible.

5.7 Comparación de los niveles cuantitativos de sCD44 en los pacientes usuarios de LC vs los que no los usan

Se analizaron los resultados con intervalos de confianza del 95 %, para cada comparación (tabla 5).

Tabla 5. sCD44 cuantitativo en usuario de LC vs no usuario de LC

	LC	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	NO	4	-,2517	1,02486	,51243
	SI	16	,1097	1,78542	,44636
ngM2menosM1	NO	4	,5138	,96956	,48478
	SI	16	,6902	2,39692	,59923
ngM2	NO	4	,2620	1,02324	,51162
	SI	16	,7999	2,34180	,58545

Con los resultados obtenidos ngM1: IC (-1,918 a 1,195), ngM2: IC (-2,233 a 1,157), ngM2 menos M1: IC (-1,840 a 1,487), no se demostró una relación estadísticamente significativa entre el uso de lentes de contacto y los niveles de sCD44.

5.8 Comparación de los niveles cuantitativos de sCD44 según el tiempo sin usar LC

Se seleccionaron intervalos de confianza del 95 % para analizar esta comparación (Tabla 6).

Tabla 6. sCD44 cuantitativo según el tiempo sin usar LC

	TIEMPOSINLC	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	7diasa3meses	9	,3244	2,20790	,73597
	mayora3meses	7	-,1629	1,14551	,43296
ngM2	7diasa3meses	9	1,4733	2,60879	,86960
	mayora3meses	7	-,0657	1,75556	,66354
ngM2menosngM1	7diasa3meses	9	1,1478	3,09313	1,03104
	mayora3meses	7	,1000	,94011	,35533

Se obtuvieron los siguientes resultados: ngM1: IC (-1,490 a 2,465), ngM2: IC (-0,928 a 4,006), ngM2 menos M1: IC (1,565 a 3,661).

En este caso se comparó un subgrupo de pacientes que no usaba las lentes de contacto en un periodo de tiempo comprendido entre 7 días y 3 meses antes de ASA contra otro subgrupo que no usaba las lentes de contacto en un periodo mayor de 3 meses. No se encontró ninguna relación estadísticamente significativa entre los niveles de sCD44 y el tiempo sin usar las lentes de contacto. Tampoco ninguna de estas comparaciones alcanzó significación estadística.

5.9 Comparación de los niveles de sCD44 con el uso de MMC durante la cirugía de ASA

Para definir la relación entre el uso intraoperatorio de mitomicina C al 0,02% y los niveles de sCD44, se utilizaron Intervalos de confianza del 95% (tabla 7).

Tabla 7. Niveles de sCD44 en comparación con MMC

	MMC	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	No	17	-,0176	1,78568	,43309
	Si	3	,3567	,05859	,03383
ngM2	No	17	,4000	1,75507	,42567
	Si	3	2,3467	3,70087	2,13670
ngM2menosngM1	No	17	,4188	1,86991	,45352
	Si	3	1,9900	3,66337	2,11505

Los intervalos de confianza obtenidos fueron: ngM1: IC (-1,294 a 0,545), ngM2: IC (-4,662 a 0,768), ngM2 menos M1: IC (-4,392 a 1,250). En base a estos, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la MMC y los niveles de sCD44.

5.10 Comparación de los niveles de sCD44 en ngM1 y la diferencia ngM2 menos M1 según el sexo

Se definieron intervalos de confianza de 95% para esta comparación e igualdad de varianzas según la prueba de Levene. (tabla 8).

Resultados expresados como intervalos de confianza ngM1: IC (-1,017 a 0,725), ngM2 menos M1: IC (-0,548 a 1,494).

Se realizó la comparación tanto en pacientes como en los controles y no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de sCD44 asociada al sexo.

Tabla 8. Niveles de sCD44 según el sexo en controles y pacientes

	SEXO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	Femenino	26	-,2862	1,53872	,30177
	Masculino	16	-,1404	,98164	,24541
ngM2menosM1	Femenino	26	,5519	1,96025	,38444
	Masculino	16	,0792	,58599	,14650

5.11 Diferencias en los niveles de sCD44 basales ngM1 y edad según el grupo I (pacientes) y grupo II (controles)

Se definió un Intervalo de confianza del 95% para ambas comparaciones (tabla 9).

Tabla 9. Comparación de los niveles de ngM1 sCD44 según edad

	GRUPO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	paciente	20	,0374	1,64453	,36773
	control	22	-,4743	,96926	,20665
EDAD	paciente	20	31,90	6,069	1,357
	control	22	30,27	4,377	,933

Según los resultados obtenidos: ngM1: IC (-0,320 a 1,344), Edad: IC (-1,719 a 4,973), no se demostró diferencia estadísticamente significativa entre los niveles basales de sCD44 según la edad de los participantes en ambos grupos del estudio.

5.12 Comparación de los niveles de sCD44 basal ngM1 y la diferencia ngM2 menos M1 según el uso o no de ACO (anticonceptivos orales)

Para evaluar estas variables también se definió un Intervalo de confianza del 95%.

