

Marisa
Tesón Yudego



Universidad de Valladolid

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
INSTITUTO DE OFTAMOBIOLOGIA APLICADA



Influencia de los Factores Ambientales
en los Tests Diagnósticos del Síndrome de Ojo Seco:
Estudio en una Cámara de Ambiente Controlado

Tesis Doctoral
2013

Influencia de los Factores Ambientales en los Tests Diagnósticos del Síndrome de Ojo Seco: Estudio en una Cámara de Ambiente Controlado



Marisa Tesón Yudego
Tesis Doctoral 2013



Universidad de Valladolid

TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN LOS TESTS DIAGNÓSTICOS DEL SÍNDROME DE OJO SECO: ESTUDIO EN UNA CÁMARA DE AMBIENTE CONTROLADO

*(Influence of environmental factors on the diagnostic tests of dry
eye syndrome: study in a controlled environmental chamber)*

Presentada por **MARÍA LUISA TESÓN YUDEGO** para optar al
grado de Doctora por la Universidad de Valladolid.

Dirigida por:

Dra. MARGARITA CALONGE CANO

Dra. MARÍA JESÚS GONZÁLEZ GARCÍA



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

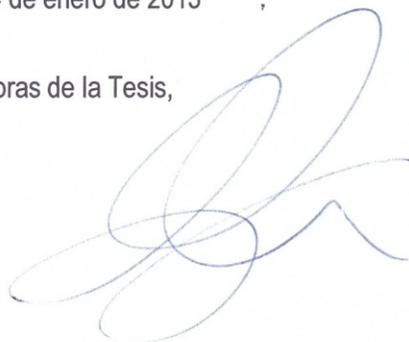
Dra. **MARGARITA CALONGE CANO**, con D.N.I. nº **09255952 – Q**, Catedrática del departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia y la Dra. **MARÍA JESÚS GONZÁLEZ GARCÍA**, CON D.N.I. nº **50448525 – A**, profesor Contratado Doctor del Departamento de Física Teórica, Atómica y Óptica, como Directoras de la Tesis Doctoral titulada “Influencia de los factores ambientales en los test diagnósticos del Síndrome de Ojo Seco: estudio en una cámara de ambiente controlado” presentada por Dña. **MARÍA LUISA TESÓN YUDEGO**, alumna del programa de Doctorado en Ciencias de la Visión, impartido por el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada – IOBA de la Universidad de Valladolid autoriza la presentación de la misma, considerando que es APTA para su defensa.

Valladolid, 24 de enero de 2013

Las Directoras de la Tesis,



Fdo.: Dra. Margarita Calonge Cano



Fdo.: Dra. María Jesús González García

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

CERTIFICADO DE ESTANCIA EN UNA INSTITUCIÓN EXTRANJERA
CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION

1. Becario/ Applicant:
Nombre y apellidos/ Name: MARÍA LUISA TESÓN YUDEGO
D.N.I./ National identity Card: 12411066 - J
Centro de aplicación de la beca/ Home Institución: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA – IOBA, UNIVERSIDAD DE VALLADOLID.
2. Centro en el que se ha realizado la estancia/ Host institution:
Nombre/ Name: LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO EM OPTOMETRIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL – CEORLab. CENTRO DE FÍSICA, UNIVERSIDADE DO MINHO, BRAGA, Portugal.
Dirección/ Adress: CAMPUS DE GUALTAR
Localidad/ Country: BRAGA, PORTUGAL.
3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Responsible person in the Host
Institución/ Institution: CENTRO DE FÍSICA, UNIVERSIDADE DO MINHO, BRAGA, Portugal.
Nombre/ Name: MIKHAIL VASILEVSKIY
Cargo/ Post: DIRECTOR DEL CENTRO DE FÍSICA DE LA UNIVERSIDADE DO MINHO, BRAGA, Portugal.
CERTIFICO: que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas: desde 19 /03 /2012 hasta 16 /06/2012
THIS IS TO CERTIFY: that the above mentioned person has performed a stay in this Institution in the following dates: From: ____/____/____ To: ____/____/____
Lugar y fecha: BRAGA, 16 de Junio de 2012 City and date:
Firma y Sello/ Signature & Stamp


AGRADECIMIENTOS

Ahora soy verdaderamente consciente de que estoy ante las palabras más difíciles que he tenido que escribir en toda la tesis (¡qué razón tenías, Laura!); sin embargo, las considero también las más necesarias y sin las que todo lo que viene detrás carecería de esencia y de piel.

Hace unos días tuve la oportunidad de leer un artículo titulado *“Investigadores: entre el tesón y la creatividad”*, en el que hacían referencia a un ensayo publicado hace ya más de una década por Francisco Ponz, rector de la Universidad de Navarra entre 1966 y 1979, titulado *“¿Para qué sirve un doctorado?”*. En aquél ensayo aseguraba que *“durante la realización de una investigación se cultiva el amor a la verdad y, en su servicio, se ejercita la mente, se espolea la creatividad y se pone a prueba el tesón”*. Decía también que con la investigación *“se aprende a reflexionar, al pensar sereno y profundo, a relacionar conocimientos, a examinar las cuestiones desde distintas perspectivas”*. Y añadía: *“No se desea conocer para disparar respuestas ante las preguntas de un examen o de un concurso de televisión, sino para asimilar los conocimientos y usarlos con buen sentido”*. Ahora que estoy al final de éste maravilloso y duro camino, no podría encontrar palabras que expresaran mejor lo que ha supuesto para mí, tanto a nivel intelectual como personal recorrerlo y haber llegado hasta aquí.

La Real Academia Española define el tesón como *“decisión y perseverancia que se ponen en la ejecución de algo”*, y su lista interminable de sinónimos engloba palabras como: firmeza, constancia, perseverancia, empuje, tenacidad, empeño, paciencia, ahínco, valentía, afán, esfuerzo, desvelo, dinamismo, interés, voluntad, dedicación o constancia. Siempre he puesto mucho “Tesón” en todos los aspectos de mi vida y me siento especialmente orgullosa por ser así y por tener un apellido con tanta fuerza (¡gracias, papá!).

Tal y como describe Francisco Ponz, durante este viaje no sólo he cultivado el amor a la verdad, el servicio a los demás, la creatividad y el ejercicio de mi mente, sino que

he puesto a prueba mi tesón, y sé que sin él no habría llegado hasta aquí...pero el mayor valor y aprendizaje me lo han dado todas y cada una de aquellas personas que me han rodeado y acompañado durante este viaje de más de cuatro años... Son esas personas que han caminado día a día a mi lado, haciéndome avanzar cuando ya no me quedaban fuerzas, ayudándome a conocerme a mi misma y animándome a seguir adelante. Son esas personas que se preocupan por ti, que te aguantan lo inaguantable y te perdonan lo imperdonable, que celebran contigo llegar al final de cada uno de los pasitos que das y están a tu lado haciendo el tonto para sacarte una sonrisa cuando el día no ha sido el mejor de la semana... TODAS y cada una de ellas me han enseñado algo. TODAS y cada una de ellas me han hecho crecer como investigadora pero especialmente como persona. A TODAS ELLAS GRACIAS.

No me gustaría olvidarme de nadie pero ya me conocéis y sabéis que soy un poco despistada, por eso pido disculpas de corazón si olvido a alguien. ¡Prepararos porque va a ser largo!

No podría empezar por nadie que no fuera mi directora Marga, por todo su cariño, confianza e inagotable paciencia. Por enseñarme a no ponerme límites y a confiar en mí misma. Por haberme dejado formar parte de ese gran grupo llamado GSO, del que ella, sin ninguna duda, es el alma. Por mostrarme que la investigación y la vida son un constante descubrimiento, y por creer en mí. GRACIAS.

A mi directora María, por haber sido la antecesora en este mundo del "ambiente controlado" y especialmente por brindarme la oportunidad, hace ya más de seis años, de formar parte de este maravilloso mundo de la investigación que me ha permitido cumplir este sueño. GRACIAS.

A José Manuel, por haberme hecho sentir como en casa, por toda su dedicación y tiempo regalado, incluso sin tenerlo... por su confianza, sus consejos y todas sus enseñanzas, por todo lo que aprendí, por darme la oportunidad de vivir una experiencia profesional y personal inolvidable pero, sobre todo, por enseñarme con su ejemplo el valor de la humildad y que no importa dónde estés mientras seas tú mismo y pongas en todo lo que haces el corazón. GRACIAS.

Al Dr. Michael E. Stern, por su confianza, cariño y apoyo, por tener siempre una sonrisa para mí junto a una inconmesurable paciencia con mi “spanghish”... y por ver más allá de mí profesionalmente de lo que siempre han visto mis ojos. GRACIAS.

Este viaje no hubiera sido posible sin alguien muy especial y valioso, tanto humana como profesionalmente. Me estoy refiriendo a Alberto López Miguel, esa gran persona que ha vivido a mi lado en una cámara durante dos años velando porque todo fuera bien. Él no sólo ha sido un compañero ya desde la carrera, sino mi segunda mano derecha porque yo tan sólo tengo dos y no me hubiera llegado sólo con las mías, pero sobre todo, porque ha sido y siempre será un gran amigo. Por todas las experiencias vividas juntos, desde nuestros cafés y charlas sentados en el suelo muertos de frío esperando a oír pitar el “*timer*”, hasta las incontables horas trabajando delante del ordenador mano a mano para hacer de esta tesis una realidad, sin olvidar momentos estelares como el titulado ¡achicando agua! Estar ahora mismo aquí no hubiera sido posible sin toda tu ayuda. De todo corazón, GRACIAS.

¡Y qué decir de ese canario con “acento raro y tan salao”, como decían nuestros pacientes, llamado Vicente, que bajaba siempre a la carrera para ser mi segunda mano izquierda! Muchísimas gracias por toda tu ayuda, ¡desde el capilar de 4 μ l hasta “¡pon parafilm, quita parafilm!”, pero sobre todo, por esas risas, esa alegría que no tiene parangón y esos buenos ratos que nos has hecho pasar tanto a los pacientes como a Alberto y a mí, que conseguían que a todas las horas nos parecieran más cortas y que el cansancio no pesara tanto. GRACIAS.

Mención especial merecen Amalia, que con mucha paciencia ha sido mi maestra en el maravilloso y complejo mundo de las citoquinas y hasta ha conseguido que aprendiera algo acerca de ellas y M. Jesús de Benito, por ese verano robado (perdóname) encerradas en el laboratorio común con nuestro amigo Luminex. Por ese catarro veraniego compartido y esos ensayos de dos en dos que sólo alguien con tanto amor por hacer las cosas bien sería capaz de hacer. GRACIAS.

Y por supuesto, quiero dar las gracias a cada una de aquellas personas que han colaborado voluntaria y desinteresadamente en esta investigación y sin los cuáles nada de esto tendría sentido. GRACIAS.

Hace ya más de seis años que llegué al IOBA. Por aquél entonces, yo era “esa chica nueva que es no sé qué de optometrista que está en un cuartito del sótano”. Doy GRACIAS porque la vida, el destino, el karma o como cada uno quiera llamarlo, me hiciera llegar a ese cuartito donde me encontré a una de las mejores personas que he conocido en mi vida, tanto profesional como personalmente...Jenice. GRACIAS por haberme acogido con los brazos abiertos, GRACIAS por todo lo que hemos vivido juntas, GRACIAS por cada “¡madrina!” de Natalia que hace que se me ilumine la cara, GRACIAS por ser mi amiga.

De vez en cuando subía arriba y recorría aquél largo pasillo en dirección al baño, leyendo los posters que colgaban de sus paredes llenos de investigación, que yo curioseaba. Por allí estaban ya los primeros miembros del “capital no humano”, Carmen, la reina del laboratorio, Antonio, su rey, Laura, nuestra Doc y Mario, el invasor de la plaza del garaje (¡no olvides que los impares me toca a mí!). Con el traslado al nuevo edificio tuve el privilegio de cambiar aquél cuartito acogedor al final de un pasillo y del que salía casi siempre a oscuras y llena de miedo, iluminada tan sólo por la luz del móvil, por una sala inmensa y una vista maravillosa que inspiraba paz cuando descansabas la vista en ella. Poco a poco fueron llegando más miembros a esta familia de “los pequeños” que llenaron los rincones de la que siempre sentiré como “nuestra biblioteca”: esas “supernenas” que trabajan con unas células que dicen “que siembran y cultivan” y unos conejillos muy simpáticos a los que una vez incluso saqué lágrima. Estoy hablando de Ana, que se turnaba conmigo para decir hasta mañana a la biblioteca, Sarita, que es un ejemplo a seguir en lo que ella y yo sabemos (y te seguiré, seguro) y Marina, que en los cuatro años que llevo “corriendo de un lado para otro” me ha infundido cada día y sin saberlo una pizca de serenidad, haciendo sin querer que corriera un poco menos. No me olvido de su capitana Teresa, que aunque oficialmente no forme parte de “los pequeños” es miembro honorífico de este loco club.

A este “casi sólo chicas”, fueron llegando poco a poco nuevos miembros, ¡algunos incluso de mi misma especie! ese super José, que siempre me arrancaba una sonrisa cuando de repente me hacía un “dile que no”; el increíble Toni, nuestro hombre “híbrido”, capaz de darte el mejor consejo del mundo mientras te soluciona tu quebradero de cabeza con una gráfica en un “plis plás”. Como olvidarme de nuestras Lauras, cada una de ellas con su encanto particular, de Isa y su maravillosa música, de Amar y sus espectaculares buffets o a todos aquellos que pasaron, “me tocaron” y dejaron en mí su huella: Pibito, Ceci, Eva y Paola, Miguel, Rolando y Marco, Erma y Verónica,... Y no, por supuesto que no me he olvidado del corazón de toda esta “tribu de los brady”, ¡nuestra M. Paz!, a la que traemos de cabeza cada día con papeles, sellos, firmas, consejos y yo especialmente con “nuestra OKI”, y pese a todo siempre está ahí para todos con una sonrisa y un “¡venga, va, pero por ser tú! M.Paz, no hay dos como tú, ¡vales un potosí! GRACIAS.

Todos y cada uno de ellos han sido mis compañeros de viaje pero, por encima de todo, mis amigos. Por haber estado ahí siempre, por esos cafés llenos de risas, esas comidas llenas de bromas que hacen que por mi cabeza en este momento pasen millones de anécdotas y me hagan sonreír, por esas carcajadas repentinas en medio de la biblioteca una tarde cualquiera, por esas cañas, por esas comidas nutritivas en el Mc.Donald's, por esas fiestas temáticas, por esas barbacoas, por esas casas rurales...habéis sido lo mejor de este viaje. GRACIAS.

Una de las mejores experiencias para mí, tanto a nivel académico como personal, ha sido sin duda mi estancia en el CEORLab, en la Universidade do Minho, durante la que he tenido la tremenda suerte de compartir tres meses no sólo con grandes profesionales, sino con grandes personas. J. Manuel, un ejemplo a todos los niveles, Sofía, con su serenidad, Queirós y sus clases de SPSS a una tal “*luisiña*” que no conozco ;o), Paulo y sus maravillosos conciertos, Jorge Jorge y sus clases de cultura portuguesa que tanto me han enseñado, Miguel y sus impresionantes ideas y aplicaciones de móvil, Daniella y toda la ayuda para paliar mis desastres, desde la pomada para la “melga” hasta la pantalla para el ordenador... GRACIAS por haberme permitido formar parte del CEORLab y haber hecho de esos tres meses una de las

experiencias más enriquecedoras de mi vida. Por supuesto, que no me olvido del resto de miembros “satélite” de este maravilloso equipo, ¡Elena y Nery, sois extraordinarias! GRACIAS por todas las experiencias que hemos compartido. GRACIAS por ser como sois. GRACIAS.

Pero sin duda alguna, si ha habido alguien especial en esa experiencia, esa es Helena. No hay GRACIAS en el universo suficientes para ti y tu familia. ¡Eres excepcional! Doy GRACIAS a la vida por haberme dado esa segunda oportunidad de encontrarte y conocerte. GRACIAS de corazón por haberme dado tanto calor, por darme una familia cuando tenía la mía lejos, por darme tu amistad cuando más necesitaba una amiga. GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS.

¡A David!, mi diseñador gráfico particular, sin el que no habría podido crear una envoltura tan maravillosa y que me ha sacado de tantos “atascos” con un “clic” y una sonrisa aunque fueran las tantas de la mañana. GRACIAS por toda tu ayuda, por todo tu tiempo, por todos tus consejos, por haber querido formar parte de esto y sobre todo, por esa gran calidad humana que tienes que hace que como amigo no tengas precio. GRACIAS.

GRACIAS a todos los miembros que forman parte del COOCYL, especialmente a M. Eugenia y Laura (mis mamis) por cuidarme tanto, a Nacho, Inma, Cosme, Lázaro (formamos un gran equipo), Luís Ángel y Alberto. GRACIAS.

Hay tantas personas a las que me gustaría seguir dando las gracias,... GRACIAS a todo el personal del IOBA porque de una forma u otra, todos han contribuido a que llegue al final de este camino. GRACIAS a Yolanda y a Chema por toda su ayuda y consejos. GRACIAS a Maru y a Itziar por su infinita paciencia y su ingente trabajo. GRACIAS a Begoña, por haberme ayudado y tendido una mano siempre. GRACIAS a Charlie, por aguantar toda la guerra que le he dado. GRACIAS a Lourdes, por sus clases de step y su saber hacer con tanto papel que te vuelve loca. GRACIAS a Paco por sus consejos, su ayuda y su buen hacer, y al resto del grupo con esos cafés que me han hecho descubrir tantas cosas, especialmente de mí misma. GRACIAS a todas

las “secres”, por su paciencia conmigo, las historias y el OMI. GRACIAS a José, Sergi y Didac por permitirme colaborar con ellos durante estos años. GRACIAS.

GRACIAS a mis amigos de siempre (Javi, Maribel, Julián y todos los demás), por haber estado ahí de una forma u otra y, muy especialmente a mi familia de Aranda y a Inma, Montse y Pedro. GRACIAS a José Antonio, por nuestras cartas y nuestros ciclos (nos lleven a donde nos lleven). GRACIAS.

GRACIAS a todos los que se han compartido conmigo alguna parte de esta etapa de mi vida y me han cogido de la mano en algún momento para no dejarme caer; muy especialmente a Ángel y Virginia y esa alegría que es Emma, a las “dañinas” y sus respectivos “dañinos”, a la panda “frikí” (Rebe, Vane, Silvi y Cesar), a Sergio (y a sus padres), por ayudarme a luchar por esto durante tres años porque esto no lo pude hacer mejor, a Fernando por nuestros pingüinos y nuestras piedras, a Alex por su amistad y porque la confianza que me dan sus manos y su cariño hacia Iris no tiene precio, a Germán por “ser Germán” y muy especialmente ¡a mi Leti! por lo que me has tenido que aguantar y por nuestra sincronía cósmica. GRACIAS.

Antes de llegar a lo más importante, he de cumplir una promesa, y la cumplo desde el corazón. GRACIAS a Cadena 100, por haberme acompañado a diario durante todos estos años, especialmente durante esas noches de trabajo, por esas canciones que te hacen desde soñar hasta entender una realidad, pero muy especialmente, GRACIAS por darme la oportunidad de decirle a ANA que es el apoyo más “mágico” que alguien puede tener y que, sin ella, yo no estaría completa. GRACIAS.

GRACIAS a toda mi familia, (Pilar y Alicia, ¡sabéis que vais en éste pack!), y en especial a mi tía Marisa por todo su calor y apoyo, y a aquellos que sé que de una forma u otra son mis ángeles de la guarda. GRACIAS.

GRACIAS a mi hermana Esther, porque pese a la distancia física que nos separa, siempre ha estado a mi lado ¡y es una titánica hermana mayor! GRACIAS a Alfonso, porque junto a ella me habéis regalado esos dos tesoritos que son Mario y Sara. GRACIAS.

GRACIAS a mi hermana Ana, por ser lo más extraordinario que me ha regalado la vida (∞∞∞∞∞∞∞∞∞∞∞∞∞∞, empate, ¿vale?). GRACIAS a Julio, por entender y respetar un vínculo tan especial y porque sus silencios y sus sonrisas valen más que mil palabras. GRACIAS.

GRACIAS a Iris, por su amor incondicional, por ser mi alegría al despertarme cada mañana y mi mejor motivo para llegar a casa.

Por último, y lo más importante, GRACIAS A MIS PAPIS, porque soy como soy por lo que me habéis dado, por lo que me habéis enseñado, por haber sido mi ejemplo en la vida. Porque si estoy hoy aquí, es ¡GRACIAS A VOSOTROS!. GRACIAS por enseñarme a caminar sola, por dejarme elegir mi propio camino y por apoyarme en todos los pasos que he dado en mi vida, y especialmente, por ese sentimiento que sólo pueden hacerte sentir los padres,.... estar justo detrás de ti a cada paso para levantarte si te caes, darte un beso que te cura las heridas y hacerte caminar de nuevo. OS QUIERO.

A todos, GRACIAS.

Never be satisfied with what you achieve, because it all pales in comparison with what you are capable of doing in the future.

(Rabbi Nochem Kaplan)

FILOSOFIA DO SUCESSO

Se acreditas que estás derrotado, é que o estás.

Se acreditas que não, não o estarás.

Se gostas de ganhar, mas acreditas que não podes,

É quase seguro que não ganharás.

Se acreditas que estás perdido, estás perdido

pois no mundo encontrarás

que o éxito inicia-se na vontade

e que tudo é um estado mental.

Se acreditas na tua inferioridade, assim será.

Terás que pensar alto para prosperar

e terás que estar seguro de ti

antes que possas um premio ganhar.

As batalhas da vida

não são ganhas pelo homem mais rápido ou mais forte

e sim, mais cedo ou mais tarde, o homem que gana

é aquele que **PENSA GANHAR.**

Napoleón Hill

A mis papis y hermanas.

CONTENIDOS

Lista de abreviaturas / Abreviations	1
Financiación	5
Divulgación científica	9
Organización de la tesis	17
Summary	
Organization of the Doctoral Thesis	21
Introduction	23
Hypotheses	27
Objectives	29
Comparative analysis between studies I and II	31
Study III. Justification Model	49
Conclusions	61
Introducción	
I. El Síndrome de Ojo Seco (SOS)	67
II. Factores ambientales y SOS	93
III. Cámaras de Ambiente Controlado (CAC)	107
Justificación	117
Hipótesis	123
Objetivos	127
Metodología	131
Resultados	
ESTUDIO I. Validación del modelo de exposición ambiental	183
ESTUDIO II. Mejora del modelo de exposición ambiental	209
Análisis comparativo entre el Estudio I y II	237
ESTUDIO III. Justificación del modelo de exposición ambiental	257

Discusión	267
Conclusiones	299
Líneas futuras de investigación	305
Bibliografía	309
Anexos	359

ANEXOS

ANEXO I. Consentimiento informado CERLab 001. Estudio I	359
ANEXO II. Consentimiento informado CERLab 001. Estudio II	373
ANEXO III. Consentimiento informado. Estudio III	387
ANEXO IV. Anamnesis	389
ANEXO V. Cuestionario OSDI, versión en inglés	393
ANEXO VI. Cuestionario OSDI, versión homologada en español	395
ANEXO VII. Cuestionario SIDEQ modificado	397
ANEXO VIII. Cuestionario OSDI traducido al portugués	399
ANEXO IX. Cuestionario SIDEQ modificado traducido al portugués	401

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cámaras de ambiente controlado (CAC)	108
TABLA 2. Resumen de los criterios de inclusión de los participantes en los estudios I, II y III	137
TABLA 3. Puntuación asignada a cada una de las respuestas del test OSDI®	139
TABLA 4. Clasificación del grado de SOS según la puntuación del índice OSDI®	140
TABLA 5. Cuestionario de sintomatología de SOS: SIDEQ	141
TABLA 6. Concentraciones mínimas detectables para cada una de las 16 moléculas analizadas	147
TABLA 7. Magnitud de la concordancia del coeficiente de correlación intraclass (ICC) y del índice kappa ponderado	178
TABLA 8. Distribución en edad y sexo de los participantes del estudio I	183
TABLA 9. Resultados de la visita de inclusión (V0) de los grupos del estudio I	184
TABLA 10. Resultados de los tests clínicos. Estudio I	189
TABLA 11. Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima. Estudio I	199
TABLA 12. Niveles de las moléculas detectadas en la lágrima en un porcentaje mayor al 30%. Estudio I	205
TABLA 13. Distribución en edad y sexo de los participantes del estudio II	210
TABLA 14. Resultados de la visita de inclusión (V0) de los grupos del estudio II	210
TABLA 15. Resultados de los tests clínicos. Estudio II	215
TABLA 16. Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima. Estudio II	255

TABLA 17. Niveles de las moléculas detectadas en la lágrima en un porcentaje mayor al 30%. Estudio II	233
TABLA 18. Distribución en edad y sexo de los participantes del análisis comparativo entre los estudios I y II	238
TABLA 19. Resultados de la visita de inclusión (V0) de los participantes del análisis comparativo entre el Estudio I y II	238
TABLA 20. Resultados de los tests clínicos del análisis comparativo entre los estudios I y II	245
TABLA 21. Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima. Estudio I y II. Análisis comparativo	249
TABLA 22. Niveles de las moléculas detectadas en la lágrima en un porcentaje mayor al 30%. Estudio I y II. Análisis comparativo	253
TABLA 23. Coeficiente de correlación intraclase (ICC) de las variables cualitativas de los tests diagnósticos de Valladolid	258
TABLA 24. Coeficiente kappa de las variables ordinales de los tests diagnósticos de Valladolid	258
TABLA 25. Coeficiente de correlación intraclase de las variables Cualitativas de los tests diagnósticos de Braga	259
TABLA 26. Coeficiente kappa de las variables ordinales de los tests diagnósticos de Braga	259
TABLA 27. Valores de temperatura y RH en Valladolid y Braga durante las visitas, clasificadas por la RH ambiental externa	260
TABLA 28. Valores medios de temperatura y RH en Valladolid y Braga	261
TABLA 29. Resultados de los tests clínicos en Valladolid y Braga	263

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Unidad Funcional Lagrimal (LFU)	73
FIGURA 2. Principales causas etiológicas del SOS	74
FIGURA 3. Esquema para la clasificación de la gravedad del SOS	90
FIGURA 4. Escala gráfica de la hiperemia conjuntival bulbar (escala Efron).....	144
FIGURA 5. Escala gráfica de Oxford para la evaluación de la tinción corneal y conjuntival	149
FIGURA 6. Escala de Baylor para la evaluación de la tinción corneal.....	150
FIGURA 7. Esquema de la CAC - CERLab	154
FIGURA 8. Imágenes del exterior de la CAC - CERLab	154
FIGURA 9. Panel de la CAC para el control de las condiciones ambientales	155
FIGURA 10. Imágenes del interior de la sala de exposición de CERLab	156
FIGURA 11. Imágenes del equipamiento de la sala de evaluación de CERLab	158
FIGURA 12. Esquema del procedimiento de los estudios I y II	165
FIGURA 13. Esquema del procedimiento del estudio III	175
FIGURA 14A. Resultados de los tests clínicos: SIDEQ (media), osmolaridad lagrimal y PRTT. Estudio I.	191
FIGURA 14B. Resultados de los tests clínicos: test de Schirmer, hiperemia conjuntival media (escala Oxford) y T-BUT. Estudio I.	192
FIGURA 14C. Resultados de los tests clínicos: tinción corneal y tinción conjuntival media (escala Oxford). Estudio I.	193
FIGURA 15. Esquema de las áreas de tinción corneal con escala de Baylor modificada que han presentado diferencias entre la valoración pre- y post- exposición para cada uno de los grupos del estudio I	194

FIGURA 16. Imágenes de tinción corneal de los sujetos del estudio I	195
FIGURA 17A. Variación de los niveles de EGF e IL-1Ra en lágrima durante el estudio I.	201
FIGURA 17B. Variación de los niveles de IL-6 y MMP-9 en lágrima durante el estudio I	203
FIGURA 18A. Resultados de los tests clínicos: SIDEQ (media), osmolaridad lagrimal y PRTT. Estudio II.	217
FIGURA 18B. Resultados de los tests clínicos: test de Schirmer, hiperemia conjuntival media (escala Oxford) y T-BUT. Estudio II.	218
FIGURA 18C. Resultados de los tests clínicos: tinción corneal y tinción conjuntival media (escala Oxford). Estudio II.	219
FIGURA 19. Esquema de las áreas de tinción corneal con escala de Baylor modificada que han presentado diferencias entre la valoración pre- y post- exposición para cada uno de los grupos del estudio II	220
FIGURA 20. Imágenes de tinción corneal de los sujetos del estudio II	221
FIGURA 21A. Variación de los niveles de EGF e IL-1Ra en lágrima durante el estudio II	227
FIGURA 21B. Variación de los niveles de IL-6 e IL-8 en lágrima durante el estudio II	229
FIGURA 21C. Variación de los niveles de RANTES y MMP-9 en lágrima durante el estudio II	231
FIGURA 22A. Resultados de los tests clínicos: SIDEQ (media), osmolaridad lagrimal y PRTT. Análisis comparativo entre los estudios I y II	242
FIGURA 22B. Resultados de los tests clínicos: test de Schirmer, hiperemia conjuntival media (escala Oxford) y T-BUT. Análisis comparativo entre los estudios I y II	243

FIGURA 22C. Resultados de los tests clínicos: tinción corneal y tinción conjuntival media (escala Oxford).
Análisis comparativo entre los estudios I y II244

FIGURA 23. Esquema de las áreas de tinción corneal con escala de Baylor modificada que han presentado diferencias entre la valoración pre- y post-exposición para cada uno de los grupos entre el estudio I y II247

FIGURA 24. Moléculas en lágrima que mostraron cambios significativos en el análisis comparativo entre el estudio I y II251

FIGURA 25. Gráfico de cajas del estudio comparativo entre Valladolid (España) y Braga (Portugal)261

LISTA DE ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

Se han utilizado mayoritariamente las abreviaturas derivadas de la terminología inglesa, para mantener la correspondencia con los términos utilizados en los artículos científicos publicados.

CAC (*Controlled environmental chamber*): cámara de ambiente controlado.

CCL5/RANTES (*regulated and normal T cell expressed and secreted*): factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas.

CEORLab (*Clinical and Experimental Optometry Research Laboratory*): Laboratorio de Investigación en Optometría Clínica y Experimental en Braga, Portugal.

CX3CL1/Fractalquina (*fractalkine*): fractalquina.

DED (*dry eye disease*): síndrome de ojo seco.

DEWS (*International Dry Eye WorkShop*): taller internacional sobre ojo seco.

EEM (*standard error of the mean*): error estándar de la media.

EGF (*epidermal growth factor*): factor de crecimiento epidérmico.

FDA (*Food and Drug Administration*): agencia de alimentos y medicamentos.

ICC (*intraclass correlation coefficient*): coeficiente de correlación intraclass.

IFN- γ (*interferon-gamma*): interferon gamma.

IL (*interleukin*): interleucina o interleuquina.

IOBA – CERLab (*IOBA – Controlled Environment Research Laboratory*): IOBA
- Laboratorio de Investigación de Ambiente Controlado en Valladolid, España.

LFU (*lacrima functional unit*): unidad funcional lagrimal.

LH (*low humidity condition*): condición de baja humedad.

LHP (*low humidity and pressure condition*): condición de baja humedad y baja presión.

LoA (*limits of agreement*): límites de acuerdo.

m (*meters*): metros.

MMP-9 (*metalloproteinase-9*): metaloproteínasa – 9.

n (*sample size*): tamaño muestral.

NEI (*National Eye Institute*): Instituto Nacional del Ojo.

°C (*degrees centigrade / Celsius degrees*): grados centígrados / grados Celsius.

OSDI[®] (*ocular surface disease index*): índice de enfermedad de la superficie ocular.

PRTT (*phenol red thread test*): test de rojo de fenol.

PVD (*visual display unit*): pantallas de visualización de datos.

RH (*relative humidity*): humedad relativa.

SD (*standard deviation*): desviación estándar.

SEM (*standard error of the mean*): error estándar de la media.

SIDEQ (*single item score dry eye questionnaire*): cuestionario de valoración de ojo seco.

SOS: síndrome de ojo seco.

ST (*standard condition*): condición estándar.

T-BUT (*tear break-up time*): tiempo de ruptura lagrimal.

TNF- α (*tumor necrosis factor*): factor de necrosis tumoral.

VAS (*visual analogue scale*): escalas de valoración visual.

VEGF (*vascular endothelial growth factor*): factor de crecimiento del endotelio vascular.

FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias al apoyo económico recibido de diferentes organismos públicos y privados que han financiado los siguientes proyectos de investigación, en el seno del Grupo de Investigación de Superficie Ocular del IOBA (grupo de investigación reconocido de la Universidad de Valladolid), en los que he participado como personal investigador.

Proyectos en convocatoria pública:

29/03/2011-28/03/2013: Junta de Castilla y León. EDU-VA145A11-2: Desarrollo de un test de provocación en una cámara de ambiente controlado para el diagnóstico de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular. I.P.: M. Calonge Cano.

08/2008-08/2011: Programa de apoyo de la Junta de Castilla y León a Proyectos de Investigación: Estandarización de los parámetros ambientales y exploraciones oftalmológicas en una CAMARA DE AMBIENTE CONTROLADO (CAC) para la realización de estudios clínicos en patología de la superficie ocular bajo condiciones normales y extremas". Grupo de excelencia Ref: GR217. I. P.: J. Carlos Pastor Jimeno.

Proyectos con financiación privada:

- 12/04/2008-11/04/2009: Artículo 83 de la LOU con los Laboratorios Allergan Inc. (USA). Proyecto: Standardization of diagnostic tests under controlled environmental conditions. I.P.: M. Calonge Cano.
- 10/02/2009-09/02/2014: Artículo 83 de la LOU con los Laboratorios Allergan Inc. (USA). Proyecto: Allergan/IOBA Ocular Surface Inflammation Program. I.P.: M. Calonge Cano.
- 01/09/2009-31/12/2010: Artículo 83 de la LOU con los Laboratorios Allergan Inc (USA). Proyecto: Influence of controlled adverse environments on the ocular surface. I.P.: M. Calonge Cano.
- 30/12/2009-29/12/2010. Art. 83 de la LOU con los Laboratorios Allergan USA. Proyecto: "Biomarkers in Dry Eye Disease". I.P.: M.J. González García.
- 04/05/2010-31/12/2011: Artículo 83 de la LOU con los Laboratorios Allergan Inc (USA). Proyecto: Clinical trial on Dry Eye Syndrome under controlled environmental conditions. I.P.: M. Calonge Cano.
- 11/04/2011-10/08/2012. Art. 83 de la LOU con los Laboratorios Allergan USA. Proyecto: "Desarrollo de un test de provocación en una cámara de ambiente controlado para la evaluación de lentes de contacto. I. P.: M. J. González García.

Respecto a la financiación personal, durante el desarrollo de esta tesis doctoral he disfrutado de las siguientes becas, concedidas tanto por la Universidad de Valladolid como por la Universidad do Minho (Braga, Portugal).

- Beca de Formación de Personal Investigador (FPI-UVa) (2008-2012).
- Ayuda complementaria para estancias breves en el extranjero para becarios FPI (2012), que me permitió realizar una estancia de tres meses en el Laboratório de Investigaçã o em Optometria Clínica e Experimental (CEORLab) del Centro de Física de la Universidade do Minho, Braga (Portugal), bajo la supervisión del profesor Mikhail Vasilevskiy.
- Beca complementaria asociada al proyecto de investigación “Soluções Multipropósito para Lentes de Contacto”. Duración: desde el 15/04/2012 hasta el 31/12/2012. a cargo del Dr. José Manuel González-Méijome en el Centro de Física de la Universidad de Minho.
- Beca de Investigación, con cargo al proyecto “Efficacy of different antiallergic drugs on eyelid swelling of allergic origin”. Duración: desde el 19/09/2012 hasta el 31/12/2012, dirigido por Dña. Margarita Calonge Cano.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Tesón M, González García MJ, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Stern ME, Calonge M. Influence of a Controlled Environment Simulating an In-flight Airplane Cabin on Dry Eye Disease. **Enviado a IOVS. En segunda revisión.**

- Martín-Montañez V, González-García MJ, Tesón M, Calonge M. Procedimientos de valoración de la función visual en el síndrome de ojo seco. Ver y Oír 2011;28 (241):35-42. ISSN: 0212-4394

- González-García MJ, Tesón M. Cap. 6: Alteración de la Superficie Ocular por el uso de Lentes de Contacto: Problemas y Soluciones Actuales. En: Lentes de Contacto: superficie ocular y biomateriales. López-Alemany A (ed). Editorial Ulleye. Xativa, España. 2010; capítulo 6. Pág: 99-128 ISBN: 978-84-935497-2-5. CLAVE: CL.

- Tesón M, González-García MJ, Calonge M. Cap. 7: Síndrome de Ojo Seco. En: Lentes de Contacto: superficie ocular y biomateriales. López-Alemany A (ed). Editorial Ulleye. Xativa, España. 2010; capítulo 7. ISBN: 978-84-935497-2-5. CLAVE: CL.

- González-García MJ, Tesón M, Herreras JM, Calonge M, González-Mejjome JM. Lentes de Contacto y Síndrome de Ojo Seco. En: Contactología. En proceso de edición por el Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alicante.

Además, el trabajo realizado ha sido en los siguientes congresos científicos.

PONENCIAS INVITADAS

- Calonge M, Tesón M, López-Miguel A, Enriquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Herreras JM, Stern ME, González-García MJ. 6-8/06/2007: Panelista asesor. Contribución: Effect of a Controlled Adverse Environment (CAE) on the Ocular Surface: A Model for Human Studies. The Inflammation and Ocular Surface Focus Group. Allergan. Paris, Francia.

- Tesón M. Influencia de los Factores Ambientales en la Superficie Ocular. I Jornadas Hispanolusas de la Visión. 2–3/10/2010. Don Benito, Extremadura, España.

- Calonge M, Tesón M, López-Miguel A, Enriquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Herreras JM, Stern ME, González-García MJ. 23-25/09/2011: Panelista asesor. “Update in biomarkers for ocular surface inflammation”. The Inflammation and Ocular Surface Focus Group. Allergan, Barcelona, España. Internacional.

- Calonge M, Tesón M, López-Miguel A, Enriquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Herreras JM, Stern ME, González-García MJ 16-17/02/2012: Panelista asesor: Contribución: “Effects of Low Humidity Stress on the Ocular Surface”. Cullen Symposium. Houston, USA.

- Calonge M, Tesón M, López-Miguel A, Enriquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Herreras JM, Stern ME, González-García MJ 21-25/07/2012: "Clinical and inflammatory molecular response of the lacrimal functional unit to controlled environmental conditions". XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. ISER 2012. Berlin, Alemania. *Internacional*.
- Tesón M. Influencia de los factores ambientales de los tests diagnósticos de la superficie ocular. Seminario de Investigación. 28-11-2012. IOBA. Valladolid.

PONENCIAS

- Tesón M., Abengózar A, López-Miguel A, Stern ME, Calonge M, González-García MJ. Influencia de los Factores Ambientales en la Superficie Ocular. Conferencia Internacional en Optometría y Contactología OC'10. Red Temática en Optometría del Ministerio de Ciencia e Innovación y Universidad de Valencia. 17-18/04/2010. Valencia, España. Comunicación oral.

- Tesón M., Martín-Montañez V, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Benito MJ, Mateo ME, González-García MJ, Calonge M. Alteración de la superficie ocular por exposición a un ambiente adverso. Modelo de una cámara de control ambiental Cer-Lab. 22 Congreso internacional de Optometría Contactología y Óptica Oftálmica. 17-19/02/2012. Madrid, España. Comunicación oral.

- Tesón M., Martín-Montañez V, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Benito MJ, Mateo ME, Calonge M, González-García MJ. Variabilidad inter-día de repetibilidad de los test de la evaluación de la superficie ocular. 22 Congreso internacional de Optometría Contactología y Óptica Oftálmica. 17-19/02/2012. Madrid, España.
Premio a la mejor comunicación oral del congreso.

- Martín-Montañez V, Tesón M, López-Miguel A, Neves H, Gonzalez-Meijome JM, Calonge M, Gonzalez-Garcia MJ. Determinación de la relación entre síntomas y signos en pacientes con síndrome de Ojo Seco. 22 Congreso internacional de Optometría Contactología y Óptica Oftalmológica. 17-19/02/2012. Madrid, España. Comunicación oral.

- García Vázquez C, Tesón M, Martín Montañez V, López Miguel A, Benito MJ, Mateo ME, González García MJ, Calonge M, Enríquez de Salamanca A. Alteración de los niveles de citoquinas y quimioquinas en lágrima por exposición a un ambiente adverso en una Cámara de Control Ambiental- CERLab. XXV Congreso Nacional de Técnicos Superiores en Laboratorio de Diagnóstico Clínico y Técnicos Superiores en Anatomía Patológica y Citología. 25-26/05/2012 Santiago de Compostela. Nacional. Comunicación oral.

PÓSTERS

- Calonge M, Tesón M, López-Miguel A, Enriquez-de-Salamanca A, Martín-Montañez V, Benito MJ, Mateo ME, Herreras JM, Stern ME, González-García MJ. Simulation of Acute Symptomatic Exacerbation in Dry Eye (DE) Patients After a Two Hour Exposure to Adverse Conditions in an Environmental Chamber. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO), Washington State Convention Center. Seattle, Washington, Estados Unidos. 5-9/05/2013. Internacional. **Póster. Pendiente de aceptación.**

- González-García MJ, Tesón M, Martín-Montañez V, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Benito MJ, Mateo ME, Herreras JM, Stern ME, Calonge M. Utility of a Controlled Environment in the diagnosis of Dry Eye Disease. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO), Florida, Estados Unidos. 06-09/05/2012 Internacional. Comunicación en póster.

- Tesón M, Martín-Montañez V, López-Miguel A, Enríquez-de-Salamanca A, Benito MJ, Mateo ME, Calonge M, González-García MJ. Inter-Session Variability of the Clinical Ocular Surface Diagnostic Tests. 9th International Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV'2012), 23-23/04/2012. Braga, Portugal. Póster.

- Martín-Montañez V, Tesón M, López-Miguel A, Calonge M, González-García MJ. Correlation between Visual Function, Tear Film and Symptomatology Tests in Patients with and without Dry Eye Disease. Academy 2011 Boston. 12-15/10/2011. American Academy of Optometry. Boston. Estados Unidos. Póster.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

Esta memoria de tesis se presenta en la modalidad tradicional y opta a la mención internacional en el título de doctor. Por lo tanto, su organización se ajusta a lo requerido por la comisión de doctorado de la Universidad de Valladolid.

Esta tesis doctoral se encuentra dividida y constituida por tres estudios complementarios entre sí. Teniendo como objetivo el facilitar la comprensión del trabajo realizado, se ha optado por organizarla de la siguiente forma: una introducción al tema de estudio de la tesis, la justificación del trabajo realizado, seguido de la hipótesis y los objetivos perseguidos y la metodología empleada en los estudios, especificando en este apartado las pequeñas diferencias en metodología existentes entre los estudios. Posteriormente, se reflejan los resultados de los estudios I y II, realizados en la cámara de ambiente controlado y de un análisis comparativo entre ambos estudios; para ello, se ha seleccionado la condición ambiental menos extrema del estudio I y se ha comparado con la condición más extrema a la que se han expuesto los sujetos del estudio II.

La última fase del proyecto ha sido el estudio III, como complemento a los estudios I y II. Este estudio se realizó en el Laboratório de Investigãçao em Optometria Clínica e Experimental – CEORLab del Centro de Física de la Universidad do Minho, Braga (Portugal), bajo la dirección del profesor Mikhail Vasilevskiy donde tuve la oportunidad de realizar una estancia para optar a la mención internacional. La exposición del estudio III sigue el mismo formato de los estudios anteriores: resultados, discusión y conclusiones. A continuación, se realiza la discusión y conclusiones comunes obtenidas todos los estudios.

SUMMARY

ORGANIZATION OF THE DOCTORAL THESIS

This PhD manuscript, presented in the “traditional format”, applies for eligibility to the so-called International Mention on the Doctor title. Therefore, its organization meets those specific requirements as dictated by the Doctoral Committee of the University of Valladolid.

This thesis is divided into three different studies: study I and II were carried out in the environmental chamber of the CERLab (University of Valladolid and Visión I+D, Valladolid, Spain) and study III was conducted at the Clinical and Experimental Optometry Research Laboratory (CEORlab, Braga, Portugal), where I spent three months to qualify for the International Mention.

In order to facilitate its understanding, this thesis manuscript is organized as follows: an introduction in the topic of the thesis study, the justification of the work performed, followed by the hypothesis and objectives. It then follows a common methodology section, specifying small differences in each of the three studies. Then, results are shown separately, corresponding to study I, II and III. Results of the two first studies (I and II) are closely related, and were compared in a different section.

In order to shorten this Doctoral Thesis into this English summary, results shown are limited to the comparative analysis between the most adverse environmental condition within study II and the least adverse condition within study I, followed by a brief description of study III.

INTRODUCTION

Dry eye is recognized as a multifactorial inflammatory disorder of the lacrimal functional unit (LFU) composed by the cornea, conjunctiva, accessory lacrimal glands, meibomian glands, main lacrimal gland, and the interconnecting innervation that integrates the activities of each component (Stern et al., 1998). In DED, the interactions of the LFU components become disrupted. It is a common disorder affecting between 5.5% (McCarty et al., 1998) and 33.7% (Lin et al., 2003) of the population, depending on the criteria used for diagnosis. It is characterized by ocular discomfort and pain, visual disturbance, tear film instability, and increased tear osmolarity (DEWS, 2007a), and inflammation of the LFU.