Se analizó la relación entre los niveles de sCD44 y el uso de anticonceptivos orales en todas las mujeres participantes en el estudio (tabla 10).

Tabla 10. Comparación de sCD44 y uso de ACO

	ACO	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	NO	16	-,0546	1,81308	,45327
	SI	10	-,6567	,92204	,29157
ngM2menosM1	NO	16	,6859	2,33109	,58277
	SI	10	,3374	1,23861	,39168

Según los intervalos de confianza ngM1: IC (-0,679 a 1,883); ngM2 menos M1: IC (-1,309 a 2,006), no se obtuvo evidencia estadísticamente significativa respecto a esta asociación.

5.13 Comparación entre niveles de sCD44 y presencia o ausencia de alergias en grupo control y grupo de pacientes

Se analizó la relación entre alergias sistémicas a medicamentos, polen, gramíneas, pelo de gato, entre otras referidas por los pacientes, agrupándolas en una sola variable (“alergias”) y su posible relación con la detección de sCD44 (tabla 11).

Se establecieron intervalos de confianza del 95% y varianzas diferentes según la prueba de Levene.

Tabla 11. Comparación entre niveles de sCD44 y alergias

	ALERGIAS	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	NO	35	-,2275	1,43725	,24294
	SI	7	-,2463	,77686	,29362
ngM2menosM1	NO	35	,3755	1,70394	,28802
	SI	7	,3531	,88592	,33485
ngM2	NO	35	,1481	1,76415	,29820
	SI	7	,1069	1,14977	,43457

Los resultados expresados en intervalos de confianza: ngM1: IC (-1,118 a 1,155); ngM2 menos M1: IC (-1,323 a 1,367); ngM2: IC (-1,369 a 1,452), no demostraron evidencia estadísticamente significativa que relacione el conjunto de alergias con los niveles de sCD44.

5.14 Comparación entre niveles de sCD44 y la estación climatológica en la cual se recogieron las muestras (invierno-verano)

Se utilizó un Intervalo de confianza de 95% (Tabla 12).

Se intentó establecer una relación entre las condiciones climatológicas (invierno y verano), bajo las cuales se recogieron las muestras de lágrima y los niveles de sCD44.

Tabla 12. Niveles de sCD44 comparados con estación climatológica

	ESTACIÓN	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	Invierno	24	-,8791	1,41640	,28912
	Verano	18	,6340	,49501	,11668
ngM2menosM1	Invierno	24	,2650	1,53836	,31402
	Verano	18	,5142	1,68661	,39754
ngM2	Invierno	24	-,6140	1,06758	,21792
	Verano	18	1,1482	1,80852	,42627

Basados en los intervalos ngM1: IC (-2,219 a -0,806); ngM2menosM1: IC (-1,259 a 0,761); ngM2: IC (-2,663 a -0,860). En este contraste de hipótesis existe un resultado estadísticamente significativo, que permite, descartar la hipótesis nula y afirmar que existen niveles menores de sCD44 en las muestras de lágrima recogidas durante los meses de invierno tanto en pacientes como en controles. Estos resultados se encuentran en el análisis de los niveles basales (ngM1) y en los niveles de (ngM2) pero no se comparte esta evidencia con la variable ngM2 menos M1.

5.15 Comparación entre los niveles de sCD44 y el periodo de conservación de las muestras

Los intervalos de confianza fueron del 95% para los tres contrastes de hipótesis (tabla 13).

Tabla 13. Niveles de sCD44 y periodo de conservación de las muestras

	CONSERVACION	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ngM1	5meses	24	-,8792	1,41714	,28927
	2meses	18	,6350	,49305	,11621
ngM2	5meses	24	-,6150	1,06803	,21801
	2meses	18	1,1494	1,80778	,42610
ngM2menosngM1	5meses	24	,2654	1,53831	,31401
	2meses	18	,5139	1,68644	,39750

Los resultados fueron: ngM1: IC (-2,221 a -0,807); ngM2: IC (-2,665 a -0,863);
ngM2menosM1: IC (-1,258 a 0,761).

Existe una relación estadísticamente significativa que permite deducir que a mayor tiempo de conservación de las muestras es menor la probabilidad de encontrar niveles detectables (positivos) de sCD44 en lágrima.

6. DISCUSIÓN

Durante la historia y el desarrollo de la cirugía refractiva han surgido múltiples técnicas, entre ellas las de ablación superficial, que buscan aumentar el espectro de pacientes que se pueda beneficiar de la corrección de defectos refractivos actuando sobre la córnea y disminuir los efectos secundarios o indeseables de la cirugía. Sin embargo, la fotofobia y el dolor en particular siguen siendo unas de las principales molestias que refieren los pacientes en el postoperatorio. Estudios previos han demostrado mediante escala visual análoga para fotofobia puntuaciones más elevadas en el primer día postoperatorio (Loannis et al, 2012; Hassan Razmju et al, 2012), lo cual concuerda con los resultados de nuestro estudio.

Mediante los experimentos de laboratorio realizados con ELISA específico para sCD44 en lágrima humana, se logró detectar sCD44 en el 57,5% de los pacientes sometidos a ASA y en el 50% de los individuos control. En ellos los niveles detectados fueron de 0,288 ng/ml – 5,407 ng/ml y a las 72 horas 0,199 ng/ml – 6,622 ng/ml en el grupo de pacientes y de 0,158 ng/ml – 1,53 ng/ml y a las 72 horas entre 0,175 ng/ml – 1,085 ng/ml en el grupo de controles. Los niveles detectados en este trabajo son un poco más altos y con mayor variabilidad que los detectados por García – Posadas et al, en su estudio de 2012 acerca de los receptores de ácido hialurónico en la superficie ocular, en el cual detectaron concentraciones de $1,72 \pm 0,38$ ng/ml. En ambos estudios se analizó la distribución entre sexos, sin encontrarse una diferencia significativa según este parámetro.

Más allá de la distribución por sexos, en este trabajo nos proponíamos buscar posibles cambios en los niveles detectables de sCD44 en la lágrima asociados a la edad, uso de lentes de contacto, alergias sistémicas, uso de anticonceptivos orales, exposición traumática quirúrgica (ASA) del epitelio corneal y uso de mitomicina C tópica, sin encontrar ninguna evidencia estadísticamente significativa. Sería interesante realizar

futuros trabajos con tamaños muestrales mayores que puedan arrojar una evidencia más sólida.

Dentro de los posibles causantes de variabilidad en la detección de sCD44, con potencia estadística, se encontraron en este trabajo la estación climatológica y el tiempo de conservación de las muestras. Ambos casos se deberán controlar de manera más estricta, incluso parámetros como la temperatura ambiental, la humedad y la hora del día, se deberán estudiar en futuros trabajos de investigación para determinar y desglosar un posible ciclo interdiario o intradiario de la molécula. No existe ningún dato en la literatura actual acerca de estos aspectos en relación con el sCD44.

Respecto a la asociación de los niveles de sCD44 en el postoperatorio de ASA, no se logró demostrar una función como predictor de fotofobia. Sin embargo, sería interesante demostrar el tipo de relación que tiene con las demás citoquinas proinflamatorias y los niveles de ácido hialurónico, para aclarar su papel como pro - inflamatorio o como regulador debido a la acción antitumoral, citotóxica y antiproliferativa que se ha descrito en otros tejidos oculares, como la malla trabecular y retina (Michael et al, 2013). Se podría plantear la hipótesis de trabajo para futuros estudios que los niveles bajos de sCD44 se correlacionan con una mejor o más rápida reepitelización de la córnea.

En el presente estudio existen algunas limitaciones que deben ser mencionadas. La limitación principal fue la escasa cantidad de lágrima que se pudo obtener de los donantes (tanto pacientes como controles). Aunque la recolección por capilaridad es una técnica relativamente fácil, indolora y poco molesta, el volumen de lágrima basal es muy pequeño lo cual limita las pruebas de laboratorio que se pueden emplear. Por otro lado, al comienzo del estudio, se planificó la inclusión mensual de los pacientes sometidos a ASA durante un periodo de siete meses, sin embargo, por limitaciones técnicas ajenas a los investigadores en dos meses no fue posible reclutar los pacientes, por lo cual el tamaño de la muestra es más pequeño de lo previsto inicialmente. Otro factor importante a la hora de realizar el estudio fue el tiempo desde la recolección de la muestra hasta la

realización de las pruebas de laboratorio, ya que al ser un periodo variable puede favorecer la influencia de factores externos que se comporten como factores de confusión en el análisis del estudio. Para finalizar, durante el desarrollo del estudio, el investigador requirió un entrenamiento en el manejo de laboratorio y recolección de las muestras, esta curva de aprendizaje adquirió mayor importancia al inicio del proyecto.

7. CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados de este estudio piloto se pueden deducir las siguientes conclusiones preliminares:

1. Se confirma que la fotofobia, como síntoma independiente del dolor en el postoperatorio de cirugía refractiva tipo ASA, es severa en las primeras 24 horas y persiste más moderadamente incluso hasta las 72 horas.
2. Dado que la escala visual análoga adaptada a fotofobia se correlaciona con los resultados a las 72 horas de valoración medida con una escala de valoración global de este síntoma desarrollada por nosotros, estudios futuros podrán validar el uso de esta última y comparar su posible superioridad o no en términos de fiabilidad y reproducibilidad en la estimación de este síntoma prevalente en el postoperatorio.
3. Se confirma la presencia de sCD44 en lágrima humana tanto en estado basal como en postoperatorio de cirugía tipo ASA como expresión del proceso inflamatorio. Sin embargo, al no ser posible el estudio de otras moléculas inflamatorias con las cuales correlacionar, su papel debe ser más ampliamente estudiado.
4. Se encontraron diferencias en los niveles de sCD44 en lágrima humana ligados a la estación climatológica del momento de la recolección, lo que podría ser la base para futuros trabajos en los que se realicen las medidas bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.
5. No obstante, otros factores como la curva de aprendizaje en la toma de la muestra y su procesado y, sobre todo, el tiempo de conservación de las muestras, que mostró tener una influencia claramente significativa en la detección de los niveles sCD44, pudieran tener un peso superior al fenómeno biológico medido, recomendándose de este modo un periodo de conservación máximo de 2 meses para este tipo de muestras.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ahmad S, Kolli S, Li DQ, de Paiva CS, Pryzborski S, Dimmick I, Armstrong L, Figueiredo FC, Lako M. A putative role for RHAMM/HMMR as a negative marker of stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2008; 26:1609-19.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990;61(7):1303-13.

Aslanides IM, Padroni S, Arba Mosquera S, Ioannides A, Mukherjee A. Comparison of single-step reverse transepithelial all-surface laser ablation (ASLA) to alcohol-assisted photorefractive keratectomy. *Clinical Ophthalmology*, 2012;6,973-80.

Blake CR, Cervantes RA, Macias Y, Anzoulatous G, Anderson R, Chayet AS. Comparison of postoperative pain in patients following photorefractive keratectomy versus advanced surface ablation. *J Cataract Refract Surg* 2005;31:1314–1319

Choi J, Miller AM, Nolan MJ, Yue BY, Thotz ST, Clark AF, Agarwal N, Knepper PA. Soluble CD44 is cytotoxic to trabecular meshwork and retinal ganglion cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(1):214-22.

Conrad AH, Zhang Y, Tasheva ES, Conrad GW. Proteomic Analysis of Potential Keratan Sulfate, Chondroitin Sulfate A, and Hyaluronic Acid Molecular Interactions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51(9):4500–4515.

Day AJ, Prestwich GD. Review Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J Biol Chem* 2002;277(7):4585-8.

Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, García-Vázquez C, Fernández I, Stern ME, Diebold Y, Calonge M. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine*. 2008 44(1):160-7.

García L, Contreras L, López A, Villarón S, Maldonado MJ, Diebold Y. Hyaluronan receptors in the human ocular surface: a descriptive and comparative study of RHAMM and CD44 in tissues, cell lines and freshly collected samples. *Histochem Cell Biol* 2012;137(2):165-76.

Gomes JA, Amankwah R, Powell-Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* 2004;88:821-25.

Hardwick C, Hoare K, Owens R, Hohn HP, Hook M, Moore D, Cripps V, Austen L, Nance DM, Turley EA. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility. *J Cell Biol* 1992;117:1343-50.

Hornof M, de la Fuente M, Hallikainen M, Tammi RH, Urtti A. Low molecular weight hyaluronan shielding of DNA/PEI polyplexes facilitates CD44 receptor mediated uptake in human corneal epithelial cells. *J Gene Med* 2008;10:70-80.

Hughes JL, Lackie PM, Wilson SJ, Church MK, McGill JL. Reduced structural proteins in the conjunctival epithelium in allergic eye disease. *Allergy* 2006;61:1268-74.

Isacke CM, Yarwood H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int J biochem Cell Biol* 2002;34:718-21.

Johnson P, Ruffell B. CD44 and its role in inflammation and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8:208-220.

Kuehn MH, Hageman GS. Expression and characterization of the IPM 150 gene (IMPG1) product, a novel human photoreceptor cell-associated chondroitin-sulfate proteoglycan. *Matrix Biol* 1999;18(5):509-18.

Liu N, Lapcevich RK, Underhill CB, Han Z, Gao F, Swartz G, Plum SM, Zhang L, Green SJ. Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth. *Cancer Res* 2001; 61: 1022–1028.

Liu N, Xu XM, Chen J, Wang L, Yanq S, Underhill CB, Zhang L. Hyaluronan-binding peptide can inhibit tumor growth by interacting with Bcl-2. *Int J Cancer* 2004;109: 49–57.

McDermott AM, Perez V, Huang AJ, Pflugfelder SC, Stern ME, Baudouin C, Beuerman RW, Burns AR, Calder VL, Calonge M, Chodosh J, Coster DJ, Dana R, Hazlett LD, Jones DB, Kim SK, Knop E, Li DQ, Mitchell BM, Niederkorn JY, Pearlman E, Wilhelmus KR, Kurie E. Pathways of corneal and ocular surface inflammation: A perspective from the Cullen symposium. *Ocular Surf* 2005;3(4):S131-S138.

Menezes GB, Mcavoy EF, Kubes P. Hyaluronan, platelets and monocytes. A novel pro-inflammatory triad. *Am J Pathol* 2009;174:1993-95.

Meyer K, Palmer JJ. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem.* 1934;107:629–634.

Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: Structure, function and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71:241-319.