Currently, except for Cyclosporine A (CsA), there are no pharmacological therapies approved for the management of DED. Available treatments can decrease symptoms and signs, but have limited effect on the underlying cause of the disease. A clear example is artificial tears attempting to mimic human tears with physico-chemical properties (pH, osmolarity, viscosity, surface tension), and chemical elements (mainly ions) of their composing (sodium, potassium, phosphate, zinc, etc.). However, human tears have a number of more complex compounds which are impossible to mimic (antibodies, enzymes, growth factors, nutrients, etc.).

Clinical tests such as tear break-up time (T-BUT), Schirmer test, the phenol red thread test (PRTT) or vital stainings (fluorescein staining, rose bengal or lissamine green) and diverse questionnaires of DED (SANDE I and II, Dry Eye McMonnies questionnaire, DEQ, OSDI® ...) are daily used to assess clinical

signs and symptoms of DED, classify the disease and provide the most appropriate treatment. However, many of them have shown low reliability and reproducibility (Nichols et al., 2004). Additionally, most studies found poor or no correlation between the clinical signs and symptoms in patients with DED (Hay et al., 1998; Schein et al., 1997; Bjerrum., 1996, Moore et al., 2009, Cuevas et al., 2012) and clinical evidence indicates that the available diagnostic tests do not always correlate well with symptoms (Begley y cols., 2003), especially in mild to moderate forms of DED (Cuevas et al., 2012).

During recent years, new techniques have been developed for the evaluation of both the ocular surface and the tear film, such as tear clearance test, study of growth factors and inflammatory molecules (cytokines/chemokines) in epithelial cells and tears (Lamibase et al., 2011; Enriquez-de-Salamanca et al., 2010). Some of these evaluation techniques can potentially be useful both to improve the correlation between signs and symptoms and the diagnosis of DED or other diseases of the ocular surface (DEWS, 2007d). The difficulty in demonstrating the correlation between clinical improvement of objective and subjective symptoms makes both the classification and diagnosis of DED as well as finding appropriate treatments, a complex aim to be reached. One of the most important factors implicated in this disconnection is the environment to which the LFU is exposed and which can abruptly vary. This variability is actually a well-recognized problem in the confirmation of therapeutic efficacy in the context of clinical trials (Foulks., 2003).

It is reported that DED symptoms vary depending on the indoor (air conditioned rooms) and outdoor (arid regions) environmental conditions (Wolkoff., 2012). In addition, millions of individuals are exposed to numerous artificially

controlled environments in their daily life, such as air-conditioned or heated rooms, vehicles, and/or airplane cabins. Thus, the LFU is exposed to multiple environmental variables including temperature, airflow, humidity, and in some cases, atmospheric pressure. These environmental variables could stimulate or retard tear film evaporation and increase or decrease symptoms and signs (Barabino et al., 2002; Rolando et al., 1998; González-García et al., 2007).

The control of the environmental conditions to which patients are exposed before being evaluated might minimize the influence that these have on the LFU, which may allow the obtaining of more reliable diagnostic test values. Similarly, the ability to "homogenize" patients before being evaluated to minimize the influence of the environment could be a crucial factor to improve the reliability and eventual success of therapeutical multicenter clinical trials, where each center is located in a different geographic location with different climatic characteristics.

In order to control the environment in which DED patients are examined, environmental chambers that create a controlled adverse environment are being used (Abelson et al., 2002; Ousler et al., 2002; Maruyama et al., 2004; Morgan et al., 2004, González-García et al., 2007). The use of environmental chambers could be helpful in improving the design of clinical trials and studying the effects of DED therapeutics and contact lenses (Abelson et al., 2002; Ousler et al., 2002).

The Ocular Surface Group at IOBA, University of Valladolid is highly involved in the study of inflammatory diseases affecting the ocular surface, DED being its main focus. About 10 years ago, a research program in inflammation of ocular surface was started and co-directed by Prof. Margarita Calonge (IOBA, University of Valladolid) and Dr. Michael E. Stern (Allergan Inc). In the context of this program, a study with an environmental chamber located at the School of Architecture in the University of Valladolid was designed. Although this chamber was not adapted to be used with humans, but for studying the quality of air, a first study with humans was possible by performing some reformations (González-García et al., 2007). This study demonstrated the utility and the importance of this controlled environment. Thus, in 2008, an environmental chamber was constructed, becoming part of the so-called Controlled Environment Research Laboratory (CERLab). Within this chamber, environmental variables such as temperature, relative humidity (RH), and atmospheric pressure can be controlled.

This doctoral thesis is the first scientific study conducted within CERLab, to evaluate the influence of environmental conditions on both DED patients and healthy subjects.

HYPOTHESIS

Adverse environmental conditions recreated within a controlled environmental chamber can cause a deterioration of the LFU in both DED patients and healthy individuals, as evaluated by the alteration of clinical diagnostic tests of DED and/or concentrations of various tear molecules.

OBJECTIVES

General objective

To evaluate the effects induced by various environmental conditions recreated in the controlled environment chamber (CERLab) in DED diagnostic tests (symptoms, signs, and tear molecules) in three study samples: control subjects, patients with mild-moderate DED, and patients with severe DED.

Specific objectives

1. To assess the effect of an environmental condition frequently found in Valladolid, Spain on the LFU of DED patients and healthy subjects, evaluated by the variation of clinical diagnostic tests of DED and tear molecule concentrations.

The specific environmental conditions recreated in the environmental chamber were: 23°C of temperature, 45% RH, and 930 mb of atmospheric pressure (corresponding to the one in Valladolid whis is 690 m above sea level).

2. To assess the effect of an environmental condition frequently found in drier areas or in modern buildings (where RH is typically lower) on the LFU of DED patients and healthy subjects, evaluated by the variation of clinical diagnostic tests of DED and tear molecule concentrations.

The specific environmental conditions recreated in the environmental chamber were the same as above but with a lower humidity: 5% RH.

3. To assess the effect of the environmental condition frequently found in air cabins during in-flight conditions on the LFU of DED patients and healthy subjects, evaluated by the variation of clinical diagnostic tests of DED and tear molecule concentrations.

This specific environmental condition recreated in the environmental chamber was: 23°C, 5% RH and 750 mb of atmospheric pressure (corresponding to 2500 m above sea level).

4. To evaluate the influence on the LFU induced by implementation of air flow on the three environmental conditions detailed above.
5. To assess the differences on DED clinical diagnostic test results in two homogeneous samples of healthy subjects living in two different geographic localizations with different climate: Valladolid (Spain), where the weather is mostly continental, and Braga (Portugal), where the climate is maritime.

COMPARATIVE ANALYSIS STUDIES I AND II

METHODOLOGY

Participants

The study protocols were approved by the institutional review board of the Institute for Applied Ophthalmology (IOBA), University of Valladolid and the University of Valladolid Medical School Ethics Committee. The study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. All enrolled subjects were informed of the nature of the study and consent forms were signed. The study was double-masked and thus neither the participants nor the examiners knew to which of the specific randomized environmental conditions the participants were exposed. The same examiner always performed the clinical subjective evaluation of corneal and conjunctival staining, conjunctival hyperemia, and fluorescein tear break-up time (T-BUT).

DED patients were recruited among known symptomatic patients already being cared for at the Ocular Immunology Unit of IOBA and Clinic Hospital, University of Valladolid. Healthy age-matched volunteers were also recruited to serve as control subjects. All of the participants were divided into two groups. The first one was assigned to the so-called "Standard Condition" and the second one to the "Adverse Condition" (see below).

We selected mild to moderate (level 1 and 2) DED patients as classified by the International Dry Eye Workshop (DEWS) dry eye severity grading scheme (DEWS, 2007a). During a preliminary visit, potential patients and subjects were screened for inclusion criteria. For DED patients, these included an ocular surface disease index (OSDI[®]) score (Schiffman et al., 2000) > 12 and corneal fluorescein staining \leq grade 2 (Oxford Scale) (Bron et al., 2003). For healthy control subjects, the inclusion criteria were an OSDI[®] score < 12 and corneal fluorescein staining \leq grade 1 (DEWS, 2007a). In addition, individuals from both groups had to be within normal limits in at least two out of the following four tests: fluorescein T-BUT > 7 sec (Lamp et al., 2009), conjunctival lissamine green staining (Oxford Scale) \leq grade 1 (DEWS, 2007a; Bron et al., 2003; Xu et al., 1995), Schirmer test without anesthesia \geq 5 mm in 5 min (van Bijsterveld., 1969; DEWS, 2007a), and phenol red thread test (PRTT) > 20 mm in 15 seconds (Patel et al., 1998; Sakamoto et al., 1993)

Exclusion criteria for both groups were age < 40 years old, contact lens wear, pregnancy or nursing, history of ocular surgery within the last 6 months, any acute or chronic ocular disease including patients with concomitant allergies (even if mild) other than DED, and any systemic anomaly that contraindicated being subjected to any environmental controlled condition. Those individuals who were under any medication, either ocular or systemic, had to keep it unchanged, with the same schedule during the preceding two months and for the entire duration of the study. DED patients and control subjects were instructed not to instill any eye drop (artificial tears included) within the 4 hours prior to each visit.

Only one eye of each individual was included in the study. The selection was performed during the screening visit and depended first on corneal staining. The eye having more severe corneal staining was selected for the DED group. For the control group, the eye with the least corneal staining was selected. If both eyes had the same corneal staining, then the most symptomatic eye was selected for the DED group, whereas for the control group, the least symptomatic one was chosen. If the latter criteria failed to select the study eye, the eye was finally selected following a computer-generated random table.

Environmental Chamber

Individuals were exposed to two different environment conditions within an environmental chamber (VISIÓN I+D, SL; Valladolid, Spain) inside the Controlled Environmental Research Laboratory (CERLab), located at the IOBA building at the University of Valladolid, Valladolid, Spain. This facility was composed of an exposure chamber with a maximum capacity of 8 subjects and an evaluation chamber (Figure 1). Both chambers were 6 × 3 meters (18 m²). The following environmental conditions could be controlled in both rooms simultaneously: temperature [range: 15-30 degrees Celsius (°C), 1°C steps] and RH, (range: 5–80%, 1% steps). Additionally, airflow (blower exit velocity: range 0.60–3.60 m/s), illumination (range, 10–1000 lux, 1 lux steps), and atmospheric pressure [range: 930–450 millibars (mb), 1 mb steps] could also be controlled. The evaluation chamber was completely equipped with the clinical ophthalmic instruments needed to evaluate the LFU. Using a control display located outside of the chamber, environmental conditions within the chamber were monitored throughout the entire duration of the experiments and were recorded in 5 min intervals. Between 2 and 15 days after the screening visit, participants were assessed within the evaluation chamber before and

after a two hour exposure to the environmental condition. Experimental sessions were run only when an anesthesiologist working at the surgery facilities (located on the same floor) was also available to take care of any possible medically adverse event.

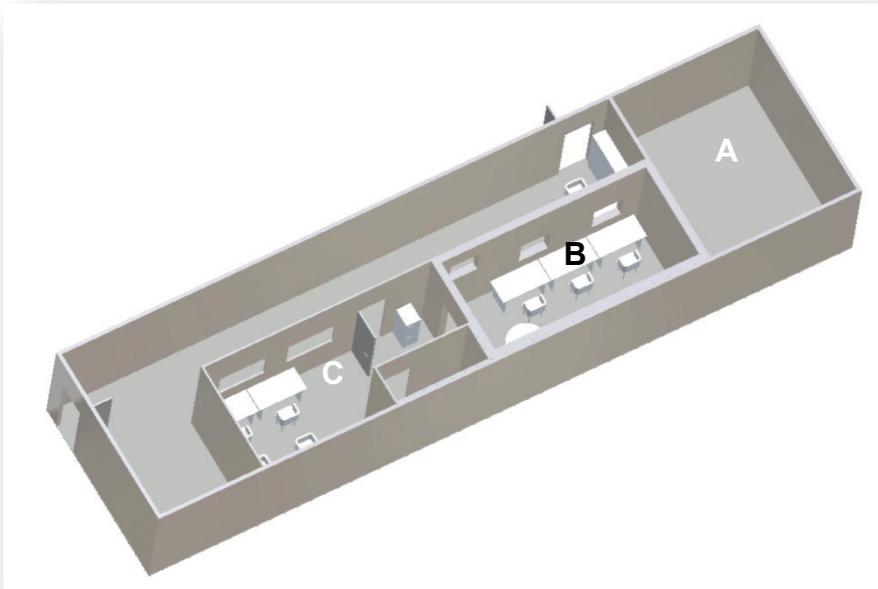


Figure 1. Environmental Chamber of the Controlled Environmental Research Laboratory (CERLab). A: engine room; B: exposure room; C: evaluation room.

Environmental Conditions

For two hours, each subject was exposed to either the Standard Condition or the Adverse Condition within the environmental chamber maintained at 23°C. For the Standard Condition, the RH was 45% and the barometric pressure was 930 mb, the average atmospheric pressure found in Valladolid, which is 690 meters above sea level. For this condition, there was no localized air flow, and participants performed near vision tasks such as reading, playing cards,

working crossword puzzles, doing board games, etc., for the whole exposure period.

For the Adverse Condition, the RH was 5% and the atmospheric pressure was 750 mb, similar to that usually found within an aircraft cabin at 2.500 m above sea level (Federal Aviation Administration, 1996). Pressure changes were designed to simulate an actual aircraft flight, with a 15 min ascent during which the pressure decreased at a rate of 12.7 mb/min, an 85 min cruise, and a 20 min descent during which the pressured increased at a rate of 9.5 mb/min. The Adverse Condition included localized air flow with a mean velocity of 0.43 m/s, provided by individual blowers (Belnor Engineering Inc., Ottawa, ON, Canada) located one meter away from each subject. During the exposure, participants watched a documentary on a conventional LED TV monitor of 1.4 m that was situated above eye level so that patients looked slightly upwards. These conditions were designed to achieve a larger LFU area exposed to the desiccating conditions.

Examination Procedure

The examinations were performed in the sequence outlined below, with a 2-5 min interval between each test.

Modified Single-Item Score Dry Eye Questionnaire (SIDEQ). To evaluate DED symptoms, we used a modified SIDEQ (Invest Ophthalmol Vis Sci 44 [Suppl]:2448, 2003). SIDEQ assesses the subject's ocular discomfort due to symptoms of dryness including dryness, sandy or gritty feeling, burning or stinging, pain, itching, sensitivity to light, and blurred vision. The level of discomfort ranging from "none" to "severe" is normally scored on a 0 to 4 scale.

For this study, we assessed the same symptoms as the original one (Invest Ophthalmol Vis Sci 44 [Suppl]:2448, 2003); however, the level of discomfort was scored using a visual analogue scale (VAS) (Aitken., 1969) to increase test sensitivity. The VAS consisted of a horizontal line 100 mm long. At the left end of the line the number “0” indicated the absence of symptoms. At the right end of the line, the number “100” indicated severe symptoms. Participants performed the modified SIDEQ before beginning the chamber exposure, one hour after the beginning, and at the end of the two hour exposure.

Tear osmolarity. Tear osmolarity was assessed using the TearLab (TearLab Corporation, San Diego, CA, USA). This system is designed to collect and analyze tear osmolarity from a 50 nl tear sample. Collection was performed at the external canthus in a non-traumatic procedure to avoid reflex tear secretion. A disposable chip was used for each sample (Benelli et al., 2010). Prior to proceeding with any measurement, Tearlab calibration was performed following the manufacturer’s instructions. We used the recommended cut-off value of 316 mOsm/l for DED diagnosis (DEWS, 2007a; Tomlinson et al., 2006).

Phenol red thread test (PRTT). The PRTT (Zone Quick Test; Menicon Company Ltd., Nagoya, Japan) was placed in the recommended position over the external canthus, and the length of the wetted thread was read 15 seconds later (Hamano et al., 1983). Values of 20 mm or below were considered abnormal (Patel et al., 1998).

Conjunctival hyperemia. Bulbar hyperemia was scored based on the Efron scale (Efron., 1998). Nasal and temporal areas were assessed independently; however, the final score was obtained after averaging both values.

Tear sample collection. Tear samples (4 μ l) were obtained for cytokine/chemokine and matrix metalloproteinase (MMP)-9 analyses before instilling any vital staining. As previously described (Carreño et al., 2010), tears were collected from the external canthus in a non-traumatic manner to avoid as much as possible reflex tear secretion. The samples were collected using a glass capillary tube (Drummond Scientific Co, Broomall, PA, USA) and then diluted 1:10 by delivery with a Pipetboy (Integra Biosciences AG, Zizers, Switzerland) in a 0.5 ml microtube (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Germany) containing Cytokine Assay Buffer (Merck Millipore, Millipore Iberica, Madrid, Spain). The samples were then frozen at -80°C until analysis.

Fluorescein T-BUT. T-BUT was performed after instillation of 5 μ l of 2% sodium fluorescein (Colircusí Fluoresceína 2%, Alcon Cusi, SA, Barcelona, Spain) into the inferior fornix with a micropipette (Capp Single Pipette EcoPipet Red, Capp Pipettes, Everton Park, QLD, Australia). The subjects were then instructed to blink several times for a few seconds to ensure adequate mixing of the dye. The tear film was viewed through a yellow Wratten #12 filter (Eastman Company, Rochester, NY, USA), and the T-BUT was taken as the interval between the last complete blink and the appearance of the first corneal black spot. The measurements were made three times, and the mean value was recorded (Norm., 1969). T-BUTs of 7 seconds or less were considered abnormal (Lam et al., 2009).

Corneal fluorescein staining. Corneal staining was evaluated using a slit-lamp biomicroscope (SL-D7; Topcon Corporation, Tokyo, Japan) with a cobalt-blue filter over the light source and a yellow Wratten #12 filter. Measurements were made two min after instillation of 5 μ l of 2% sodium fluorescein (Colircusí Fluoresceína 2%) into the inferior fornix of the eye. Corneal fluorescein staining was graded using both the Oxford scheme (Bron., 1997) and a modified Baylor scheme (Pflugfelder et al., 2004). The Oxford grading scheme included five panels (0, I, II, III, IV and V) that represented typical gradations of stain on either the cornea or conjunctiva.

The original Baylor grading scheme assessed the fluorescein staining by dividing the cornea into central, superior, temporal, inferior, and nasal zones (Pflugfelder et al., 2004a, b). Grading the intensity of the staining for each zone was based on the number of dots found on a 5-point scale: no dots, 0; one to five dots, 1; six to fifteen dots, 2; sixteen to thirty dots, 3; above thirty dots, 4. Moreover, if there was one area of confluence, then a point is added to the score obtained after summing the five corneal areas. If two or more areas were confluent, then two more points are added. If there was filamentary keratitis, another 2 points are finally added. With the aim of providing a more detailed corneal staining analysis, we modified the Baylor grading scheme by splitting it into two scales based on the number of stained dots per corneal area and the severity of the global staining. Thus, we graded each corneal area following the 5-point Baylor scale, and then we graded the severity following the Baylor scheme indications regarding presence of confluence and/or filamentary keratitis. This approach resulted in two different Baylor scores. We always used a template that was incorporated to the biomicroscope viewing system to assess the five corneal zones, thus, providing the lowest possible variability when grading.

Conjunctival lissamine green staining. Conjunctival staining was evaluated with lissamine green strips (GreenGlo, HUB Pharmaceuticals, LLC, Rancho Cucamonga, CA, USA). The strips were wetted with 25 μ l sodium chloride (NaCl 0.9%, B/Braun, Barcelona, Spain) and then gently applied into the inferior fornix. Staining was evaluated one minute after the instillation following the Oxford scheme grading system (Bron., 1997).

Schirmer test without topical anesthesia. One Schirmer sterile strip (Tearflo, HUB Pharmaceuticals, LLC) was placed in the lateral canthus of the inferior lid margin of both eyes (van Bijsterveld., 1969). The subjects were asked to maintain the eyes closed during the test. The length of wetting was measured in millimeters after 5 min. Results of 5 mm length or more were considered normal (DEWS, 2007a).

Analysis of Tear Molecules

Tear levels of cytokines, chemokines, and MMP-9 were determined by commercial immune-bead based assays in a Luminex IS-100 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA). The concentrations of epidermal growth factor (EGF), CX3CL1/fractalkine, interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-1RA, IL-1 β , IL-2, IL-6, CXCL8/IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, tumor necrosis factor (TNF)- α , and vascular endothelial growth factor (VEGF) were measured simultaneously with a 15-plex assay (HCYTO-60K 15X-Milliplex Millipore Iberica, Madrid, Spain). MMP-9 concentration was measured in a separate assay with a MMP-9 single-plex assay (HMMP2-55K Panel 2, Milliplex, Millipore Iberica). The samples were analyzed following the manufacturer's protocol. Briefly, 10 μ l of the 1:10 diluted sample were incubated under agitation overnight at 4°C with beads coated with antibodies

specific for each cytokine/chemokine or MMP-9. After washing, the beads were incubated with biotinylated human cytokine/chemokine or MMP-9 antibodies for 1 hour, followed by incubation with streptavidin-phycoerythrin for 30 min. Standard curves, obtained from samples of known concentrations of recombinant human cytokines/chemokines or MMP-9 were used to convert fluorescence units to concentration units (pg/ml). The minimum detectable concentrations (in pg/ml) for molecules analyzed were EGF, 2.7; CX3CL1/Fractalkine, 6; IFN- γ and TNF- α , 0.1; IL-1RA, 2.9; IL-1 β and IL-12p70, 0.4; IL-2, IL-6, and IL-10, 0.3; CXCL8/ IL-8 and IL-17, 0.2; CXCL10/IP-10, 1.2; CCL5/RANTES, 1; VEGF, 5.8; and MMP-9, 10. The data were stored and analyzed with the "Bead View Software" (Upstate-Millipore Corporation, Watford, UK). In some samples, the assayed molecule was undetectable. To include those samples in the statistical analysis, we assigned each the minimum detectable value (provided by the assay manufacturer). However, molecules that were detected in less than 30% of the population were not further analyzed.

Data Analysis

Data were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS 18.0 for Windows; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and R (RDC Team., 2006) software by a licensed statistician (MEM). The U-Mann Whitney test was used for comparisons of two independent sample groups. For comparisons between tests performed prior to and after the environmental exposure, the Wilcoxon signed rank test was used for quantitative variables and McNemar test for qualitative variables. Two-sided P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Screening Visit

For exposure to the Standard Condition, 19 control subjects (9 males; 10 females, 60.6 ± 1.7 years old) and 15 DED patients (5 males; 10 females, 60.3 ± 2.1 years old) were selected (Table 1). For exposure to the Adverse Condition, 20 control subjects (6 males; 14 females, 59.3 ± 1.9 years old) were paired with 20 DED patients (6 males; 14 females, 64.7 ± 1.8 years old). The screening evaluations for subjects in both groups were conducted under both standard and adverse environmental conditions. For both conditions, the OSDI[®] scores for DED patients were significantly higher than for control subjects (Table 2). However, for all objective measures, there were no significant differences between the two groups under either environmental condition. No patients suffered any adverse event.

Table 1. Distribution gender and age of subjects.

GROUPS	<u>STANDARD CONDITION</u>	<u>ADVERSE CONDITION</u>	<u>TOTAL</u>
	N (male/female) Age	N (male/female) Age	N (male/female) Age
Control group	19 (9/10) 60.6 ± 1.7	20 (6/14) 59.3 ± 1.9	39 (15/24) 60.0 ± 1.3
DED group	15 (5/10) 60.3 ± 2.1	20 (6/14) 64.7 ± 1.8	35 (11/24) 62.8 ± 1.4
Total	34 (14/20) 60.5 ± 1.3	40 (12/28) 62.0 ± 1.4	74 (26/48) 61.3 ± 1.0

N: number of participants; DED: dry eye disease.

Table 2. Screening evaluation of participants under standard and adverse conditions.

	<u>Standard Condition</u>		<u>Adverse Condition</u>	
	Control Group	DED Group	Control Group	DED Group
OSDI® score	2.26 ± 0.90*	40.6 ± 5.97*	3.27 ± 0.85*	35.73 ± 2.79*
PRTT	20.84 ± 1.74	24.13 ± 1.60	23.44 ± 1.29	21.40 ± 1.29
T-BUT	5.39 ± 0.98	4.62 ± 0.86	4.22 ± 0.64	3.82 ± 0.57
Corneal Staining (Oxford scale)	0.37 ± 0.11	0.33 ± 0.13	0.50 ± 0.11	0.75 ± 0.16
Conjunctival Lissamine staining	0.51 ± 0.10	0.63 ± 0.18	0.45 ± 0.16	0.25 ± 0.09
Schirmer test	14.97 ± 2.15	14.50 ± 1.94	11.30 ± 1.28	12.70 ± 1.85

*Difference between groups under the same condition (Wilcoxon test, $p \leq 0.001$).

DED: dry eye disease; OSDI®: ocular surface disease index; PRTT: phenol red thread test; T-BUT: tear break-up time.

Clinical Tests

For tear osmolarity, conjunctival staining, and the Schirmer test, there were no statistically significant differences between the control and DED groups before or after exposure to either standard or control conditions (Table 3), nor did the adverse condition induce any significant changes from the pre-exposure state for these tests. The modified SIDEQ scores of the DED group were significantly higher than those of the control group after one and two hours of exposure to the Standard Condition (Table 3). Under the Adverse Condition, the scores of the DED group were significantly higher prior to, at one hour, and after two hours of exposure. For the DED group, PRT test scores were significantly decreased after two hours in the Adverse Condition (Table 3). Conjunctival hyperemia scores significantly increased in all individuals after both exposures (Table 3).

For both groups, fluorescein T-BUT significantly decreased in the Adverse Condition but not the Standard Condition (Table 3). In the Adverse Condition, fluorescein T-BUT was significantly less in the DED group than the control group both before and after the exposure. Corneal staining scored by the Oxford method of assessment increased significantly for the control group in the Standard Condition and for both groups in the Adverse Condition (Table 3). Likewise, using the Baylor scheme, there was an increase in the number of stained dots found in the five evaluated areas in both groups. The DED group showed significantly increased staining independently of the assessment method, Oxford or Baylor scheme, used.

Table 3. Clinical test results.

TEST	STANDARD CONDITION			ADVERSE CONDITION	
	Exposure	Control Group	DED Group	Control Group	DED Group
Modified SIDEQ	Pre	4.22 ± 1.24	10.32 ± 3.40	0.69 ± 0.30	9.61 ± 1.69 †
	1 hour exposure	2.29 ± 0.72	9.65 ± 3.39 †	1.43 ± 0.88	10.47 ± 2.01 ††
	Post	1.83 ± 0.54	11.95 ± 3.47 ††	2.90 ± 1.11	12.38 ± 2.16 †††
Tear Osmolarity	Pre	315.13 ± 4.60	319.13 ± 4.75	309.90 ± 3.30	325.70 ± 6.68
	Post	312.31 ± 2.94	314.53 ± 4.00	316.70 ± 3.48	328.20 ± 6.01
Phenol Red Thread Test	Pre	19.47 ± 1.37	18.53 ± 1.51	21.37 ± 1.47	20.95 ± 1.53
	Post	18.89 ± 1.73	20.00 ± 1.75	19.20 ± 1.26	16.75 ± 1.34**
Conjunctival Hyperemia (mean)	Pre	0.89 ± 0.09	0.93 ± 0.14	1.28 ± 0.13	1.10 ± 0.11
	Post	1.47 ± 0.12***	1.33 ± 0.13**	1.58 ± 0.12*	1.43 ± 0.11**
T-BUT	Pre	3.60 ± 0.65	3.93 ± 0.87	3.53 ± 0.43	2.18 ± 0.28 †
	Post	3.12 ± 0.48	4.51 ± 1.81	2.08 ± 0.26**	1.53 ± 0.20 ††***
Corneal staining (Oxford)	Pre	0.53 ± 0.16	0.80 ± 0.24	0.70 ± 0.15	0.50 ± 0.14
	Post	1.11 ± 0.24***	1.00 ± 0.26	1.70 ± 0.18**	1.25 ± 0.19**
Corneal staining (modified Baylor Scale score)					
Central	Pre	0.21 ± 0.12	0.20 ± 0.14	0.05 ± 0.05	0.25 ± 0.10
	Post	0.26 ± 0.17	0.67 ± 0.23*	0.45 ± 0.13**	0.70 ± 0.18*
Nasal	Pre	0.63 ± 0.25	1.00 ± 0.31	0.40 ± 0.13	0.60 ± 0.15
	Post	1.16 ± 0.25*	1.40 ± 0.32	1.85 ± 0.22***	1.40 ± 0.23**
Temporal	Pre	0.89 ± 0.20	0.73 ± 0.30	0.40 ± 0.13	0.35 ± 0.15
	Post	1.21 ± 0.26	1.00 ± 0.32	1.55 ± 0.20***	1.65 ± 0.24***
Superior	Pre	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.07	0.10 ± 0.07	0.05 ± 0.05
	Post	0.21 ± 0.21	0.27 ± 0.27	0.10 ± 0.10	0.25 ± 0.10*
Inferior	Pre	1.21 ± 0.28	1.27 ± 0.33	1.1 ± 0.23	1.15 ± 0.18
	Post	2.05 ± 0.33*	2.00 ± 0.43*	3.00 ± 0.29**	2.25 ± 0.29**
Severity staining (modified Baylor Scale score)					
Inferior	Pre	0.05 ± 0.05	0.13 ± 0.13	0.15 ± 0.11	0.00 ± 0.00
	Post	0.21 ± 0.14	0.33 ± 0.19	0.80 ± 0.23**	0.60 ± 0.20**
Conjunctival staining (mean)	Pre	0.68 ± 0.15	0.60 ± 0.16	0.63 ± 0.19	0.60 ± 0.13
	Post	0.89 ± 0.25	0.73 ± 0.18	0.80 ± 0.19	0.68 ± 0.12
Schirmer test (without anesthesia)	Pre	11.11 ± 2.37	14.33 ± 2.61	14.70 ± 2.31	10.80 ± 1.87
	Post	11.53 ± 2.00	13.20 ± 2.36	14.80 ± 2.01	11.00 ± 1.95

Comparison by Wilcoxon test before (pre) and after (post) exposure to environmental conditions: *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

Comparison by Mann-Whitney U test between the control and DED groups under the same environmental condition: †p ≤ 0.05, ††p ≤ 0.01,

†††p ≤ 0.001. DED: dry eye disease; T-BUT: tear break-up time.

Analysis of Tear Molecules

Among the 16 molecules analyzed in tears, CX3CL1/Fractalkine, EGF, CXCL8/IL-8, IL-1RA, CXCL10/IP-10, and MMP-9 were detected in more than 90% of both groups prior to and after undergoing either controlled environmental condition. IL-6, CCL5/RANTES, and VEGF were detected in 58-80% of both groups prior to entering the environmental chamber and 69-90% after exposure to either environment. The detection rates for IFN- γ , IL-12p70, IL-17, IL-10, IL-1 β , and TNF- α were below 30% for both groups under both exposure conditions, and therefore not considered to be statistically relevant.

EGF, IL-6, CCL5/RANTES, and MMP-9 tear levels changed significantly after exposure to the Adverse Condition in the (Figure 2). For both the control and DED groups, EGF significantly decreased and IL-6 increased after exposure to the Adverse Condition. We also found a significant increase in CCL5/RANTES values in the control group after the Adverse Condition; however, the increase in the DED group was not significant. While MMP-9 values for both groups increased after exposure to both environmental conditions, only the increase in the DED group after the Adverse Condition was significant. Non-significant changes were detected in tear levels of all the other molecules that were analyzed.

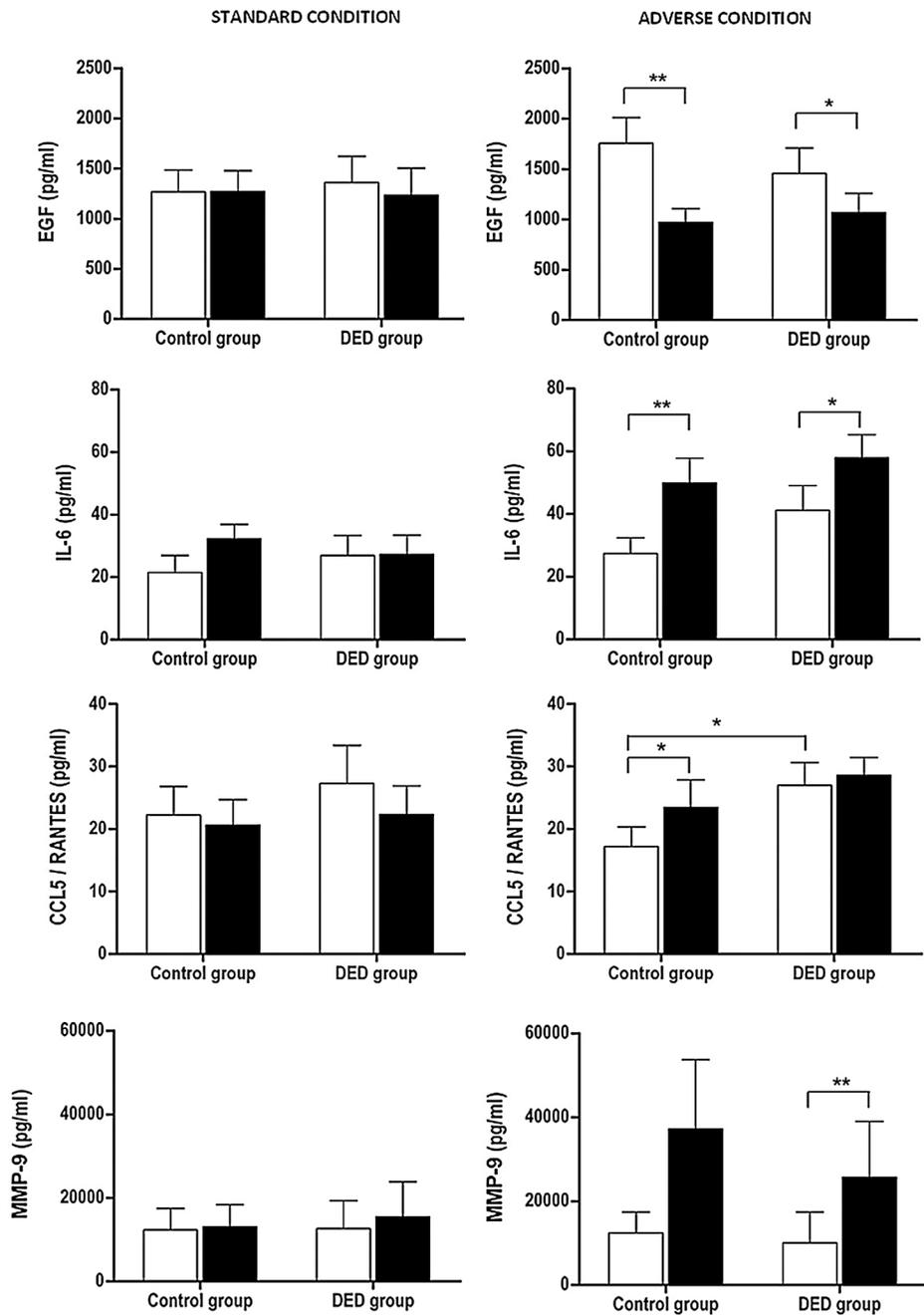


Figure 2. Inflammatory molecules that showed significant changes. Standard Condition, left column; Adverse Condition, right column. Open bars, pre-exposure level; closed bars, post-two-hour exposure level. DED: dry eye disease.

STUDY III. JUSTIFICATION MODEL

HYPOTHESIS

Healthy subjects from two different parts of the world with different climatic conditions will present different basal values” in the clinical diagnostic tests that evaluate the LFU, due to the influence of environmental conditions.

To test this hypothesis, we chose a geographic location climatically different from Valladolid. Valladolid’s climatic characteristics correspond to a cold-mediterranean (with continental-like features) weather. Braga, in the north coast of Portugal, has temperate-cold maritime climate and there is where Dr. Meijome’s team is located (CEORLab, Department of Physics, University of Minho).

OBJECTIVE

The objective of this study was to evaluate a sample of healthy subjects using the same protocol previously detailed for Study I and II and compare them with a similar sample evaluated in Valladolid as part of the study I and II.

METHODOLOGY

Participants

The study protocols were approved by the institutional review board of the Institute for Applied Ophthalmology (IOBA), University of Valladolid and the University of Valladolid Medical School Ethics Committee. The study adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. All enrolled subjects were informed of the nature of the study and consent forms were signed. The same examiner of studies I and II (MTY) always performed all evaluation tests of this study.

A sample of 14 healthy controls (7 men and 7 women), belonging to the previous studies I and II performed in Valladolid was selected. This group was composed with all individuals who participated in both studies during the months of April, May, and June 2011 and 2012, as these were the same months in which the Braga study was carried out. During this period, 14 healthy individual (7 men and 7 women), age and gender-matched to those previously evaluated were screened and eventually examined in two more visits.

The evaluation tests performed during the screening visit and during the 2 evaluation visits, as well as their sequence, were the same previously used in Valladolid (see comparative analysis studies I and II).

Tear osmolarity measurement and analysis of molecules in tears could not be performed because the TearLab® and the Luminex machine were not available at the CEORLab and it was decided again their shipment.

Only one eye of each individual was included in the study. The selection was performed with the same procedure using in the protocol of doctoral study in Valladolid (see methodology: participants of comparative analysis studies I and II).

Data was analyzed with SPSS software (RDC Team., 2006). Reliability of diagnostic tests was analyzed statistically to determine the best way to compare the measurements obtained in both cities. Intraclass Correlation Coefficient (ICC) (Fleiss et al., 1986) for quantitative variables (PRTT, T-BUT and Schirmer test) and Kappa Coefficient (Landis., 1977) for ordinal scale variables (corneal and conjunctival staining and conjunctival hyperemia) were used to analyze variability of measures. Both ranges were between 0 and 1. The total variability of the measurements had two components: the variability due to differences between subjects and the variability due to differences between the measurements for each subject (Table 4). The maximum possible agreement corresponding to the value 1, which means that all the variability observed is due to differences between subjects and not at the different measurements taken at different times. A 0 value means that the observed agreement is the same as it would be expected by random.

Table 4. Magnitude of the concordance for ICC and Kappa Coefficient.

ICC	SIZE OF CONCORDANCE	Kappa Coefficient
≤ 0.30	Poor	≤ 0.20
0.31 – 0.50	Weak	0.21 – 0.40
0.51 - 0.70	Moderate	0.41 - 0.60
0.71 – 0.90	Good	0.61 – 0.80
> 0.90	Very Good	0.81 - 1

ICC: Intraclass Correlation Coefficient.

RESULTS

Reliability of Diagnostic Tests

In general terms, all clinical tests showed a low reliability. This poor reliability was worse in Braga than in Valladolid. Tables 5 and 6 show the reliability of diagnostic tests for qualitative and ordinal scale variables obtained in both cities.

Due to the lack of reproducibility of clinical tests conducted in both cities as showed in table 5 and 6, and following IOBA statistical unit advice, the data could not be analyzed using the mean of the three measurements for both cities. Therefore, we analyze only the visit that was the median of the three visits.

Table 5. Reliability of diagnostic tests analyzed with ICC.

CITY	QUALITATIVE VARIABLES	ICC	SIZE OF CONCORDANCE
Valladolid (Spain)	PRTT	0.40	Weak
	T - BUT	0.11	Poor or absent
	Schirmer test	0.61	Moderate
Braga (Portugal)	PRTT	0.55	Moderate
	T - BUT	0.14	Poor or absent
	Schirmer test	0.69	Moderate

ICC: intraclass correlation coefficient; PRTT: phenol red thread test; T-BUT: tear break-up time.

Table 6. Reliability of diagnostic tests analyzed with Kappa coefficient.

	Ordinal Scale Variables	Kappa Coefficient	Size of concordance
VALLADOLID	Conjunctival Hyperemia		
	Nasal	0.49	Moderate
	Temporal	0.21	Weak
	Corneal Staining (Oxford Scale)	0.41	Moderate
	Corneal Staining (Baylor Scale)		
	Central	0.33	Weak
	Nasal	0.49	Moderate
	Temporal	0.30	Weak
	Superior	-	Poor or absent
	Inferior	0.33	Weak
	Conjunctival Staining (Oxford Scale)		
	Nasal	0.58	Moderate
	Temporal	0.59	Moderate
	BRAGA	Conjunctival Hyperemia	
Nasal		0.43	Moderate
Temporal		0.61	Good
Corneal Staining (Oxford Scale)		0.08	Poor or absent
Corneal Staining (Baylor Scale)			
Central		-	Poor or absent
Nasal		0.00	Poor or absent
Temporal		0.00	Poor or absent
Superior		-	Poor or absent
Inferior		0.00	Poor or absent
Conjunctival Staining (Oxford Scale)			
Nasal	0.36	Weak	
Temporal	0.48	Moderate	

Temperature and RH

No significant differences were observed in the average temperature between Braga and Valladolid; however both cities had a significantly different RH humidity, as expected (Table 7 and Figure 3).

Table 7. Mean values of temperature and RH for visit selection in both cities.

VARIABLE	CITY	Mean \pm EEM	p value
Temperature ($^{\circ}$ C)	Valladolid	16.00 \pm 0.89	0.762
	Braga	16.50 \pm 0.71	
Relative Humidity – RH (%)	Valladolid	52.60 \pm 3.69	0.003
	Braga	81.25 \pm 1.22	

RH: relative humidity; EEM: standard error of the mean.

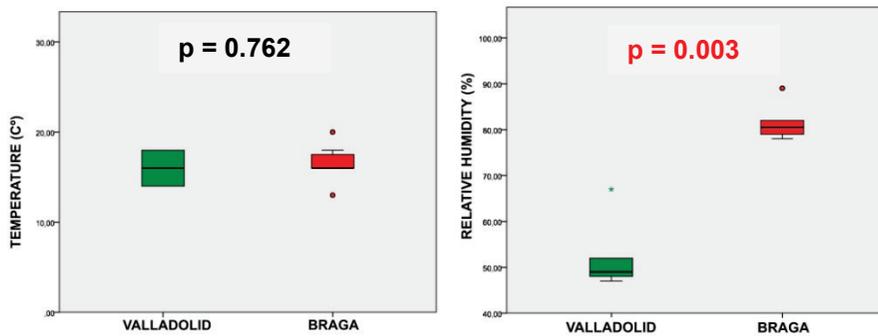


Figure 3. Box plots of temperature (left) and RH (right) in both cities corresponding to the selected visit.

Clinical test

The ocular surface of the control subjects included in Braga (Portugal) showed better baseline values than those evaluated in Valladolid, as measured with the conventional DED diagnostic tests. We found significant higher values on conjunctival hyperemia (temporal) ($p= 0.02$), corneal staining (Oxford scale: $p= 0.01$; Global Baylor scale: $p= 0.02$; Temporal area (Baylor scale): $p= 0.01$) and mean conjunctival staining ($p= 0.03$) in Valladolid sample compared to that in Braga (figure 4). No significant differences were found in PRTT and Schirmer test. Braga subjects showed a better T-BUT than Valladolid subjects ($p= 0.0006$) (figure 4). Additionally, control subjects from Braga had a significantly decreased score in the DED symptom questionnaire than subjects from Valladolid ($p= 0.002$) (figure 4).

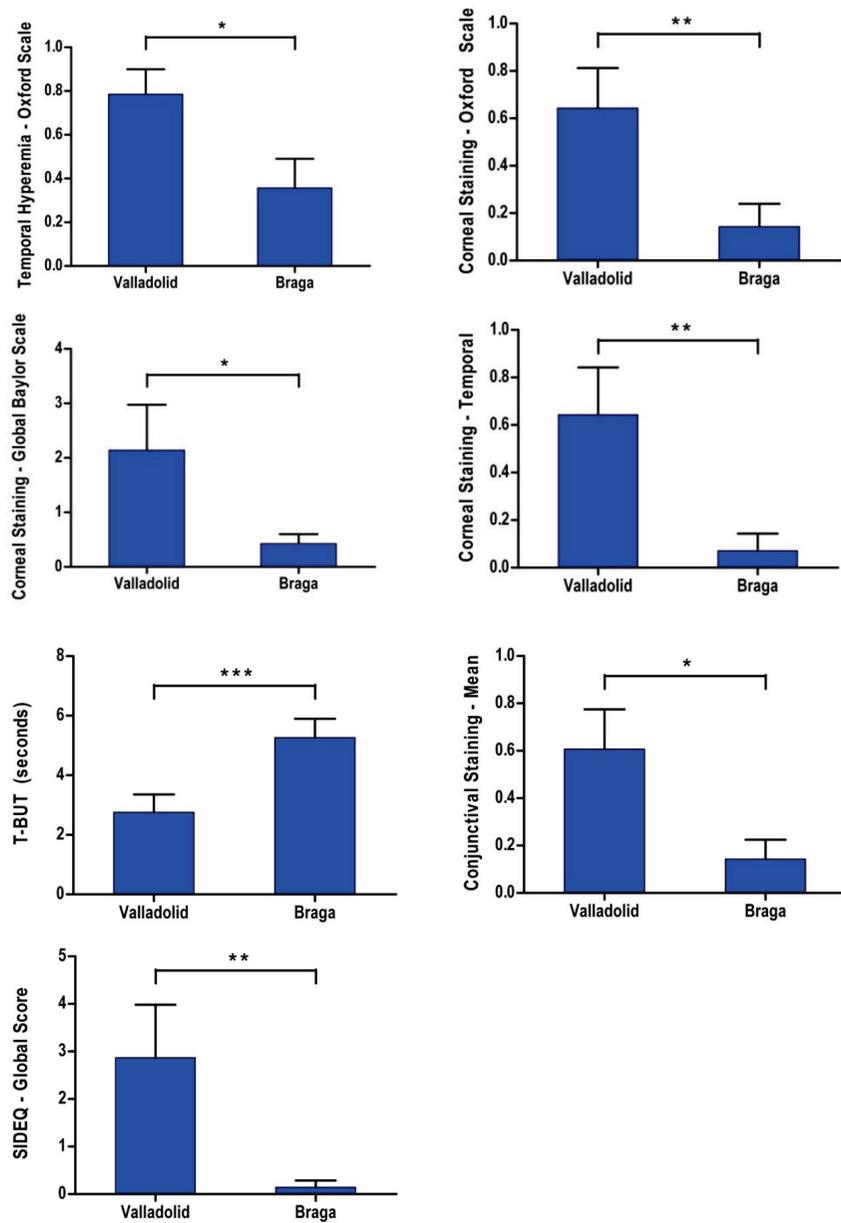


Figure 4. Analysis of the clinical test between Valladolid (Spain) and Braga (Portugal).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. We managed to recreate six different environmental conditions within the environmental chamber of the IOBA-CERLab, all of which produced variable changes in the LFU of DED patients after a 2-hour exposure time. These environmental conditions simulated: 1) the warm-to-cold Mediterranean climate (formerly called continental weather) of Valladolid, Spain (where the IOBA-CERLab is located); 2) the indoor conditions of a conventional building, characterized by low humidity and air flow; and 3) the low humidity and high altitude of a in-flight air cabin of a commercial airplane.
2. Based on the results obtained under each of the 6 different condition tested, we could select the most adequate environmental condition or combination of them for future studies or clinical trials depending upon the specific hypothesis. Thus, we could recreate within the CERLab the following kind of environmental conditions that would presumably affect the LFU:
 - 2.1. The outdoor climate of a specific geographic location, with the ability to recreate low humidity and/or high altitudes.