Nolan MJ, Koga T, Walker L, McCarty R, Grybauskas A, Giovingo MC, Skuran K, Kuprys PV, Knepper PA. sCD44 Internalization in Human Trabecular Meshwork Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(1):592–601.

Rubinstein DB, Stortchevoi A, Boosalis M, Ashfaq R, Ghebrehiwet B, Peerschke EI, Calvo F, Guillaume T. Receptor for the globular heads of C1q (gC1q-R, p33, hyaluronan-binding protein) is preferentially expressed by adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 2004;110: 741–750.

Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol* 2003;136(2):318-26.

Sohr S, Engeland K. RHAMM is differentially expressed in the cell cycle and downregulated by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* 2008;7:3448–3460.

Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and the lacrimal gland. *Cornea* 1998;17(6):584-9.

Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-16.

Stern ME, Schaumburg CS, Dana R, Calonge M, Niederkorn JY, Pflugfelder SC. Autoimmunity at the ocular surface: pathogenesis and regulation. *Mucosal Immunol* 2010;3(5):425-42.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem*. 2002; 277: 4581–4584.

Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2:839-44.

Turley EA, Harrison R. RHAMM, a member of the hyaladherins. *Science of hyaluronan today* 1999.

Turley EA. Purification of a hyaluronate-binding protein fraction that modifies cell social behavior. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;108:1016-24.

Vostrov A. A. Quitschke W. W. Plasma Hyaluronan-binding Protein Is a Serine Protease. *J. Biol Chem* 2000;275:22978–22985.

Yu Q, Toole BP, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function. *J Exp Med* 1997; 186: 1985–1996.

Zhu SN, Nölle B, Duncker G. Expression of adhesion molecule CD44 on human corneas. *Br J Ophthalmol* 1997;81:80-4.

9. ABREVIATURAS

ACO: Anticonceptivos orales

AH: Acido hialurónico

AINEs: Antiinflamatorios no esteroideos

ALERG: Alergias sistémicas

ASA: Ablación Superficial Avanzada- *Advance Surface Ablation*

BMP2: Proteína de hueso morfogénico 2

BMP4: Proteína de hueso morfogénico 4

CD44: Receptor principal del AH

CTGF: Factor de crecimiento del tejido conectivo

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

F: Femenino

HMMR: *Hyaluronan Mediated Motility Receptor*

ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular - 1

IL: Interleuquina

IMP-150: Proteína integral de membrana

LASIK: Queratomileusis asistida por láser in situ

LC: Lente de contacto

LYVE-1: *Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*

M: Masculino

MMC: Mitomicina C

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PRK : Queratectomía fotorefractiva

PTK: Fotoqueratectomía terapéutica

RHAMM: *Receptor for hayluronan-Mediated Motility*

R.P.M: Revoluciones por minuto

sCD44: Fracción soluble del CD44

SPARCAN: Proteoglicano-condroitin sulfato

TFG β : Factor de crecimiento transformante β

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

TSG-6: *Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 Protein*

UFL: Unidad funcional lagrimal

10. ANEXOS

A continuación se anexan los documentos, encuestas y escalas utilizados en este estudio.

I. Consentimiento informado

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Le ofrecemos participar en el estudio titulado “**ESTUDIO DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA FOTOFobia DURANTE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL POST CIRUGÍA REFRACTIVA**”.

Promotor del Estudio: Ministerio de Sanidad, Fondo de Investigación Sanitaria, PI10/01843

Responsables del Estudio: Dr. Miguel J. Maldonado López, Tf. 983 18 35 34; Fax 983-18 47 62

Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Propósito del estudio

Está invitado a participar en un estudio de investigación en el que se pretenden analizar los niveles de sustancias proinflamatorias en diversas muestras de superficie ocular (lágrima basal y epitelio de la córnea) para definir un posible origen de la fotosensibilidad (intolerancia a la luz) en los postoperatorios de cirugía refractiva.

Participación voluntaria

Debe saber que su participación en este programa es **voluntaria** y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

Condiciones del estudio

Si participa, usted accede a que se le tome una muestra de su lágrima en las instalaciones del IOBA. La toma de la muestra la hace un/a oftalmólogo/a, sin anestesia, porque no es un procedimiento doloroso ni molesto. Posteriormente, durante la cirugía, se guardará una muestra de su epitelio corneal que normalmente se desecha en este tipo de intervención.

Pruebas y toma de muestras que se realizarán durante el estudio

La toma de muestras no es experimental, es decir, ya ha sido ampliamente utilizada con anterioridad en humanos y forman parte de la práctica clínica de otros centros además del nuestro.

Se recogerán **2 tipos de muestra:**

1. **Lágrima.** Se utilizará para ello un tubo especial (capilar), mediante el que se tomará un volumen muy pequeño de lágrima (4 microlitros mínimo) de cada lado, sin causar dolor ni molestia. El capilar se apoya cuidadosamente en la película lagrimal y la lágrima sube por capilaridad. Todas las muestras serán recogidas bajo un código alfanumérico para asegurar la protección de sus datos personales.
2. **Epitelio corneal.** Se colecta el tejido de la córnea que rutinariamente se retira y desecha en las intervenciones de LASEK. Este procedimiento es realizado por el cirujano experto (oftalmólogo especialista en cirugía refractiva) sin variaciones en el protocolo quirúrgico establecido ni en el resultado final de la cirugía.