- 2.2. The indoor conditions similar to those found in modern buildings where acclimatization is reached through conditioned (heated or cooled) air flow and, consequently, expose individuals to a low humidity and to air flow near their faces. The rationale for this is that our study demonstrated that low humidity worsens the LFU and that further implementation of indirect air flow enhances these LFU changes.
- 2.3. A sudden exposure to adverse environmental conditions consisting on low humidity and air flow, simulating the scenario that DED patients suffer when entering places such as a shopping centers, movie theaters, transportation vehicles (cars, train, buses, etc) or, in many cases their work places. By recreating these conditions, we could test whether a certain therapeutic approach would ameliorate or even prevent these disease exacerbations.
- 2.4. An indoor condition simulating the one found in an in-flight commercial airplane cabin, which has produced LFU changes after only a 2 hour exposure time. Our findings would offer the opportunity to start a new research line regarding the assessment of DED therapeutics aimed at reducing the visual complaints of individuals during and/or after flying.

- 2.5. Finally, we can simulate a predetermined visual task taking into account that visual display units or TV visualization tend to provoke more remarkable LFU changes.
3. Mild to moderate DED patients subjected to controlled adverse conditions like low humidity and indirect air flow might worsened, reaching signs similar to those characterizing severe DED patients. This fact suggest that milder, instead of more severely affected patients, could be recruited to test therapeutics for severe DED. This is relevant due to the known difficulty to recruit severe patients for therapeutic clinical trials and to the low chance of improvement for these patients in the short-time duration of these trials.
4. The study performed in healthy individuals in two cities (Valladolid, Spain and Braga, Portugal), with significantly different RH, showed that baseline values for DED diagnostic tests are not comparable, thus lacking reproducibility. This finding highlights the relevance of standardizing the environmental conditions in multicenter clinical trials, where outcome variability is expected associated to the different climatic conditions in each geographic location. This variability can be one of the reasons why therapeutic multicenter clinical trials fail when previous unicenter trials succeeded.

5. We have defined and validated a complete DED diagnostic protocol designed to detect changes in the LFU of DED patients and healthy subjects after exposure to diverse controlled environmental conditions for 2 hours. This evaluation protocol lasts 40 minutes and consists of a DED symptom questionnaire, 8 clinical diagnostic tests and tear collection for its tear molecule concentration assessment. It can be performed in four individuals at the same using two skilled clinically-oriented researchers. This wide protocol, and based on the outcomes obtained in this study, can be shortened and tailored depending upon the specific hypothesis to demonstrate, the therapeutic mechanism of action to test and/or the type of individuals recruited (i.e. healthy subjects, moderate or severe DED patients).
6. Finally, it has been demonstrated the importance of analyzing tear molecules as potential inflammatory activity biomarkers, because the concentration of some of them (especially MMP-9) varied after the exposure to predetermined environmental conditions.

INTRODUCCIÓN

I. EL SÍNDROME DE OJO SECO (SOS)

DEFINICIÓN

El Síndrome de Ojo Seco (SOS) es un trastorno inflamatorio con alta prevalencia y de origen multifactorial, que conduce a una inestabilidad de la película lagrimal y a una enfermedad crónica de la superficie ocular. Provoca problemas de calidad de visión y un gran número de posibles complicaciones, que producen con el tiempo una reducción de la calidad de vida (DEWS, 2007a). Se ha visto que el 64% de los pacientes que acuden a una consulta en EE.UU. tienen síntomas de incomodidad ocular (Begley y cols., 2001) y en un estudio realizado en Canadá encontraron que un 28,7% de los sujetos que asistían a las consultas presentaban síntomas de SOS (Doughty y cols., 1997). En Jeddah, Arabia Saudí, se realizó un estudio de detección del SOS entre los acompañantes en las consultas, encontrando que, del muestreo aleatorio de 251 sujetos, el 93,2% de ellos presentaban uno o más síntomas de SOS acompañado de uno o más signos clínicos de diagnóstico de SOS, y el 91,9% de los sujetos diagnosticados de SOS presentaban blefaritis (Bukhari y cols., 2009; Herreras y cols., 1997). El SOS es una enfermedad frustrante debido a la escasez actual de terapias reales que puedan invertir, o, al menos, detener su progresión.

Las terapias tradicionales para el SOS se encuentran destinadas únicamente a provocar un aumento de la humedad de la superficie ocular, es decir, a la mejora exclusivamente de los signos y síntomas, pero no es capaz de modificar el curso natural de la enfermedad, debido a que no tienen en cuenta los mecanismos subyacentes que inician y mantienen el proceso de la enfermedad. La investigación actual dirige sus esfuerzos a conocer más en

profundidad la fisiopatología del SOS para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

La confusión creada por la terminología y las definiciones acerca de la enfermedad siempre es un problema en medicina. El SOS es un claro ejemplo de ello, y así se emplean diferentes términos, además del utilizado en éste capítulo (SOS), tales como: queratoconjuntivitis seca, queratitis filamentosa, enfermedad de ojo seco, ojo seco, sequedad ocular, superficie ocular y trastorno lagrimal (Sjögren y Bloch, 1971; Tseng y Tsubota, 1997), queratoconjuntivitis lagrimal (Pflugfelder y cols., 2004). Uno de los términos más recientes de la enfermedad es "disfuncional tear syndrome" (DTS) (Behrens y cols., 2006).

Las dificultades para establecer una definición ampliamente aceptada de SOS son evidentes, debido principalmente a la falta de una comprensión completa de la secuencia de eventos fisiopatogénicos y de los muchos factores que contribuyen a la patogenia del SOS. Desde la primera consideración del término "ojo seco", incluso antes de 1930 cuando Henrik Sjögren definió el Síndrome de Sjögren (refiriéndose a la tríada de ojo seco, sequedad de boca y dolor de las articulaciones) y por muchos años después, el SOS fue considerado como sequedad de ojos causada por una reducción de la capa acuosa de la película lagrimal (Sjögren y Bloch, 1971).

Con el paso del tiempo, esta definición se convirtió en obsoleta, debido a que se vio que existían otros factores que entraban en escena. Más tarde, la clasificación del SOS se basó en la alteración selectiva de una de las tres capas de la película lagrimal (Holly y Lemp, 1977), pero pronto se hizo evidente que en casi cualquier paciente con SOS estaba alterada más de una capa.

Además, el modelo de la película lagrimal constituido por tres capas ya quedó obsoleto y ya ha ganado reconocimiento una estructura de dos capas, un gel muco–acuoso con un gradiente de mucina cubierto por una capa de lípidos (Dilly, 1994). Este gel muco–acuoso es secretado por las glándulas lagrimales, el epitelio de la superficie ocular y las células caliciformes y está unido mediante enlaces químicos al glicocalix. Hoy se sabe que el fluido lagrimal es una mezcla compleja de muchas moléculas, principalmente mucinas, inmunoglobulinas, proteínas antimicrobianas y factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento regulan los procesos celulares mediante su interacción con receptores específicos de la superficie de las células. Por último, los cambios patológicos en los párpados, la córnea o la conjuntiva, que también puede alterar el funcionamiento normal de la película lagrimal, no fueron considerados a la hora de clasificarla en tres capas.

En 1995, el National Eye Institute/Industry Workshop on Dry Eye (NEI/DEWS) publicó una nueva definición y consideró que el SOS era "un trastorno de la película lagrimal debido a la deficiencia de la misma o exceso de evaporación de la lágrima que causa daños en la superficie ocular interpalpebral y se asocia con síntomas de discomfort" (Lemp, 1995). Esta definición trató de unificar todos los diferentes criterios y conocimientos hasta la fecha, realizando una importante contribución al considerar que el SOS no sólo significaba una deficiencia acuosa sino también una evaporación excesiva, implicando, por tanto, que la disfunción de las glándulas de Meibomio o blefaritis en general, constituye, en efecto, un tipo de SOS. Esta definición, sin embargo, no mencionaba el concepto de "enfermedad", sino más bien el concepto de "síntomas de malestar", lo cual pudo conducir a la comunidad oftalmológica a entender el SOS no como una verdadera enfermedad, sino tan solo como una

molestia. Además, debido a que esta definición es global, se pueden encontrar problemas como los siguientes:

1. Asume que el daño de la superficie ocular es interpalpebral, aunque en ocasiones se pueden encontrar también alteraciones en la zona superior.
2. El SOS habitualmente causa síntomas, sin embargo, pueden darse casos en los que aunque los signos sugieren la presencia de SOS, el individuo puede permanecer asintomático por un tiempo.
3. En algunos casos, a pesar de que exista una condición de SOS sugerida por los signos y síntomas, puede no detectarse una alteración de la superficie ocular con los métodos de los que se dispone actualmente.

Esta definición ha sido recientemente mejorada, debido a la inclusión de los nuevos conocimientos que existen actualmente acerca del papel que juegan la hiperosmolaridad lagrimal y la inflamación de la superficie ocular tanto en el SOS como en el efecto que tiene el mismo en la función visual. La actual definición de ojo seco es la siguiente (DEWS, 2007a): “ El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la superficie ocular que causa síntomas de incomodidad (Begley y cols., 2003; Adatia y cols., 2004; Vitale y cols., 2004), perturbación visual (Rieger, 1992; Liu y Pflugfelder, 1999; Goto y cols., 2002a) e inestabilidad lagrimal (Holly y Lemp, 1973; Bron, 2001; Goto y cols., 2003), con un daño potencial a la superficie ocular. Se acompaña de un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal (Farris y cols., 1986; Gilbard, 1994; Murube, 2006; Tomlinson y cols., 2006) e inflamación de la superficie ocular (Pflugfelder y cols, 1999; Tsubota y cols., 1999)”.

PREVALENCIA

El SOS es un trastorno inflamatorio muy prevalente, que afecta a millones de personas en todo el mundo, siendo uno de los principales motivos de consulta (Lemp, 1998). Constituye uno de los trastornos oftálmicos más comunes en la práctica clínica, afectando más a las mujeres que a los hombres. Sin embargo, las diferencias en las definiciones, los criterios de diagnóstico o de la población de estudio (voluntarios sanos, personas que acuden al optometrista, personas que acuden al oftalmólogo, etc.) presentan una gran variación en la prevalencia y la incidencia (Brewitt y Sistani, 2001). Por ejemplo, en una población de Australia, McCarty encontró una prevalencia del 10,8% cuando el diagnóstico se hacía por tinción positiva de rosa de bengala, un 16,3% cuando se empleó el test de Schirmer, un 8,6% empleando el tiempo de ruptura lagrimal (T-BUT) y un 1% si se empleaba la tinción con fluoresceína; sin embargo, cuando eran necesarios dos o más signos para hacer el diagnóstico, la prevalencia era de 7,4% (McCarthy y cols., 1998).

Uno de los estudios epidemiológicos más completo es el realizado en los EE.UU., en el año 2003, que evaluó una gran población de hombres (22.071) y mujeres (39.876) entre profesionales de la salud. Este estudio encontró una prevalencia para SOS en personas mayores de 55 años del 6,06% para las mujeres y del 2,79% para los hombres (Schaumberg y cols., 2003a,b).

Recientemente, el DEWS ha realizado un resumen acerca de la epidemiología del SOS, analizando entre otros datos, la incidencia y el predominio de la enfermedad en varias poblaciones, los factores de riesgo del SOS, la morbilidad de la enfermedad o el impacto del SOS sobre la calidad de vida y la función visual (DEWS, 2007b).

UNIDAD FUNCIONAL LAGRIMAL (LFU)

En la actualidad, y especialmente después de que el concepto de "superficie ocular" se introdujese en la comunidad oftalmológica (Thoft RA., 1978), que el SOS no es un problema exclusivo de la película lagrimal, sino de toda la superficie ocular en su conjunto. De hecho, este pensamiento ha avanzado más y en la actualidad se considera un término más amplio, la llamada "Unidad Funcional Lagrimal" (LFU) (Stern y cols., 1998a; Stern y cols., 1998b) (Pflugfelder y cols., 2004), formada por la superficie ocular, las glándulas lagrimales (principal y accesorias) y la inervación de interconexión entre ellas (ramas aferentes y eferentes), (Figura 1). Manejando este concepto, y los nuevos hallazgos etiopatogénicos que implican un trastorno inflamatorio de carácter inmune subyacente al SOS, Stern y cols consideraron que "la queratoconjuntivitis seca es el resultado de una respuesta inflamatoria localizada mediada por el sistema inmune que afecta a la LFU" (Stern y cols., 1998a). A partir de este concepto es fácil de entender que la alteración de cualquiera de los componentes de la LFU puede alterar finalmente la homeostasis de esta unidad en su conjunto y que si esta perturbación no se neutraliza pronto, dará lugar a un SOS (Rolando y Zierhut, 2001).

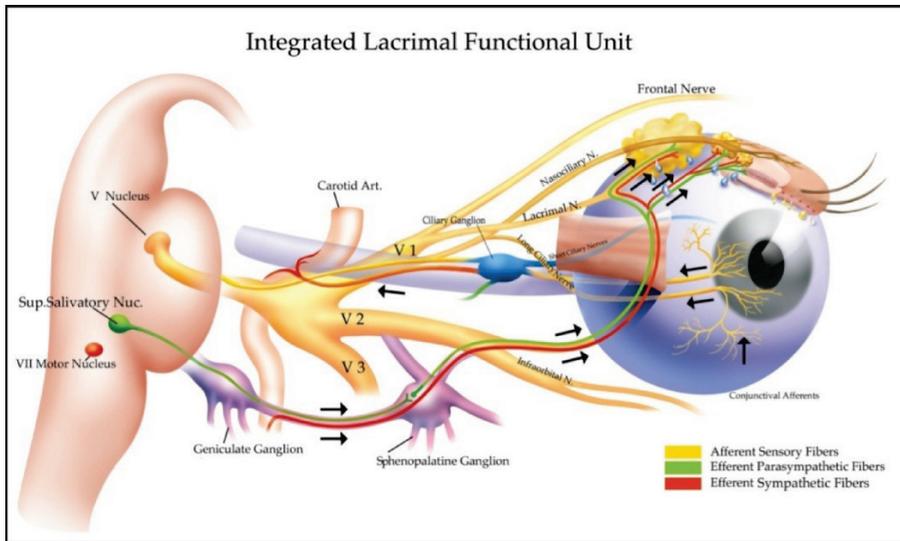


Figura 1. Unidad Funcional Lagrimal (LFU). Tomada de Pflugfelder, SC; Beuerman RW; Stern, ME, eds. *Dry Eye and Ocular Surface Disorders*. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.; 2004.

Por lo tanto, basándose en los conocimientos actuales y sobre este nuevo concepto de la LFU, se puede considerar que el SOS es una enfermedad inflamatoria inmune, crónica, de origen multifactorial que podría originarse en cualquiera de los componentes de la LFU y que, en algún momento, provoca los daños de la superficie ocular y la película lagrimal que se detectan con las pruebas convenientes.

TIPOS DE SOS

En 1995, representantes del Instituto Nacional de la Salud de EE.UU, de la Academia de Oftalmología, y de la industria farmacéutica pudieron, no sólo llegar a un consenso general sobre la definición de SOS (como se mencionó más arriba), sino que además acordaron una clasificación de SOS y la selección de las técnicas de diagnóstico más adecuadas (Lemp, 1995). Como

se ha mencionado anteriormente, en 2007, el DEWS publicó una nueva definición de ojo seco, recomendando también un sistema de clasificación de tres partes (Figura 2). La primera parte se centra en la clasificación etiopatogénica del SOS, dividiendo al mismo en ojo seco en deficiencia acuosa lagrimal y en ojo seco evaporativo. La segunda parte muestra como cualquier forma de ojo seco puede actuar agravando otras formas de la patología, como un círculo vicioso. También presenta un esquema final (Figura 3) basado en la severidad del ojo seco, a fin de ayudar a proporcionar unas bases para un tratamiento adecuado a cada paciente (DEWS, 2007a).



Figura 2. Principales causas etiológicas del SOS. Tomada de DEWS. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007a). *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92.

El SOS hiposecretor parece ser la categoría más frecuente de SOS, y a la que se refiere el término SOS si no se especifica algo más. El SOS hiposecretor se divide a su vez en dos subcategorías: Sjögren y no Sjögren. El síndrome de

Sjögren es una enfermedad de origen autoinmune en la que las glándulas exocrinas se ven afectadas, produciendo sequedad de las mucosas. Existen varias formas de SOS hiposecretor no Sjögren, como enfermedades de la glándula lagrimal principal (falta congénita, sarcoidosis...), obstrucción de las zonas de drenaje de las glándulas lagrimales (conjuntivitis cicatrizantes, quemaduras...) y pérdida del reflejo de lagrimeo (disminución de la sensibilidad corneal por el uso de lentes de contacto o por una queratitis neurotrófica...).

En el SOS evaporativo, la función lagrimal es normal (el volumen, la secreción y el drenaje de lágrima son normales), pero existe una anomalía lagrimal originada por alguna enfermedad periocular que provoca una mayor evaporación de la lágrima. A su vez, esta categoría tiene cuatro diferentes causas u orígenes: blefaritis anteriores y posteriores, disfunción de las glándulas de Meibomio (meibomitis), anomalías del parpadeo (disminución de parpadeo, incongruencia párpado – globo ocular o proptosis), anomalías de la superficie ocular (falta de humectación de la superficie, como ocurre en la xeroftalmía) o causas indeterminadas como por ejemplo el aumento de evaporación de la película lagrimal por el uso de lentes de contacto Vishnubhatla y cols., 2012). De todos ellos, las blefaritis son, sin duda, la causa más frecuente (Bukhari y cols., 2009).

Cada una de estas alteraciones puede provocar el SOS de forma aislada o concurrir varias a la vez. Por ejemplo, es muy frecuente que pacientes con síndrome de Sjögren (SOS con deficiencia lagrimal) presenten concomitantemente, y por lo general de forma intensa, un componente de alteración de las glándulas de Meibomio (tipo evaporativo); por el contrario, pacientes con blefaritis crónica (tipo evaporativo) pueden desarrollar un componente de deficiencia lagrimal (Herrerías y cols., 1997; Driver y Lemp, 1996; Shimazaki y cols., 1998). Estas asociaciones y la superposición son de

suma importancia para los fines terapéuticos, porque a menos que todos los componentes sean diagnosticados y tratados adecuadamente, no es probable que la condición del paciente mejore.

DIAGNÓSTICO

Con el fin de clasificar y tratar adecuadamente el SOS, debe hacerse en primer lugar un diagnóstico exacto para evitar confundir el SOS con otras entidades (por ejemplo alergias), lo que conduciría a poder pasar por alto el SOS durante años. Es esencial la selección de cuestionarios clínicos apropiados que puedan reflejar el tipo y la intensidad de los síntomas (ardor, sensación de cuerpo extraño, etc), sus posibles variaciones diurnas y/o estacionales, y su relevancia e impacto en la vida de la paciente. Además, es esencial seleccionar el conjunto de pruebas diagnósticas apropiadas (Lemp., 1995; Bron., 2001; DEWS, 2007c), de forma que: 1) el diagnóstico de SOS pueda ser o no confirmado, y 2) si el SOS es el diagnóstico definitivo, el paciente pueda ser clasificado en el subtipo más adecuado.

En muchas ocasiones el diagnóstico del SOS se basa en la realización de pruebas tradicionales como el test de Schirmer, T-BUT o el uso de tinciones vitales (DEWS, 2007a; Nichols y cols., 2000). El problema que tienen estas pruebas clínicas es que su variabilidad es tan grande y los resultados están tan influidos por agentes externos (humedad, temperatura ambiente o el uso de anestésicos) (Herreras y cols., 1997; Nichols y cols., 2004; González-García y cols., 2007) que hacen que el resultado obtenido por un solo test no sea suficiente para el diagnóstico. Se ha visto que resulta más adecuado utilizar varios tests diagnósticos para la detección del SOS que la realización de un único test (Pflugfelder y cols., 1998). Pero también se ha encontrado una

baja correlación entre los diferentes tests para el diagnóstico de SOS (Saleh y cols., 2006; Moore y cols., 2009), especialmente con la sintomatología (Pflugfelder y cols., 2004). Sin embargo, hay algunos como el test de aclaramiento lagrimal, las tinciones con fluoresceína o rosa de Bengala y los índices topográficos de regularidad de la superficie, que parecen correlacionar mejor con la severidad de los síntomas de irritación ocular (Macri y cols, 2000; Alfonso y cols., 1999; Macri y Pflugfelder, 2000; de Paiva y cols., 2003).

Se han descrito otros tipos de tests que evalúan la composición lagrimal (osmolaridad, concentración de lisozima) o su eliminación (test de aclaramiento lagrimal) que muestran una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del SOS que otros tests más implantados en la clínica (Lemp., 1995; Macri y Pflugfelder, 2000; van Bijsterveld., 1969; Tomlinson y cols., 2006).

TRATAMIENTOS

Debido a la naturaleza multifactorial del SOS y la consiguiente complejidad que conlleva su diagnóstico, el tratamiento de esta enfermedad es también complejo y, desgraciadamente, está lejos de ser satisfactorio para los pacientes que presentan SOS moderado o grave. El SOS constituye uno de los problemas más frustrantes, debido a que las terapias actuales no consiguen curar o detener la evolución de la enfermedad, y son únicamente capaces de aliviar los signos y síntomas. A continuación se resumen las diferentes opciones terapéuticas.

Terapias de sustitución y preservación / Estimulación lagrimal

Estos enfoques para el tratamiento del SOS están destinados a proporcionar más humedad a la superficie ocular mediante la sustitución, la preservación y/o la estimulación de la lágrima natural. Los estudios publicados sobre estas terapias son muy numerosos y amplios (Bron, 1997; Lemp, 1999; Calonge, 2001).

Sustitución lagrimal: la sustitución de la lágrima natural por lágrimas artificiales y lubricantes es, con mucho, la forma más habitual y también la primera línea de tratamiento del SOS. Este tipo de tratamiento intenta mejorar la lubricación de la superficie ocular proporcionando una mayor humedad mediante un suministro “externo”, con el fin de aliviar los síntomas del paciente y mejorar los signos. Las lágrimas artificiales contienen, por lo general, polímeros como sustancias hidratantes y lubricantes, además de tampones, estabilizadores y conservantes (salvo en las formulaciones sin conservantes) (Holly y Lemp., 1977; Calonge., 2001). Sin embargo, es evidente que ninguna de las formulaciones que se encuentran actualmente disponibles en el mercado puede ser similar a la película lagrimal natural. Las limitaciones que presentan las lágrimas artificiales y los lubricantes actuales se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Únicamente los esfuerzos para sustituir la capa acuosa de la película lagrimal han logrado tener cierto éxito, mientras que los esfuerzos para tratar de sustituir las mucinas o los lípidos han sido muy escasos.

2. La sustitución de la fase acuosa ha sido realizada empleando varios líquidos y polímeros; sin embargo, esta fase de la película lagrimal contiene varios iones (algunos de ellos sí están presentes en ciertas formulaciones comerciales) (Gilbard y cols., 1989), factores de crecimiento, nutrientes o productos del sistema inmune, de los que las lágrimas artificiales no se encuentran provistos.
3. La arquitectura tridimensional de la película lagrimal no puede ser reproducida únicamente por la adición en forma de gota de varios componentes a la superficie ocular.
4. Las lágrimas artificiales son administradas a intervalos; sin embargo, la película lagrimal natural se está produciendo continuamente.

Tratando de superar los inconvenientes ya mencionados, los investigadores continúan buscando soluciones más adecuadas para la sustitución de la película lagrimal natural. Hace algunos años, los electrolitos y la osmolaridad de la película lagrimal demostraron ser esenciales para mantener sana la superficie ocular. Debido a ello, se introdujeron en el mercado soluciones hipotónicas con electrolitos en su composición (Gilbard y cols., 1989). En esta misma línea y tratando de suministrar a la superficie ocular factores biológicos contenidos en la película lagrimal natural, se observó un beneficio en pacientes con queratoconjuntivitis seca tratados con lágrimas artificiales enriquecidas con suero autólogo (Fox y cols., 1984). Recientemente se ha comprobado en pacientes con Síndrome de Sjögren en los que el tratamiento con suero autólogo puro fue el más eficaz en la disminución de síntomas y de la epitelopatología, mientras que en pacientes sin Síndrome de Sjögren, el suero autólogo puro y un 50% de suero con solución salina normal tenían efectos similares en estos pacientes (Cho y cols., 2012). Ciertamente, serían

necesarios ensayos clínicos aleatorios y doble ciego para demostrar si el suero autólogo es más beneficioso que las lágrimas artificiales existentes para el tratamiento del SOS y/o de los defectos epiteliales corneales persistentes. Desde el momento en el que se ha buscado proporcionar a la superficie ocular los factores necesarios para la diferenciación y proliferación normal de las células epiteliales, se han realizado numerosos estudios acerca de la aplicación tópica de la Vitamina A y derivados del retinol que muestran resultados controvertidos (Calonge, 2001).

En cuanto a la sustitución de la capa mucosa, la cual se encuentra alterada en cualquier grado de SOS (Bron, 1997), se han realizado algunos intentos encaminados a solucionar la alteración de esta capa a través de los llamados polímeros bioadhesivos o mucoadhesivos (Kaur y Smitha, 2002), como el quitosano (De Campos y cols., 2001), o los sistemas biopoliméricos de polivinilpirrolidona o ácido poliacrílico (Oechsner y Keipert, 1999) que, al mismo tiempo, tratan de mejorar la liberación de fármacos a la superficie ocular. El uso de agentes mucolíticos, como por ejemplo la acetilcisteína, se empleaban clásicamente en SOS severos en los que la excesiva cantidad de hilos de moco provocan dolor. Sin embargo, no existen estudios recientes acerca de la tolerancia y los efectos beneficiosos del uso tópico de este compuesto en comparación con las lágrimas artificiales sin conservantes más recientes.

También se han realizado intentos de sustitución de la capa lipídica mediante la aplicación de preparados a base de lípidos, formulados generalmente como pomadas (Lemp, 1999), de aplicación únicamente nocturna debido al emborronamiento que producen. Años atrás, la utilización de lípidos ya había sido propuesta en lágrimas artificiales (Rieger, 1990; Tiffany, 1991) y, más recientemente, dos soluciones con contenido en lípidos anfipáticos aplicadas

en voluntarios sanos demostraron un buen perfil de seguridad y tolerabilidad (Dinslage y cols., 2002; Peters y cols., 2003). Últimamente, se ha demostrado que unas lágrimas artificiales con una baja concentración de aceite de ricino homogeneizado en su concentración mejoraban a corto plazo los signos y síntomas de la disfunción de las glándulas de meibomio de forma segura (Goto y cols., 2002b) y que las gotas de aceite de ricino logran un tiempo de residencia en la superficie ocular de al menos cuatro horas después de la instilación, una producción lagrimal más estable y una disminución significativa de los síntomas oculares (Maïssa y cols., 2010).

Recientemente, se está agregando suero autólogo a las lágrimas artificiales, tratando de incorporar factores naturales existentes en el plasma que ayuden a mejorar su composición asemejándolas más a la lágrima natural. (López-García y cols., 2007; Noda-Tsuruya y cols., 2006; Kojima y cols., 2005)

En resumen, la sustitución de las lágrimas siempre será necesaria en pacientes con SOS y, aunque existen problemas insalvables para lograr imitar la película lagrimal natural, es necesario suministrar humedad a la superficie ocular de estos pacientes ayudándoles a mantener la superficie ocular hidratada y lubricada.

Preservación lagrimal: otra forma de mantener la humectación de la superficie ocular consiste en retardar la eliminación de la propia lágrima. La estrategia más utilizada es la de ocluir los puntos lagrimales o bien bloquear los canalículos del sistema de drenaje lagrimal, para lo que se pueden emplear diversas técnicas, tales como la quirúrgica, térmicas, láser o, lo más empleado, la inserción de polímeros a modo de “tapones” (Murube y Murube, 1996; Calonge, 2001; Nava-Castaneda y cols., 2003).

La controversia que presentan todos estos procedimientos siguen siendo las desventajas y los efectos secundarios que parecen tener. Uno de ellos es el hecho, ya conocido, de que la oclusión del drenaje lagrimal natural disminuye el aclaramiento y el volumen de renovación lagrimal (ya de por sí disminuida en el SOS), lo que permite que las citoquinas proinflamatorias presentes en la película lagrimal inflamada dispongan de un tiempo de contacto con el epitelio más prolongado, pudiendo por ello provocar un aumento de la inflamación (Yen y cols., 2001). Hay estudios que indican que tras la oclusión del drenaje lagrimal natural aparece una mejora de la sintomatología y de la tinción conjuntival, sin embargo, no se encuentran cambios reales en la lágrima del paciente (Mansour y cols., 2007). Por lo tanto, este enfoque no farmacológico sería más adecuado una vez que la inflamación haya desaparecido y, de hecho, la oclusión de los puntos lagrimales parece tener una mayor eficacia cuando se realiza después del tratamiento con corticoesteroides (Sainz de la Maza Serra y cols., 2000).

Estimulación lagrimal: durante mucho tiempo se ha intentado realizar la estimulación de la película lagrimal natural mediante fármacos. La eficacia de algunos de ellos (p.ej. eledoisina) no ha sido demostrada apropiadamente y casi nunca se utilizan (Calonge, 2001). Un medicamento empleado en el tratamiento de la úlcera gástrica y la gastritis llamado gefarnato, parecía estimular la secreción de mucina, como glicoproteínas, y reducir la sequedad del epitelio corneal (Nakamura y cols., 1997) así como estimular la secreción mucosa tras producir una lesión por álcalis en la conjuntiva tarsal de primates (Toshida y cols., 2002). La posible aplicación para el SOS de éste y de otros fármacos similares está aún por demostrar. La estimulación de los receptores muscarínicos con fármacos como la pilocarpina o la cevimelina oral (Vivino y cols., 1999; Fox y Michelson, 2000), han demostrado que mejoran la

producción lagrimal en pacientes con síndrome de Sjögren, aunque su verdadera eficacia a largo plazo en el tratamiento del SOS continúa sin ser estudiada, debido a que ambos fármacos aún no han sido aprobados en muchos países y, por lo tanto, su uso no se ha generalizado en la comunidad oftalmológica.

Otros secretagogos o lagrimomiméticos tópicos, como el agonista receptor P2Y₂, están siendo investigados como estimuladores de la secreción de fluidos lagrimales (Murakami y cols., 2000) y de secreción de mucina (Fujihara y cols., 2002; Peral y cols., 2008). En general, la estimulación farmacológica de la película lagrimal natural debería realizarse cuando en la superficie ocular no existiera inflamación, ya que, de otro modo, estos agentes estimularían la producción de lágrimas pro-inflamatorias que empeorarían la situación. Por lo tanto, y al menos en teoría, su papel debe ir siempre detrás del tratamiento antiinflamatorio.

Terapias antiinflamatorias

Las estrategias descritas anteriormente son más paliativas que terapéuticas, ya que únicamente suministran a la superficie ocular más humectación y, en algunos casos, algunos factores biológicos que se encuentran normalmente presentes en las lágrimas. Aunque estos enfoques son de indudable valor, no logran abordar el problema etiológico subyacente. Hoy está ampliamente aceptado que la causa del SOS es multifactorial y que de los múltiples y delicados mecanismos reguladores hormonales y neuronales que mantienen la homeostasis de la superficie ocular, incluida la película lagrimal, pueden alterarse, originando posteriormente el SOS. Debido al gran conocimiento que se tiene acerca de la etiopatología del SOS, parece razonable que las nuevas

estrategias terapéuticas se dirijan, no sólo a paliar, sino también a corregir la fisiopatología subyacente.

El hecho revolucionario que ha cambiado el concepto de SOS ha sido la hipótesis ya probada de que el SOS es una condición inflamatoria inmunológica (Stern y cols., 1998a). Este hecho se ha demostrado en la glándula lagrimal de pacientes con Síndrome de Sjögren (Williamson y cols., 1973), pero hace algunos años, se demostró también, no sólo en la glándula lagrimal, sino en el tejido conjuntival de perros que sufrían espontáneamente de SOS (sin afectación sistémica) (Gao y cols., 1998). Pero además, estas mismas conclusiones han sido demostradas en seres humanos, y no sólo en pacientes con SOS asociado a Síndrome de Sjögren sino también en SOS no Sjögren (Kunert y cols., 2000; Baudouin y cols., 2000; Turner y cols., 2000; Stern y cols., 2002). Paralelamente, otras investigaciones han demostrado la importancia de los andrógenos en el mantenimiento tanto de la superficie ocular como de las glándulas lagrimales sin inflamación (Sullivan y cols., 1999; Krenzer y cols., 2000).

Con la ayuda de las conclusiones anteriormente citadas, se creó la denominada “teoría unificada” (Stern y cols., 1998b) que explica que el SOS se produciría cuando caen los niveles de andrógenos sistémicos o locales (normalmente como parte del envejecimiento, y especialmente en la menopausia) por debajo del umbral crítico necesario para el mantenimiento de la ULF y, en consecuencia, se genera un entorno pro-inflamatorio (primer “estímulo”). Esto facilita que la superficie ocular (de hecho, toda la LFU) pueda llegar fácilmente a irritarse debido a un segundo “estímulo”: factores ambientales adversos (Abusharha y Pearce, 2012), aumento de la osmolaridad lagrimal (Julio y cols., 2012), uso de lentes de contacto (Kojima y cols., 2011), uso crónico de medicamentos tópicos (Mantelli y cols., 2011), cualquier

enfermedad inflamatoria de la superficie ocular, traumatismos, etc.), originando la inflamación y, por tanto, favoreciendo la secreción de citoquinas inflamatorias (Pflugfelder y cols., 1999; Solomon y cols., 2001), que interfieren en las conexiones neuronales normales conduciendo a la pérdida del reflejo lagrimal.

Esta disfunción neuro-humoral permite la presentación de antígenos en la glándula lagrimal y en la superficie ocular, provocando la infiltración linfocítica y el consiguiente aumento de la apoptosis de las células epiteliales secretoras (Gao y cols., 1998; Yeh y cols., 2003), conduciendo así posteriormente a la disfunción de la película lagrimal y a la sequedad crónica. Además de la disminución de los andrógenos, otros factores que pueden provocar una disfunción de la LFU (Stern y cols., 1998a) pueden ser enfermedades de la superficie ocular que alteran la inervación de la misma o tienen una duración lo suficientemente larga como para destruir las glándulas lagrimales (especialmente la conjuntivitis cicatrizante), cirugías de la superficie ocular (p.ej. LASIK), enfermedades inflamatorias sistémicas con afectación de la superficie ocular (enfermedades inflamatorias del colágeno) o cualquier condición que pueda alterar el arco neuronal que controla la producción y distribución lagrimal (Heigle y Pflugfelder, 1996; Bacman, y cols., 2001; Battat y cols., 2001).

Resumiendo, la inflamación inmune y la posterior alteración de la apoptosis, son los mecanismos claves del daño tisular como causa y/o consecuencia del daño celular. Por lo tanto parece lógico pensar que la terapia antiinflamatoria y/o inmunomoduladora y las terapias anti-apoptóticas puedan jugar un papel importante en el tratamiento del SOS.

Tetraciclinas orales y sus derivados

Las tetraciclinas son unos antibióticos que han demostrado tener importantes e interesantes propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. En los tejidos oculares, las tetraciclinas o sus derivados semisintéticos como la doxiciclina y la minociclina han demostrado inhibir la producción de lipasa en pacientes con meibomitis por estafilococo (Dougherty y cols., 1991; Shine y cols., 2003). Además, han demostrado disminuir varias moléculas inflamatorias en la lágrima en pacientes con SOS (Pflugfelder, 2003; Paiva y Pflugfelder, 2008).

Corticoesteroides tópicos

Los corticoesteroides se encuentran entre los agentes más eficaces utilizados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias no infecciosas, especialmente las mediadas por el sistema inmune. El beneficio de los corticoesteroides tópicos sin conservantes en el tratamiento del SOS ya ha sido demostrado. En un estudio en el que fueron analizados retrospectivamente los síntomas y el retraso en el aclaramiento lagrimal en pacientes con SOS, se observó una mejoría de los síntomas y de las tinciones en el 83% y en el 80% de los casos respectivamente, mientras que el retraso en el aclaramiento lagrimal volvió, en todos los casos, a valores normales (Prabhasawat y Tseng, 1998). En 2004, Pflugfelder (Pflugfelder, 2004) realizó una exhaustiva revisión bibliográfica buscando evidencias que establecieran la relación entre la inflamación y el ojo seco con el fin de apoyar el uso de la terapia antiinflamatoria en esta patología. Encontró numerosos estudios que mostraban la inflamación en la patogénesis del SOS y revisó numerosos ensayos clínicos acerca del uso de terapias antiinflamatorias que indicaban que tanto la inflamación de la glándula lagrimal, como de la superficie ocular habían sido identificadas en el SOS, jugando ésta un papel fundamental en la

patogénesis de la queratoconjuntivitis sicca y que, además, la terapia antiinflamatoria tenía eficacia para el tratamiento de la misma mejorando los signos y síntomas y siendo seguro su uso a largo plazo.

Ciclosporina (CsA) A tópica

En el campo específico del SOS, la CsA tópica ha demostrado ser beneficiosa en pacientes con SOS asociado a Síndrome de Sjögren primario (Drosos y cols., 1986). Poco después, se demostró su gran beneficio en perros que sufrían espontáneamente enfermedades de la superficie ocular asociadas a SOS, incrementando la producción lagrimal e induciendo la regresión de la neovascularización corneal, de las cicatrices y de la pigmentación (Kaswan y cols., 1989; Olivero y cols., 1991). Enseguida se obtuvieron resultados prometedores en humanos que padecían SOS gracias a pequeños ensayos clínicos randomizados y doble ciego llevados a cabo en un único pequeño centro, en el que se probaron varias concentraciones de CsA diluidas en diferentes aceites vegetales (Laibovitz y cols., 1993; Gunduz y Ozdemir, 1994).

Pero no fue hasta que Stern y cols (Stern y cols., 1998a) y Gao y cols (Gao y cols., 1998) estudiaron ampliamente la naturaleza de la afectación crónica espontánea de SOS en los perros cuando se definió el efecto de la CsA tópica en la inflamación de los tejidos conjuntivales y de las glándulas lagrimales accesorias.

Basándose en estos resultados alentadores, y sobre todo, en los estudios previos mencionados, se estaba empezando a considerar el SOS, no sólo el SOS Sjögren, sino también la forma no Sjögren, como un trastorno inflamatorio de tipo inmune (Stern y cols., 1998a), lo que justificaba los ensayos clínicos con CsA tópica. La emulsión de CsA oftálmica ha sido ya aprobada por la "Food and Drug Administration" (FDA) de EE.UU, mediante varios ensayos

clínicos multicéntricos, randomizados y doble ciego (Sall y cols., 2000), También se encuentra disponible en otros países, aunque no en la Unión Europea.

En resumen, la aparición de la CsA tópica en el arsenal terapéutico para el tratamiento del SOS ha repercutido directamente en demostrar que la inflamación local que presentan estos pacientes en la glándula lagrimal y en la superficie ocular está mediada por el sistema inmune. Los estudios más recientes parecen indicar que existe una mejoría en los signos y síntomas del SOS crónico tras el tratamiento con CsA tópica, pudiendo indicar que este tratamiento favorece la disminución de la inflamación existente en el SOS (Stonecipher y cols., 2005; Steven y cols., 2007; Jain y cols., 2007; Moon y cols., 2007), siendo un tratamiento que parece seguro y que es bien tolerado por los pacientes (Barber y cols., 2005). Pero debido a que a medida que se va empleando el medicamento se está adquiriendo más experiencia, aún existen algunos aspectos que requerirán de nuevas aclaraciones, (por ejemplo, si puede ser usado para el tratamiento del SOS evaporativo, si debe ser prescrito tan pronto como sea diagnosticada la enfermedad o únicamente en los casos de tipo moderado – grave, la duración de la terapia, etc.) aunque se espera que ejerza implicaciones favorables clínicas y económicas tanto en los pacientes como en los sistemas de salud (Cross y cols., 2002).

Hormonas sexuales antiinflamatorias

La clara relación entre el SOS y el sexo, el envejecimiento y los esteroides sexuales es bien conocida. La relación entre las hormonas sexuales y la superficie ocular y las glándulas lagrimales se pone de manifiesto por la presencia (frecuentemente relacionados con el sexo) de los receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos existentes en la glándula lagrimal, las

glándulas de meibomio, la conjuntiva y la córnea (He y cols., 2006; Versura y cols., 2007; Erdem y cols., 2007).

Aunque algunos autores reportan efectos beneficiosos de la terapia de sustitución de estrógenos en la sintomatología de SOS (Reinhard y cols., 2002), existe una creciente evidencia sobre la correlación negativa entre la función lagrimal y los estrógenos durante la postmenopausia (Mathers y cols., 1998). Teniendo en cuenta estos resultados, parece que los estrógenos locales no serían un candidato adecuado para el tratamiento del SOS; sin embargo, la asociación entre deficiencia androgénica y el desarrollo de SOS parece más evidente, ya que los receptores de andrógenos se encuentran ampliamente distribuidos por la superficie ocular y las glándulas lagrimales y es necesario unos niveles mínimos (umbrales) de andrógenos sistémicos para el mantenimiento del estado normal (no inflamado) de la superficie ocular. (Leung y Bloom, 2003; Messner y Leibowitz, 1971; Newton y cols., 1998). Además, los niveles de andrógenos disminuidos se han implicado en el desarrollo de diversas formas de SOS (Laine y cols., 2007; Mantelli y cols., 2007) y, por último, la terapia con andrógenos sistémicos suprime la inflamación y estimula la función de la glándula lagrimal en modelos femeninos de ratón con síndrome de Sjögren (Nelson y cols., 2000).

Estas pruebas suponen un apoyo de gran valor a los andrógenos como hormonas antiinflamatorias en el tratamiento del SOS, tanto evaporativo como hiposecretor (Novak y cols., 2002), sin embargo, no existen estudios aún del uso tópico de andrógenos en humanos como terapia potencial del SOS.

Estado actual del tratamiento del SOS

Hasta ahora, ninguna medicación ha demostrado que cure o detenga la progresión del SOS, por lo que el principal objetivo de los tratamientos actuales disponibles en el mercado es la mejoría de los signos y el alivio de los síntomas. Actualmente, la elección del agente terapéutico para el tratamiento del SOS suele basarse en la gravedad del mismo. La clasificación realizada por el DEWS (DEWS, 2007a), suele ser la más empleada (Figura 3), tanto en los estudios como en la clínica, para clasificar a los pacientes con SOS.

Tabla 5. Esquema para la calificación de la gravedad del ojo seco

Nivel de gravedad del ojo seco	1	2	3	4*
Incomodidad, gravedad y frecuencia	Leve y/o episódico; ocurre bajo estrés ambiental	Episódico o crónico moderado, con o sin estrés	Frecuente o constante grave sin estrés	Severo y/o discapacitante y constante
Síntomas visuales	Ninguno o fatiga episódica leve	Episódico molesto y/o limitante	Molesto, crónico y/o constante, limitante	Constante y/o posiblemente discapacitante
Inyección conjuntival	Ninguno a leve	Ninguno a leve	+/-	+/++
Tinción conjuntival	Ninguno a leve	Variable	Moderado a marcado	Markado
Tinción corneal (severidad/ubicación)	Ninguno a leve	Variable	Central marcado	Erosiones punteadas severas
Signos corneales/lagrimales	Ninguno a leve	Desechos leves, ↓ menisco	Queratitis filamentosa, agregación de moco, ↑ desechos en las lágrimas	Queratitis filamentosa, agregación de moco, ↑ desechos en las lágrimas, ulceración
Párpado/Glándulas de meibomio	MGD variablemente presente	MGD variablemente presente	Frecuente	Triquiasis, queratinización, simbléfaron
TFBUT (seg)	Variable	≤10	≤5	Inmediato
Puntuación de Schirmer (mm/5 min)	Variable	≤10	≤5	≤2

*Debe presentar signos y síntomas. TFBUT: tiempo de ruptura lagrimal con fluoresceína. MGD: disfunción de la glándula de meibomio
 Reimpreso con permiso de Behrens A, Doyle JJ, Stern L y col. Dysfunctional tear syndrome. A Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea* 2006;25:90-7

Figura 3. Esquema para la clasificación de la gravedad del SOS. Tomada de Tomada de DEWS. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007a). *Ocul Surf* 2007;5(2):75-92.