La toma de las muestras se hará en una única sesión, primero de un ojo y luego del otro. El procedimiento sólo durará unos minutos.

La donación de la muestra es **gratuita** y Vd. no participará en los posibles beneficios económicos que se deriven de la investigación.

Este material estará bajo la custodia del IOBA y del personal investigador del estudio. El material no será comercializado ni manipulado por personal no autorizado. El material recogido para este estudio será utilizado en su totalidad. En cumplimiento del Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, en caso de tener muestras de tejido sobrante, este será conservado durante seis (6) meses después de finalizado el estudio, con el propósito de ser utilizado solo si hubiese que repetir alguno de los análisis. Pasados seis (6) meses, se destruirá el material que no haya sido utilizado.

Riesgos que entraña el presente estudio

Usted será tratado siempre según las normas de Buena Práctica Clínica y la Declaración de Helsinki. El estudio no tiene como objetivo evaluar ni comparar la eficacia de ningún fármaco o tratamiento. En ningún momento se le administrará ninguna medicación o se le realizará prueba alguna que no pertenezca a la rutina médica y quirúrgica más adecuada para su caso. No se trata pues, de un ensayo clínico, sino de **un estudio de recogida de datos y muestras** de manera sistematizada.

Confidencialidad y protección de los datos

Sus datos son **confidenciales**. El acceso a la información personal quedará restringido al investigador del estudio y a sus colaboradores, a las autoridades sanitarias, al CEIC y al personal autorizado por el promotor de este estudio, cuando se precise para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de la misma de acuerdo con la legislación vigente.

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra se archivarán en la base de datos que el IOBA tiene dada de alta en la Agencia Nacional de Protección de Datos, la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal (BOE núm. 298, de 14-12-1999, pp. 43088-43099). El tratamiento de los datos de carácter personal se ajustará a lo dispuesto en la mencionada Ley Orgánica 15/1999, lo cual garantizará el que su identificación será siempre confidencial fuera del equipo oftalmológico que cuidará su salud.

Usted tiene derecho a que los datos sean exactos y a que se archiven en condiciones de seguridad. También tiene derecho de acceso a los datos que se obtengan del análisis de la muestra, así como a su rectificación y cancelación. Deberá solicitar el ejercicio de estos derechos al responsable del tratamiento de los datos.

Sólo se emplearán los datos de su historia clínica para correlacionarlos con los obtenidos en los análisis de las muestras, estando en todo momento de este estudio desvinculado su nombre de los mismos. Los resultados de este estudio podrán ser divulgados en revistas científicas, congresos y otro tipo de reuniones médicas, pero siempre guardando la confidencialidad de sus datos personales.

Otra información relevante

A partir de los estudios que se realicen se podría obtener información de importancia para su salud y la de sus familiares. La información que se obtenga del análisis le será comunicada exclusivamente a Vd., no a sus familiares, cuando sea relevante para su salud. Si se trata de información no relevante para su salud, Vd. decidirá si quiere o no que se le comunique. Si la información resultante del análisis de la muestra fuera de interés para la salud de sus familiares, la decisión de comunicárselo a ellos o no será suya, según la normativa vigente.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis, pero los datos obtenidos en la investigación se conservarán como parte de la documentación de dicha investigación. También debe saber que puede ser excluido del programa si los responsables del estudio lo consideran oportuno.

+CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA FOTOFobia DURANTE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL POST CIRUGÍA REFRACTIVA

Promotor del Estudio: Ministerio de Sanidad, Fondo de Investigación Sanitaria, PI10/01842

Responsables del Estudio: Dr. Miguel J. Maldonado López, Tf. 983 18 35 34; Fax 983-18 47 62

Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra: IOBA

Yo, (nombre y apellidos):

He leído la Hoja de Información que se me ha entregado, he podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con, (nombre y apellidos del Facultativo):

Dr. Miguel J. Maldonado López y Dra. Luisa Giraldo Agudelo

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera , sin tener que dar explicaciones, sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma del paciente (o representante legal, en caso de un menor):	Firma del facultativo:
Nombre:	Nombre: Dr. Miguel J. Maldonado López
Fecha:	Fecha:

Copia para el paciente

CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA FOTOFOBIA DURANTE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL POST CIRUGÍA REFRACTIVA

Promotor del Estudio: Ministerio de Sanidad, Fondo de Investigación Sanitaria, PI10/01842

Responsables del Estudio: Dr. Miguel J. Maldonado López, Tf. 983 18 35 34; Fax 983-18 47 62

Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra: IOBA

Yo, (nombre y apellidos):