En los casos leves de SOS, cuando el paciente presenta síntomas pero hay ausencia de tinciones vitales en córnea o conjuntiva, el único tratamiento que

se ofrece al paciente suelen ser las lágrimas artificiales. Muchos autores consideran que las lágrimas artificiales pueden llevar conservantes si no se aplican más de cuatro veces al día; sin embargo, otros autores opinan que puede ser beneficioso que las lágrimas artificiales aplicadas en una superficie ocular enferma deben ser formuladas sin conservantes.

En el caso de SOS moderado, con presencia de signos en córnea y/o conjuntiva, los pacientes incrementan la demanda de uso de las lágrimas artificiales (siendo ya necesario el uso sin conservantes) hasta una gota cada 1-2 horas, o incluso con mayor frecuencia; y suele emplearse una pomada o agente lubricante más denso y sin conservantes a la hora de acostarse. En esta etapa, aunque está bajo debate, también se considera la oclusión de los puntos lagrimales u otro método de conservación lagrimal.

En los SOS severos, que presentan una tinción extensa de la superficie ocular y complicaciones tales como defectos epiteliales persistentes, filamentos o infecciones secundarias que suponen un riesgo más grave, se consideran, además de las estrategias anteriormente mencionadas, todos los tratamientos disponibles actualmente para aumentar la producción lagrimal natural. Recientemente, y únicamente en casos de SOS severo, también se consideran otros métodos como la aplicación a corto plazo de esteroides tópicos sin conservantes. Las soluciones hasta ahora disponibles son claramente insuficientes, especialmente en los casos graves, por lo que actualmente se está produciendo un rápido cambio de las opciones paliativas existentes hacia los métodos terapéuticos que ya existen en el mercado (p.ej. Cs A tópica). El hecho de que éste fármaco sea indicación en SOS moderado en unos países y en los graves en otros, está condicionado por la facilidad de su adquisición o no, respectivamente.

II. FACTORES AMBIENTALES Y SOS

Como se ha mencionado anteriormente, el DEWS (2007) ya contemplaba la influencia del entorno en el SOS. En la Figura 2 de este manuscrito (página 14), se observa un cuadro situado a la izquierda, en el que se ilustra la influencia del ambiente, tanto interior como exterior, sobre el riesgo que tiene un individuo de desarrollar ojo seco (DEWS, 2007a).

El término “ambiente” es utilizado por el DEWS en un sentido amplio, para incluir los estados corporales que habitualmente experimenta un individuo, ya sea que refleje su “ambiente interno” o el “ambiente externo” (DEWS, 2007a).

Ambiente interno

Dentro del término “ambiente interno” se engloban factores intrínsecos a la persona, tales como la ingesta de algunos medicamentos sistémicos (ej. diuréticos o medicamentos psicotrópicos) que afectan y alteran la LFU, los niveles de andrógenos (ver “Tratamientos: hormonas sexuales antiinflamatorias”, página 76 de este manuscrito), el envejecimiento o la anatomía palpebral del individuo (DEWS, 2007a). Asimismo, incluye algunos factores ocupacionales que alteran o influyen a un factor intrínseco del individuo (como la frecuencia de parpadeo), como es una iluminación inadecuada o el uso, cada vez más frecuente, de pantallas de visualización de datos (PVD) (Wolkoff y cols., 2003).

Existe una estrecha relación entre la frecuencia de parpadeo y la estabilidad lagrimal (T-BUT) ampliamente estudiada y conocida (Collins y cols., 1989; Nakamori y cols., 1997; Prause y Norm., 1987; Yap, 1991), así como entre la estabilidad lagrimal y la posición de mirada (Pansell y cols., 2007). Además de la calidad de la lágrima, un parpadeo correcto y una frecuencia adecuada del mismo son esenciales para mantener la película lagrimal estable (Wolkoff y cols., 2005), asegurando así una protección para la superficie ocular. Cuando la frecuencia de parpadeo disminuye o se suprime, es decir, existe un mayor tiempo entre parpadeos, la película lagrimal se adelgaza (Palakuru y cols., 2007; Yee y cols., 2007), produciendo en consecuencia un incremento de la evaporación de la lágrima. El aumento de la evaporación del agua de la película lagrimal acelera la desecación de la superficie ocular, provocando en consecuencia una hiperosmolaridad lagrimal (Foulks, 2007; Wolkoff y cols., 2005), lo que posiblemente pueda inducir también una respuesta inflamatoria de las glándulas lagrimales (Blehm y cols., 2005; Stern y Pflugfelder, 2004). Además, la disminución de la estabilidad lagrimal; es decir, la ruptura precoz de la película lagrimal entre parpadeo y parpadeo da lugar a una mala o inadecuada cobertura de la misma (Craig y Tomlinson, 1997), lo que puede conllevar a la aparición de puntos de sequedad en la superficie ocular, especialmente en la córnea y, por tanto, daño corneal (Golding y cols., 1997; Miller y cols., 2002; Ye y cols., 2007), así como una mala calidad óptica (Koh y cols., 2008).

El uso de las PVD ha sido identificado como una de las principales causas de disminución en la frecuencia del parpadeo, lo que representa un riesgo de ojo seco (Tsubota y Nakamori, 1993). Varios autores han estudiado la influencia de diferentes actividades en la frecuencia de parpadeo. Doughty (Doughty, 2001) realizó un análisis retrospectivo de la tasa de parpadeo de individuos

normales bajo diferentes actividades (lectura y uso de PVD, en posición primaria de mirada y durante una conversación), encontrando que el ratio de parpadeo espontáneo durante la lectura es menor que el encontrado en los individuos en posición primaria de mirada y mayor cuando los sujetos están en la conversación. Otros autores encontraron que la frecuencia de parpadeo se reduce en un factor de entre 2 y 3 veces durante el trabajo con una PVD en comparación con una situación relajada, y que tras el cese de una tarea con una PVD aparecen ráfagas de parpadeo, probablemente como reflejo compensatorio de la supresión o disminución del parpadeo durante un tiempo prolongado, con el fin de restablecer la película lagrimal (Nielsen y cols., 2008; Yamada, 1998). Por lo tanto es importante entender el impacto conjunto de los factores fisiológicos y ergonómicos para el desarrollo de sintomatología ocular.

Además, la estabilidad de la película lagrimal durante el uso de PVD se encuentra fuertemente influenciada por la posición de la PVD. Diferentes estudios han señalado que una posición de mirada superior durante el trabajo con PVD provoca un aumento de la frecuencia de parpadeo (Nakamori y cols., 1997; Nielsen y cols., 2008), así como una disminución significativa de la estabilidad lagrimal (T-BUT) (Pansell y cols., 2007). La posición de la PVD también influye en el área ocular expuesta. Una posición de mirada superior provocará un aumento de la superficie ocular expuesta al ambiente, especialmente de la córnea, lo que facilita la evaporación de la película lagrimal (Nielsen y cols., 2008).

Por lo tanto, las actividades asociadas con una menor tasa de parpadeo y un incremento en la apertura palpebral, como mirar hacia arriba o el trabajo con PVD conllevan un riesgo de desarrollo del SOS al generar una demanda visual y cognitiva alta, lo que aumenta la concentración provocando una disminución de la tasa de parpadeo (Nakazawa y cols., 2002; Wolkoff y cols., 2006a).

Ambiente externo

El “ambiente externo” engloba los aspectos relacionados con los ambientes en los que se encuentra el individuo, tanto dentro de los edificios (ambientes artificiales) como al aire libre, que pueden representar factores de riesgo para el SOS. Las características de estos ambientes pueden influir sobre el inicio y el tipo de ojo seco en un individuo, pudiendo ser hiposecretor o evaporativo (DEWS, 2007a).

En la vida diaria, existen condiciones ambientales habituales creadas de forma artificial por el ser humano a las que los individuos se ven expuestos de forma habitual, como los alérgenos, el humo del tabaco o las debidas de forma intrínseca a los propios edificios en los que vivimos y/o trabajamos (aire acondicionado, baja tasa de ventilación, contaminantes ambientales, uso de PVD, iluminación, etc) (Mendell, 1993; Hodgson, 1995; Menzies y cols., 1996, Bourbeau y cols., 1997). Ya en 1983, la Organización Mundial de la Salud (OMS) acuñó el nombre de “síndrome del edificio enfermo” (Hodgson, 2002), para englobar los síntomas tales como cefaleas, fatiga y falta de concentración, así como una irritación excesiva de la piel y las mucosas que presentaban los trabajadores de edificios de oficinas modernos (OMS, 1983). Los primeros estudios realizados al respecto indicaban que entre el 50 y 80% de los trabajadores padecen algún tipo de síntoma relacionado con este síndrome (Bluyssen y cols., 1996; Menzies y cols., 1993) y alrededor de un 30% referían molestias oculares (Hedge y cols., 1996; Muzi y cols., 1998; Franck y cols., 1993; Franck, 1986), siendo el síntoma “ojos cansados” el que ha sido reportado como la causa más común de interrupción en el trabajo de oficina (Hedge y cols., 1996).

Actualmente, el término “irritación ocular” engloba el amplio espectro de la sintomatología que reportan tanto los trabajadores de oficinas (Kjærgaard, 2000; Nichols y cols., 1999) como tripulación y pasajeros durante los vuelos (Lindgren y Norback, 2005; McCarty y McCarty, 2000; Nagda y Koontz, 2003; Whelan y cols., 2003). En la actualidad, estos síntomas se clasifican como síntomas internos, de tipo astenopia, visión borrosa, tensión ocular, etc, y en externos, como irritación ocular, sensación de cuerpo extraño en el ojo, sequedad, lagrimeo, etc (Gowrisankaran y cols., 2007; Piccoli, 2003).

Wolkoff (Wolkoff, 2008) realizó una revisión bibliográfica en la que se analizaban las características de los ambientes de interior que se encuentran relacionadas con la sintomatología ocular y que han sido identificadas como factores de riesgo. La salud ocular en los ambientes de interior se debe al conjunto, tanto de características propias del ambiente, tales como la humedad relativa (RH), la temperatura, la velocidad del aire o la presencia de polución en el aire, como a características del propio individuo como el uso de cosméticos (Franck y Skov, 1989; Kjærgaard y Brandt, 1993; Lozato y cols., 2001), el uso de medicamentos (Craig, 2002; Korb, 2002), o el sexo (Wolkoff y cols., 2003) y propias del trabajo de oficina (ej. uso de PVD) (Blehm y cols., 2005; Wolkoff y cols., 2005, 2006a; Nielsen y cols., 2008; Pansell y cols., 2007). Todos estos factores pueden exacerbar el desarrollo de la sintomatología ocular (“irritación ocular”) por alteración de la película lagrimal.

Esta sintomatología ocular presentada por los trabajadores en las oficinas suele ser transitoria, disminuyendo o desapareciendo al salir del trabajo o del edificio, por lo que puede pasar desapercibido como cuadro clínico de ojo seco debido a la falta de signos clínicos oculares (Chalmers y cols, 2005). Sin embargo, el impacto en la calidad de vida de estos trabajadores debido a la

sintomatología ocular que sufren es equiparable a la de pacientes con SOS crónico (DEWS, 2007b; Miljanovic y cols., 2007).

Humedad relativa (RH)

La baja RH del ambiente existente en las oficinas (entre un 5% y un 30%) unido a la presencia de aire seco en estos ambientes provoca que las mucosas, tanto la ocular, (que se ve afectada en primer lugar) (Sunwoo y cols., 2006b), como las vías respiratorias altas, se irriten y dessequen (Backman y Haghghat, 1999; Reinikainen y Jaakkola, 2001; Sato y cols, 2003). Diversos estudios llevados a cabo en cámaras de control ambiental indican que una RH inferior al 30% no es aconsejable para la salud ocular, siendo en torno a un 40% la RH mínima recomendable (Sunwoo y cols., 2006a; Sunwoo y cols., 2006b). Una baja RH, tanto la encontrada en ambientes artificiales como las oficinas o las cabinas de aviones, como la propia de lugares desérticos o estaciones frías y secas, produce un aumento significativo en la evaporación de la capa acuosa de la película lagrimal, independientemente de la presencia de SOS; de hecho, probablemente la evaporación creada sea mayor en sujetos normales (McCulley y cols., 2006; Hinninghofen y Enck, 2006). La baja RH ambiental debida a la localización geográfica, al igual que en el interior de los edificios, puede provocar sequedad de la piel y molestias en ojos, boca y nariz, aunque no representa un riesgo para la salud (World Health Organization, 2010).

Bajo condiciones de baja RH, aumenta la pérdida evaporativa de agua de la película lagrimal (DEWS, 2007a). Como ya se ha comentado, estas condiciones de baja RH pueden ser debidas a situaciones especiales de interior creadas por el ser humano, mediante el uso de aire acondicionado,

viajes en avión u otros ambientes artificiales (Paschides y cols., 1998). Sin embargo, también pueden deberse en gran parte a las variaciones atmosféricas naturales que se producen en las diferentes ubicaciones geográficas (DEWS, 2007a).

Temperatura

Se ha relacionado una mayor estabilidad de la película lagrimal precorneal (medida mediante aumento del T-BUT) con una menor temperatura de la superficie ocular (Purslow y Wolffsohn, 2007) debido a la desestabilización que sufre la capa lipídica (Borchman y cols., 2007). Estudios previos postularon que un aumento en la temperatura de la superficie ocular afectaba negativamente a la estabilidad de la película lagrimal precorneal (Bron y cols., 2004), y recientemente se ha demostrado que de los tres tipos de fibras nerviosas corneales, son las llamadas “fibras frías” (aproximadamente el 10% del total), que responden preferentemente a descensos de temperatura de la superficie ocular, las implicadas en el mantenimiento de la película lagrimal (Belmonte y Gallar, 2011). Smedbold y colaboradores (Smedbold y cols., 2001) encontraron una relación inversa entre la estabilidad de la película lagrimal precorneal (medida mediante T-BUT no invasivo) y una alta temperatura entre las enfermeras de 36 departamentos en los hospitales geriátricos de Trondheim (Noruega).

Diferentes estudios encontraron un incremento de las afectaciones oculares en los trabajadores de edificios de oficinas a última hora de la tarde (Baird y cols., 1994; Begley y cols., 2002; Skov y cols, 1989). Esto puede ocurrir por un aumento de la temperatura ambiente externa (Skov y cols., 1990), lo que conllevaría una reducción de la RH del ambiente. Además, no debemos olvidar

que el reflejo de parpadeo (y por lo tanto la frecuencia de parpadeo) está provocado por la detección, por parte de las fibras termosensibles al frío existentes en la córnea de un descenso de la temperatura corneal (Collins y cols., 1989; Mori y cols., 1997.) (ej. la frecuencia de parpadeo es menor en las saunas secas (Tsubota y cols., 1997). El aumento de la temperatura exterior unido a la consecuente reducción de la RH del ambiente y a las horas que han pasado los trabajadores delante de las PVD al final de la tarde generan un efecto combinado que resulta en una disminución de la frecuencia de parpadeo y un consecuente adelgazamiento e inestabilidad de la película lagrimal precorneal (Franck, 1991).

Velocidad y polución del aire

Diversas situaciones de la vida diaria, tales como viajar en un vehículo con el aire acondicionado o la calefacción encendida, entrar en un centro comercial, salir a la calle un día de viento o trabajar en una oficina donde la temperatura se regule mediante sistemas de distribución de aire, pueden provocar que exista una corriente de aire alrededor de la región ocular. Estos flujos de aire, especialmente aire de alta velocidad orientado horizontalmente o hacia abajo, pueden provocar un aumento de la evaporación del agua existente en toda la superficie ocular (Murakami, 2004), debido a que provoca una disminución de la temperatura de la misma, especialmente de la temperatura corneal. Nakamori y colaboradores (Nakamori y cols., 1997) observaron que el aire a alta velocidad (>1 m/s) podría provocar un ligero aumento de la frecuencia de parpadeo del individuo en unas condiciones basales; sin embargo, a pesar de la evaporación provocada, el sujeto puede realizar un efecto compensatorio ajustando la tasa de parpadeo en función de las tareas visuales y cognitivas

que el sujeto esté realizando, por ejemplo trabajar con una PVD (Acosta y cols., 1999).

La presencia de irritantes sensoriales y de contaminación del aire en locales cerrados han sido asociados con síntomas de irritación ocular (Norn, 1992; Saxena y cols., 2003; Versura y cols., 1999). Sin embargo, no existen en la actualidad estudios que respalden esta hipótesis (Wolkoff y cols., 2003). Una revisión reciente de Wolkoff (Wolkoff, 2012) pone de manifiesto que las concentraciones de compuestos orgánicos volátiles en los ambientes de oficina son generalmente demasiado bajas como para causar irritación ocular y de las vías respiratorias, basándose en los umbrales de la población de irritación sensorial. De igual forma, no existe ni una indicación clara de que las partículas de polvo de oficina puedan provocar efectos sensoriales, ni siquiera partículas enriquecidas con glucanos, aldehídos o phtalatos (ésteres de ácido phtálico, empleados como plastificadores, añadiéndolo a los plásticos para incrementar su flexibilidad).

Es importante también tener en cuenta que los síntomas oculares y de las vías respiratorias superiores pueden deberse a señales olfativas, lo que puede generar confusión debido a la dificultad de separar la entrada de la percepción del olor y la irritación sensorial (Shusterman, 2007; Wolkoff y cols., 2006b). Diversos factores como la humedad, la temperatura, los hábitos y condiciones de trabajo, la medicación, el uso de lentes de contacto, el sexo o la nutrición entre otros pueden causar alteraciones de la estructura y composición química de la película lagrimal, lo que conduce a la desecación de la misma y a una hiperosmolaridad lagrimal (Wolkoff y cols., 2012). El hecho de que exista una alteración previa de la película lagrimal precorneal, podría reducir los umbrales de irritación sensorial de los ojos (Kjærgaard y cols., 1989) y la presencia de contaminación en el medio ambiente (polución), principalmente en las

ciudades, así como la presencia de contaminantes en el aire en ambientes interiores provocar o contribuir a la estimulación del trigémino, dando como resultado un incremento de la sintomatología ocular (Wolkoff y cols., 2012).

Presión atmosférica

Las altas altitudes están asociadas con cambios fisiológicos generales, así como patológicos en la superficie ocular tales como una mayor evaporación lagrimal, contribuyendo a una mayor incidencia del SOS en estas regiones (Gupta y cols., 2008). Estos autores realizaron un estudio comparativo de prevalencia de SOS entre soldados del ejército, siendo la mitad de este grupo nativos de altas alturas, y una población control que vivía a baja latitud. Encontraron un diagnóstico de SOS en el 20% de los sujetos evaluados en altura y únicamente en el 9% de los sujetos control de baja altura. Asimismo, la población nativa perteneciente al grupo de estudio presentaron una prevalencia de SOS significativamente mayor (54%) frente al 26% encontrado entre los soldados no nativos. Este estudio pone de manifiesto que el SOS es una patología más común en las alturas, y especialmente en la población nativa de estas zonas.

Un estudio sobre la prevalencia del SOS realizada en una población tibetana nativa mostró que el 52,4% de los sujetos evaluados presentaban síntomas de SOS. También, encontraron en la población de estudio valores de T-BUT ≤ 10 segundos y de test de Schirmer ≤ 5 milímetros en el 35,3% y el 24,7% respectivamente, además de una presencia de tinción corneal con fluoresceína ≥ 1 en el 5,8% de la muestra, concluyendo que factores como una mayor edad y una mayor altitud de la región geográfica aumentan la presencia de la patología de SOS (Lu y cols., 2008).

Recientemente se han publicado dos revisiones acerca de los efectos adversos que tienen para la salud la baja presión atmosférica en lugares con alta altitud. Vearrier y Greenber (2011), revisaron el impacto en la salud de las operaciones mineras realizadas a gran altura, evidenciando, entre otros, que los efectos adversos oftalmológicos más frecuentes incluyen una mayor exposición a la luz ultravioleta y xeroftalmía, que puede ser agravada por la exposición al polvo que conlleva ésta ocupación. West (2012), también ha realizado una revisión muy completa de los problemas médicos a gran altura, debido a la baja presión de oxígeno existente a esta altura y que es debida a la baja presión barométrica a grandes alturas. En él define que las respuestas fisiológicas del cuerpo humano a la altura incluyen hiperventilación, policitemia, la vasoconstricción pulmonar hipóxica, un aumento intracelular de enzimas oxidativas, y el aumento de la densidad capilar en el músculo. No obstante, con el descubrimiento de los factores inducibles por hipoxia, que constituyen un interruptor principal de la determinación de la respuesta general del organismo a la privación de oxígeno, ahora es evidente que existe una multitud de otras respuestas a hipoxia celular. Sin embargo, y tal y como comenta el autor, existen dos principales poblaciones (los tibetanos y los andinos), que se han adaptado bien a la altura, tienen fenotipos muy diferentes. Mientras que las personas que viven generalmente en bajas altitudes y se someten en ciertos momentos a condiciones de gran altura presentan enfermedades como el mal agudo de montaña, edema pulmonar de altura o edema cerebral de alta altitud, los residentes permanentes bajo estas condiciones de alta altitud padecen el mal de montaña crónico e hipertensión pulmonar de altitud. Actualmente se conoce cómo mitigar los efectos de un medio ambiente hipóxico, como es el que se presenta a grandes altitudes, ya que cada aumento de un 1% en la concentración de oxígeno del ambiente reduce la altura equivalente a unos 300 m. Este procedimiento, tal y como describe, ya

se emplea actualmente en instalaciones de gran altitud, como en un tren chino a Lhasa (West, 2012).

Sin embargo, también existe otra alternativa para paliar el efecto de la altura y que es utilizado en las cabinas de aviones; aumentar la presión barométrica. Este ambiente artificial, al que los individuos se ven expuestos cada vez con mayor frecuencia y que provoca, al igual que los entornos de oficina, síntomas de irritación y sequedad ocular, especialmente en vuelos de larga duración.

Aunque las cabinas de los aparatos están presurizadas, la presión de aire en la cabina durante el vuelo a altitud de crucero es inferior que la presión del aire a nivel del mar. A una altitud de crucero típica de 11.000 a 12.200 metros (36.000 - 40.000 pies), la presión de aire en la cabina es equivalente a la presión de aire en el exterior a 1.800 - 2.400 metros (6.000 - 8.000 pies) sobre el nivel del mar. En consecuencia, la sangre absorbe menos el oxígeno (hipoxia) y los gases en el interior del cuerpo se expanden. Los efectos de una presión de aire reducida en cabina son normalmente bien tolerados por los pasajeros sanos (World Health Organization, 2010).