He leído la Hoja de Información que se me ha entregado, he podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con, (nombre y apellidos del Facultativo):

Dr. Miguel J. Maldonado López y Dra. Luisa Giraldo Agudelo

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera , sin tener que dar explicaciones, sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma del paciente (o representante legal, en caso de un menor):	Firma del facultativo:
Nombre:	Nombre: Dr. Miguel J. Maldonado López
Fecha:	Fecha:

Copia para el Responsable del Estudio

CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO DE LOS MEDIADORES INFLAMATORIOS EN LA FOTOFobia DURANTE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL POST CIRUGÍA REFRACTIVA

Promotor del Estudio: Ministerio de Sanidad, Fondo de Investigación Sanitaria, PI10/01842

Responsables del Estudio: Dr. Miguel J. Maldonado López, Tf. 983 18 35 34; Fax 983-18 47 62

Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Pº de Belén 17; 47011 Valladolid

Centro donde se realiza la recogida de muestra: IOBA

Yo, (nombre y apellidos):

He leído la Hoja de Información que se me ha entregado, he podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con, (nombre y apellidos del Facultativo):

Dr. Miguel J. Maldonado López y Dra. Luisa Giraldo Agudelo

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio cuando quiera , sin tener que dar explicaciones, sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma del paciente (o representante legal, en caso de un menor):	Firma del facultativo:
Nombre:	Nombre: Dr. Miguel J. Maldonado López
Fecha:	Fecha:

Copia para el Centro

II. Encuesta OSDI



UNIVERSIDAD de VALLADOLID

Nombre y apellidos: _____ N° Historia _____

Cuestionario sobre la discapacidad de la superficie ocular

(versión española homologada del "Ocular Surface Disease Index" –OSDI-)

Por favor, conteste a las siguientes preguntas marcando con una cruz (X) la casilla que mejor describa su respuesta

¿Ha experimentado algunos de los siguientes síntomas durante la pasada semana?

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)
1. Ojos sensibles a la luz					
2. Sensación de tener arena en los ojos					
3. Ojos doloridos (dolor/escozor)					
4. Visión Borrosa					
5. Mala Visión					

¿Los problemas con sus ojos le han limitado a la hora de realizar alguna de las siguientes actividades durante la pasada semana?

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)	No procede
6. Lectura.						
7. Conducir de noche						
8. Usar un ordenador o un cajero automático						
9. Ver la televisión						

¿Ha sentido molestias en los ojos en alguna de las siguientes situaciones, durante la pasada semana?

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)	No procede
10. Cuando hacía viento						
11. En lugares con una humedad baja (muy secos)						
12. En lugares con aire acondicionado						

SEÑALE CON UNA X EL OJO QUE PRESENTA MÁS SINTOMAS:

OJO DERECHO OJO IZQUIERDO AMBOS OJOS

Ocular Surface Disease Index[®] (OSDI[®])²

Ask your patient the following 12 questions, and circle the number in the box that best represents each answer. Then, fill in boxes A, B, C, D, and E according to the instructions beside each.

HAVE YOU EXPERIENCED ANY OF THE FOLLOWING DURING THE LAST WEEK:

	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time
1. Eyes that are sensitive to light?	4	3	2	1	0
2. Eyes that feel gritty?	4	3	2	1	0
3. Painful or sore eyes?	4	3	2	1	0
4. Blurred vision?	4	3	2	1	0
5. Poor vision?	4	3	2	1	0

Subtotal score for answers 1 to 5

HAVE PROBLEMS WITH YOUR EYES LIMITED YOU IN PERFORMING ANY OF THE FOLLOWING DURING THE LAST WEEK:

	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time	
6. Reading?	4	3	2	1	0	N/A
7. Driving at night?	4	3	2	1	0	N/A
8. Working with a computer or bank machine (ATM)?	4	3	2	1	0	N/A
9. Watching TV?	4	3	2	1	0	N/A

Subtotal score for answers 6 to 9

HAVE YOUR EYES FELT UNCOMFORTABLE IN ANY OF THE FOLLOWING SITUATIONS DURING THE LAST WEEK:

	All of the time	Most of the time	Half of the time	Some of the time	None of the time	
10. Windy conditions?	4	3	2	1	0	N/A
11. Places or areas with low humidity (very dry)?	4	3	2	1	0	N/A
12. Areas that are air conditioned?	4	3	2	1	0	N/A

Subtotal score for answers 10 to 12

ADD SUBTOTALS A, B, AND C TO OBTAIN D
(D = SUM OF SCORES FOR ALL QUESTIONS ANSWERED)

TOTAL NUMBER OF QUESTIONS ANSWERED
(DO NOT INCLUDE QUESTIONS ANSWERED N/A)

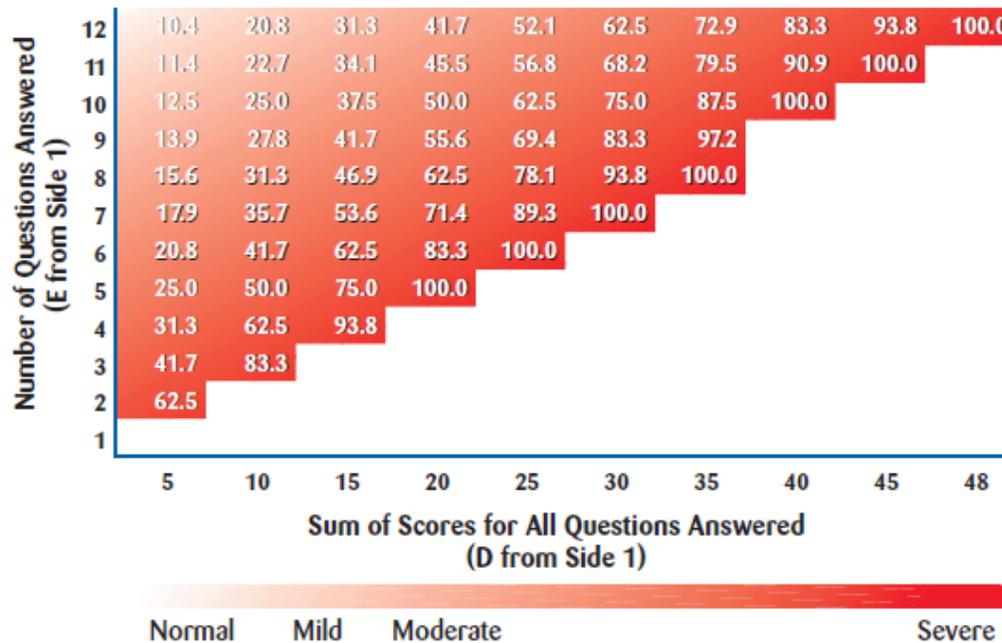
Please turn over the questionnaire to calculate the patient's final OSDI[®] score.

Evaluating the OSDI[®] Score¹

The OSDI[®] is assessed on a scale of 0 to 100, with higher scores representing greater disability. The index demonstrates sensitivity and specificity in distinguishing between normal subjects and patients with dry eye disease. The OSDI[®] is a valid and reliable instrument for measuring dry eye disease severity (normal, mild to moderate, and severe) and effect on vision-related function.

Assessing Your Patient's Dry Eye Disease^{1,2}

Use your answers **D** and **E** from Side 1 to compare the sum of scores for all questions answered (**D**) and the number of questions answered (**E**) with the chart below.* Find where your patient's score would fall. Match the corresponding shade of red to the key below to determine whether your patient's score indicates normal, mild, moderate, or severe dry eye disease.



*Values to determine dry eye disease severity calculated using the OSDI[®] formula:

$$\text{OSDI}^{\text{®}} = \frac{(\text{sum of scores}) \times 25}{(\# \text{ of questions answered})}$$

Patient's Name: _____ Date: _____

How long has the patient experienced dry eye? _____

Eye Care Professional's Comments: _____

Tear and place in patient's chart for follow-up care on next visit.

Reference: 1. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:615-621. 2. Data on file, Allergan, Inc.

ALLERGAN **INSPIRE**

©2004 Allergan, Inc., Irvine, CA 92612 Re-order: 4941843

III. Escala visual análoga para fotofobia

ESCALA ANALOGA PARA FOTOFOBIA POST CIRUGÍA REFRACTIVA

EN SUPERFICIE OCULAR

	Sin fotofobia (0)	Leve (1 - 3)	Moderada (4 - 7)	Severa (8 - 10)
24 HORAS				
48 HORAS				
72 HORAS				

IV. Encuesta para valoración cuantitativa global de fotofobia a las 72 horas post ASA

ESCALA PARA VALORACIÓN DE FOTOFOBIA POST CIRUGÍA REFRACTIVA EN SUPERFICIE OCULAR

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	Mitad del tiempo (2)	A veces (1)	Nunca (0)	No procede
¿Se siente deslumbrado o molesto por la luz en una habitación?						
¿Se siente deslumbrado o molesto por la luz en exteriores?						
¿Necesita cerrar los ojos ante la luz en una habitación?						
¿Necesita cerrar los ojos ante la luz en exteriores?						
¿Necesita utilizar gafas oscuras en una habitación?						
¿Necesita utilizar gafas oscuras en exteriores?						
¿Prefiere permanecer en una habitación oscura?						
¿Prefiere permanecer en habitación con luz tenue?						
¿Se siente cómodo en una habitación bien iluminada?						
¿Tiene sensación de visión borrosa exacerbado por la luz?						
¿Tiene lagrimeo asociado a la exposición a la luz?						
¿Tiene dolor ocular asociado a la exposición a la luz?						
¿Tiene cefalea asociado a la exposición a la luz?						
¿Tolera la luz del ordenador, teléfono móvil, otros dispositivos electrónicos?						
¿Tolera la luz del televisor?						