Además, las cabinas de los aviones permanecen con una RH muy baja. Esto se debe a la frecuente renovación del aire. Debido a que la temperatura exterior del aire en altitudes de crucero es muy baja (típicamente entre -46 a -65°C) (Space y cols., 2000), la atmósfera contiene poca humedad, por lo que el aire que se suministra a la cabina es muy seco y se requieren 10 o más cambios de aire por hora para mantener la presión en la cabina. Las únicas fuentes de humedad adicional a la cabina que se presentan durante un vuelo son las debidas a la respiración humana y a la preparación de la comida, consumición de bebidas y otros usos del agua durante el vuelo (Nagda y Hodgson, 2001), por lo que la RH en la cabina es normalmente menor a un 20%. Este promedio es menor al ambiente seco típico en el interior de una

casa en invierno, donde la RH suele ser superior al 30%) (World Health Organization, 2010). Ya en 1986, la “National Academy of Sciences” de EEUU (Comitee on Airliner Cabin Air Quality, 1986) realizó un informe en el que identificaba la humedad como una de las cuatro áreas de investigación más importantes concernientes a los ambientes de las cabinas en los aviones, junto con el tabaco, el ozono y los aerosoles antimicrobianos. Este mismo informe estableció que los niveles de RH en las cabinas de los aviones varían entre menos de un 2% hasta un 23%.

La pérdida de agua de la película lagrimal es parcialmente causada por la diferencia de presión de vapor entre la superficie ocular y el medio ambiente (Rocher y Fatt, 1995). Por ejemplo, una disminución del 20% de RH de 40-45% a 20-25% (RH típica de una cabina de avión) aumentó en promedio un 100% la tasa de evaporación (Uchiyama y cols., 2007; Tsubota, 1998). Este aumento fue similar en sujetos con y sin queratoconjuntivitis e incluyendo sujetos con disfunción de las glándulas de Meibomio. La elevada altitud en las cabinas de avión incrementa aún más la evaporación del agua de la película lagrimal precorneal debido a la reducida presión (McCarty y McCarty, 2000; Rocher y Fatt, 1995; Uchiyama y cols., 2007).

En resumen, las altas temperaturas (Yao y cols., 2011), la baja RH (Yao y cols., 2011), los flujos de aire (Borchman y cols., 2009) o la alta velocidad del viento (DEWS, 2007a), así como la altitud elevada (Gupta y cols., 2008), son factores de riesgo conocidos que afectan a la superficie ocular expuesta a ellos y empeoran la sintomatología del SOS. Bajo condiciones de baja RH, aumenta la pérdida evaporativa de agua de la película lagrimal (DEWS, 2007a). Como ya se ha comentado, estas condiciones de baja RH pueden ser debidas a situaciones especiales de interior creadas por el ser humano, mediante el uso de aire acondicionado, viajes en avión u otros ambientes

artificiales (Paschides y cols., 1998). Sin embargo, también pueden deberse en gran parte a las variaciones atmosféricas naturales que se producen en las diferentes ubicaciones geográficas (DEWS, 2007a).

III. CÁMARAS DE AMBIENTE CONTROLADO - CAC

Las cámaras de ambiente controlado (CAC) son habitaciones aisladas del exterior en las que se pueden controlar diversas variables ambientales, tales como la temperatura, la RH, la presión atmosférica, el flujo de aire, la contaminación ambiental, etc. Los sujetos de estudio pueden permanecer en su interior el tiempo necesario para analizar sus respuestas a la exposición a un ambiente previamente determinado.

El uso de estas salas de exposición se ha utilizado para evaluar la reacción del organismo humano, incluidas las oculares, a diferentes situaciones. Existen diferentes diseños de cámaras de control ambiental y son cada vez más numerosos los estudios realizados en ellas. La Tabla 1 muestra las características de las principales cámaras de control ambiental existentes en la actualidad y que son utilizadas en diversos estudios para analizar la respuesta del organismo a la exposición a múltiples ambientes controlados.

Tabla 1. Cámaras de ambiente controlado (CAC).

CÁMARAS DE AMBIENTE CONTROLADO (CAC)	VARIABLES
<i>Vienna Challenge Chamber</i> Universidad de Viena, Austria.	Polen
<i>Environmental Exposure Unit</i> Universidad de Queens, Canadá.	Polen
<i>Climate Chamber</i> Universidad de Aarhus, Dinamarca.	Compuestos orgánicos volátiles
<i>Internacional Centre for Indoor Environment and Energy</i> Universidad Técnica, Dinamarca.	HR, contaminantes (recreación de vuelos transatlánticos)
<i>Environmental Chamber,</i> Electricity Council Research Centre, Reino Unido.	RH, temperatura
<i>Controlled Adverse Environment</i> Ophthalmic Research Associates (ORA), Boston, MA, EE.UU.	RH, temperatura, flujo de aire
<i>Climate Chamber</i> Universidad de Glasgow Caledonian, Glasgow, Reino Unido.	RH, temperatura
<i>Research Center for Human Environmental Adaptation</i> Universidad de Kyushu, Kioto, Japón.	RH , temperatura
<i>Cámara de Ambiente controlado</i> <i>Escuela de Arquitectura, Universidad de Valladolid, España.</i>	RH , temperatura

RH: humedad relativa.

Uno de los factores que se comenzó a estudiar en las CAC fueron las reacciones alérgicas al polen, mediante procesos de provocación a los sujetos en su interior. La técnica está basada en el concepto de que una exposición uniforme a unos niveles controlados de un alergeno permite un análisis adecuado de la eficacia de un tratamiento sin las variables inherentes a estudios de exposición tradicionales (variabilidad en la cantidad y tipos de

polen al que el sujeto está expuesto en su vida diaria, el periodo del año en el que los estudios se pueden realizar, etc).

La primera cámara de provocación alérgica fue la “Vienna Challenge Chamber” (University Clinic, General Hospital, Vienna, Austria), que fue construida por Friedrich Horak en 1987 (Horak y Jager, 1987) y el primer ensayo clínico realizado en ella fue publicado en 1988 (Horak y Jager, 1988). Desde entonces, han sido numerosos los estudios realizados en esta cámara, centrados fundamentalmente en el análisis de la efectividad de fármacos antialérgicos (Horak y Jager, 1991; Horak y cols., 1992, 1993a, 1993b, 1994a, 1994b, 1996a, 1996b, 1998a, 1998b, 1998c, 1998d, 2000, 2001, 2002, 2003a, 2003b, 2003c, 2005, 2006, 2009a, 2009b, 2009c, 2010a, 2010b, 2012; Kyrein y cols., 1996; Toth y cols., 1998; Temmel y cols., 1998; Stuebner y cols., 2001, 2004, 2006; Horak y Stuebner, 2002; Zieglmayer y cols., 2005, 2008; Niederberger y cols., 2007; Devillier y cols., 2011; Horak, 2011; Van Overtuelt y cols., 2011; Zimmer y cols., 2012).

La “Environmental Exposure Unit” (Kingston General Hospital, Ontario, Canadá), se construyó en 1981 para evaluar los efectos de ciertos compuestos utilizados para el aislamiento de los edificios, y fue modificada permanentemente en 1987 como cámara de provocación alérgica (Day y Briscoe, 1999). Desde entonces, se han publicado numerosos estudios realizados en esta cámara (Day y cols., 1996; (Donovan y cols., 1996; Day y cols., 1997a, 1997b, 1998, 2000, 2001, 2004, 2005, 2009; Ellis y cols., 1999, 2001, 2010; Wilken y cols., 2003).

Más recientemente, se han construido otras cámaras de exposición al polen en Dinamarca (Ronborg y cols., 1996, 1997), EE.UU (Berkowitz y cols., 2002, 2004, 2006; Wilken y cols., 2002, 2003), Alemania (Krug y cols., 2003, 2005;

Tank y cols., 2011; Badorrek y cols., 2009, 2011; Biller y cols., 2001; Hohlfeld y cols., 2010; Erpenbeck y cols., 2006a, 2006b) y Japón (Enomoto y cols., 2007; Xiao y cols., 2007; Hashiguchi y cols., 2007, 2009a, 2009b; Wakabayashi y cols., 2012).

Otro tipo de trabajos que se han realizado en CAC han sido aquellos que han estudiado las reacciones frente a la exposición a contaminantes ambientales (polvo, CO₂, etc), con el objetivo de estudiar el síndrome del edificio enfermo. Uno de los grupos que más ampliamente ha trabajado en este campo es el del Instituto de Medicina Ambiental y Ocupacional, de la Universidad de Aarhus en Dinamarca. La exposición de los individuos se hace en una cámara climática o "Climate Chamber" (Tabla 1), en la que se diseminan los contaminantes ambientales con una concentración conocida y analizan la respuesta de los sujetos a distintos niveles (Molhave., 1982; Andersen y cols., 1983; Molhave y cols., 1986, 2002; Molhave y Moller, 1979; Pan y cols., 2000).

En un estudio Pan y cols. (Pan y cols., 2000) evaluaron en 10 sujetos tanto los síntomas de irritación como los efectos fisiológicos causados por el polvo que hay en el aire de una oficina. Expusieron a los sujetos a aire limpio y polvo de oficina (no industrial) durante 3 horas. Evaluaron síntomas, T-BUT, la formación de espuma en el canto del ojo y el daño epitelial conjuntival, encontrando una disminución del T-BUT y un aumento significativo tanto en el número de respuestas positivas como en el grado de intensidad en los síntomas de sequedad de la piel de la cara, irritación de la garganta, necesidad de toser, dolor de cabeza, nariz seca, dificultades de concentración, etc. Además, se demostró que la calidad del aire estaba correlacionada significativamente con la sensación de ojo seco, la irritación ocular, de la piel de la cara y de la nariz. Por ello se dedujo que el polvo encontrado en las

oficinas (no industrial) puede provocar cambios fisiológicos y síntomas en los ojos y nariz.

Además de los estudios realizados sobre sustancias que provocan síntomas de irritación ocular y que alteran la estabilidad de la película lagrimal, existen igualmente numerosos estudios, al igual que el de esta tesis doctoral, que analizan la influencia de diferentes variables ambientales sobre la superficie ocular empleando CAC.

Uno de los grupos que más ha estudiado la implicación de las condiciones ambientales en la superficie ocular con el uso de una CAC, ha sido la clínica de investigación y desarrollo “Ophthalmic Research Associates” (ORA), Boston, EE.UU. Su protocolo de análisis dentro de la cámara se encuentra actualmente pendiente de patente (OPI 2.0 system. Ora, Inc. Andover MA, EEUU) (Abelson y cols., 2011, 2012a). En uno de sus estudios más recientes evaluaron con el sistema OPI 2.0 un total de 33 pacientes con SOS. Los datos fueron obtenidos en tres ocasiones: al inicio del estudio, tras una exposición en su CAC (CAESM) de 90 minutos y a los 30 minutos de haber finalizado la exposición. Encontraron un área mayor de rotura de la película lagrimal ($>0,2$) en los pacientes con SOS leve-moderado que en los pacientes con SOS severo ($<0,2$). Además encontraron una mayor hiperemia y tinción corneal en todos los pacientes después de la exposición ambiental, pero no encontraron variación en los valores de T-BUT; in embargo, hallaron una correlación entre el tamaño de la apertura palpebral, la frecuencia de parpadeo y el área de rotura de la película lagrimal. Esto les ha permitido identificar subpoblaciones de pacientes que se defienden de las condiciones ambientales mediante diferentes mecanismos, bien sea aumentando la frecuencia de parpadeo, disminuyendo la apertura palpebral o ambas simultáneamente (Abelson y cols., 2012b).

Sunwoo y cols, (2006a), en una cámara climática en el Research Center for Human Environmental Adaptation (Kyushu University, Tokio, Japón), compararon 3 RH (10, 30 y 50%) a una temperatura de 25°C en 16 estudiantes jóvenes sanos no fumadores, con una exposición de 3 horas. Evaluaron factores como la frecuencia de parpadeo, el estado de hidratación de la piel, la pérdida de agua transepidermica (sudoración), etc., empleando para ello unas escalas de valoración. Encontraron que una RH por debajo del 30% provocaba un aumento de la tasa del parpadeo y sequedad de los ojos y de la piel, y que por debajo del 10% aparecía sequedad de la mucosa nasal. Los mismos autores (Sunwoo y cols., 2006b), compararon las respuestas subjetivas a la baja RH de varones jóvenes. Seleccionaron ocho estudiantes varones sanos ($21,7 \pm 0,8$ años) y ocho hombres ancianos sanos ($71,1 \pm 4,1$ años). Las condiciones de la sala de exposición fueron de 25°C de temperatura y 10%, 30% y 50% de RH. Encontraron que los jóvenes presentaban más síntomas de sequedad de ojos y garganta que los mayores, con una mayor afectación de la mucosa nasal en los ancianos que en jóvenes con la exposición a una RH baja. Por debajo del 30% de RH, los ojos y la piel se secaron, y por debajo del 10% RH también lo hizo la mucosa nasal. Estos resultados sugieren que para evitar la sequedad de los ojos y la piel, es necesario mantener una RH de más del 30% y para evitar la sequedad de la mucosa nasal, es necesario mantener una RH mayor de un 10%.

En 2007 Strom-Tejsen y cols (Strom-Tejsen y cols., 2007), realizaron un estudio en una sección de 21 asientos de una cabina de avión recreada dentro de una CAC (Internacional Centre for Indoor Environment and Energy, Technical University, Dinamarca). Presentaba fuentes de contaminación reales y era capaz de proporcionar aire fresco del exterior a muy baja humedad. Simularon cuatro condiciones diferentes de un vuelo transatlántico de 7 horas

de duración con cuatro RH de 28,4; 16,0; 11,2 y 9,4% que se consiguieron variando la tasa de renovación del aire de la cabina (1,4; 3,3; 4,7 y 9,4 l/seg/persona, respectivamente) y una temperatura constante de 23, 2°C. Los sujetos entraban en grupos de 16-18 personas y eran expuestos a las cuatro condiciones de simulación. Durante cada experimento (vuelo), los sujetos completaban un cuestionario tres veces para valorar subjetivamente tanto la calidad del aire como los síntomas más comúnmente experimentados. También realizaron diferentes pruebas fisiológicas de ojos, nariz y piel dos veces por experimento. En la evaluación de la calidad del aire, los sujetos mostraron una mayor irritación de garganta a los 10 minutos del comienzo del experimento en la condición de 1,4 l/seg/persona que en la de 9,4 l/seg/persona, no habiendo otros cambios a lo largo del experimento (incluido el síntoma de irritación ocular). Con referencia al ambiente de la cabina, los sujetos percibieron a las 3,5 horas del experimento los cambios en la RH y una disminución de los síntomas de sequedad con RH mayores, hallazgo que no encontraron a las 6 horas. No encontraron cambios para las distintas condiciones en la agudeza visual o en el test de "ferning" (cristalización del moco de la película lagrimal). Observaron que el aumento de la RH en la cabina de la aeronave al 28% y la reducción del flujo exterior a 1,4 l/s por persona no consiguió reducir la intensidad de los síntomas que caracterizan el entorno de las cabinas de aviones. Por el contrario, se intensificaron las quejas de dolor de cabeza, mareos y claustrofobia, debido al mayor nivel de contaminantes. Este estudio muestra que una RH cada vez mayor en una cabina de avión no consigue disminuir los síntomas de malestar de sus ocupantes, debido a la necesidad de ir disminuyendo el caudal de ventilación de aire fresco proveniente del exterior.

Para concluir, muy recientemente, en la Universidad de Glasgow Caledonian, Reino Unido, se ha realizado un estudio sobre el efecto de la baja RH en la fisiología de la película lagrimal en una CAC, recreando 2 condiciones ambientales diferentes, una con una del 40% y otra desecante, con una RH del 5%. La temperatura se fijó en 21°C para ambas condiciones y las exposiciones fueron de 1 hora. Encontraron una afectación negativa en la película lagrimal bajo la condición de baja RH reflejada por un aumento de la incomodidad ocular, y una disminución significativa de la tasa de evaporación lagrimal, el tiempo de ruptura lagrimal (no invasivo), el espesor de la capa lipídica de la película lagrimal y en la producción lagrimal. Sin embargo, no observaron cambios significativos en la osmolaridad lagrimal y la temperatura de la superficie ocular (Abusharha y Pearce., 2012).

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

El SOS es un trastorno inflamatorio multifactorial y complejo que afecta a la LFU formada por la superficie ocular, todas las glándulas productoras de componentes de la lágrima y al sistema neuro-humoral que lo conecta y mantiene (Stern y cols., 1998). El SOS es una patología de alta prevalencia que afecta a millones de personas en todo el mundo (Lemp, 1998) y que conlleva un importante deterioro en la calidad de vida de los pacientes debido a que ocasiona síntomas de disconfort, mala calidad visual e inestabilidad de la película lagrimal con daños potenciales e irreversibles de la superficie ocular (DEWS, 2007d).

En la actualidad, apenas existen tratamientos que permitan la recuperación funcional de una superficie ocular inflamada de forma crónica, como es el caso del SOS, y la CsA es el único tratamiento aprobado para esta enfermedad. El resto de tratamientos disponibles sólo presentan utilidad para aliviar la sintomatología, siendo muy poco efectivos en actuar sobre la causa subyacente de la enfermedad. Un claro ejemplo de ello son las lágrimas artificiales, que intentan suplir la lágrima humana mimetizándola en componente acuoso, propiedades físico-químicas (pH, osmolaridad, viscosidad, tensión superficial), e incluso en la cantidad de los elementos químicos (principalmente iones) que la componen (sodio, potasio, fosfato, cinc, etc); sin embargo, realmente hay una serie de compuestos más complejos que de momento son imposibles de imitar (anticuerpos, enzimas, factores de crecimiento, nutrientes, etc). Otro ejemplo son los inmunosupresores, utilizados únicamente en casos moderados o severos muy sintomáticos, debido a los efectos secundarios adversos asociados a su uso continuado.

De igual forma, tests clínicos como el T-BUT, el test de Schirmer, el test de rojo de fenol o las tinciones vitales (tinción con fluoresceína, rosa de bengala o verde de lisamina) así como diversos cuestionarios de SOS (SANDE I y II, McMonnies Dry Eye questionnaire, DEQ, OSDI®...) son empleados diariamente en las clínicas para evaluar los signos clínicos y la sintomatología del SOS y clasificar así la enfermedad, intentando ofrecer el tratamiento más adecuado. Sin embargo, muchos de ellos han demostrado una baja fiabilidad y reproducibilidad (Nichols y cols., 2004). Esto se une al hecho de que la mayoría de los estudios encuentran una escasa o nula correlación entre la sintomatología y los signos clínicos en pacientes con SOS (Cuevas y cols., 2012; Moore y cols., 2009; Hay y cols., 1998; Schein y cols., 1997; Bjerrum, 1996).

Durante los últimos años se han ido desarrollando e implantando en los estudios de investigación distintas técnicas de evaluación tanto de la superficie ocular como de la película lagrimal, tales como el test de aclaramiento lagrimal (Maskin, 2008) el estudio de factores de crecimiento y moléculas inflamatorias (citoquinas/quimioquinas) en lágrima (Benito y cols., 2012; Enríquez-de-Salamanca y cols., 2012; Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010; Na y cols., 2012), el análisis de las células epiteliales mediante citometría de flujo (Reinoso y cols., 2012; Reinoso y cols., 2011; Li y cols., 2013) o la osmolaridad lagrimal (Lemp y cols., 2012). Algunas de estas técnicas de evaluación pueden ser potencialmente útiles tanto en la mejora de la correlación entre signos y síntomas como del diagnóstico del SOS o de otras patologías de la superficie ocular; sin embargo aún deben ser validadas (DEWS, 2007d).

Actualmente, no se tienen en cuenta las condiciones ambientales en las que los pacientes han estado antes de ser evaluados en las consultas habituales y no se controlan las condiciones ambientales existentes en las consultas. Sin embargo, estas condiciones ambientales van a determinar en gran medida la sintomatología y los valores de los tests que se emplean en la consulta para el diagnóstico de patologías como el SOS. En los pacientes con SOS, sea cual sea su grado, su sintomatología varía dependiendo de las condiciones ambientales en la que se encuentre de forma habitual, tanto las debidas a la localización geográfica (clima de la zona) como a los ambientes internos a los que habitualmente se exponga (oficina, casa,...) (Wolkoff., 2012).

El control de las condiciones ambientales a las que están expuestos los pacientes antes de ser evaluados minimizaría la influencia que éstas tienen sobre la superficie ocular y la sintomatología de los pacientes, permitiendo obtener valores más fiables en los tests diagnósticos que se realicen. De igual forma, la posibilidad de “homogeneizar” a los pacientes antes de ser evaluados para minimizar la influencia del ambiente del que provengan resultaría fundamental en el desarrollo de ensayos clínicos multicéntricos, destinados principalmente a la evaluación de la efectividad de un fármaco para el tratamiento del SOS, donde cada centro participante se encuentra en un lugar geográfico diferente y, por tanto, con unas características climatológicas distintas. Ello permitiría eliminar el efecto causado por las condiciones ambientales, teniendo así muestras más homogéneas, obteniendo resultados más reproducibles, fiables y veraces.

El Grupo de Superficie Ocular del IOBA está altamente implicado en el estudio de las enfermedades inflamatorias que afectan a la superficie ocular, como es el caso del SOS. Desarrolla desde hace años un Programa de Investigación en Enfermedades Inflamatorias de la Superficie Ocular, codirigido por la Profesora

Margarita Calonge y el Dr. Michael E. Stern, Vicepresidente del Área de Investigación en Inflamación de la compañía farmacéutica Allergan Inc.

Dentro de éste programa, y hace algunos años, se llevó a cabo un estudio en una cámara de ambiente controlado existente en la Escuela de Arquitectura de la Universidad de Valladolid. Aunque ésta cámara no estaba adaptada para su uso en humanos, sino para estudiar la calidad del aire, se logró realizar un primer estudio (González-García y cols., 2007), que demostró la utilidad de este modelo. Como consecuencia de ello, en 2008, el IOBA transfirió su tecnología a Visión I+D, empresa “spin off” de la Universidad de Valladolid. Visión I+D ha llevado a cabo la construcción de una CAC, denominada Controlled Environment Research Laboratory (CERLab) de características únicas en Europa. CERLab se encuentra situada en el seno de las instalaciones del IOBA y permite controlar variables ambientales como la temperatura, la RH y la presión atmosférica. La creación de esta cámara ha permitido la realización de este estudio, la primera tesis doctoral llevada a cabo dentro de CERLab, para evaluar la influencia que las condiciones ambientales provocan tanto en los valores de los test diagnósticos como en el estado de la superficie ocular.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las condiciones ambientales adversas recreadas dentro de una cámara de ambiente controlado pueden provocar un empeoramiento de la LFU, tanto en pacientes con diagnóstico de SOS como en individuos sanos, demostrado a través de la variación en los tests diagnósticos clínicos de SOS y de las concentraciones de diversas moléculas en la lágrima.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos inducidos por diversas condiciones ambientales recreadas en la CAC CERLab en los tests diagnósticos de SOS en tres poblaciones de estudio; sujetos control, pacientes con SOS leve-moderado y pacientes con SOS severo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los efectos inducidos en la superficie ocular a través de la variación de los tests diagnósticos clínicos de SOS y de las concentraciones de moléculas en lágrima bajo una condición ambiental “normal” de Valladolid, España.

Temperatura: 23°C; RH: 45%; Presión Atmosférica de Valladolid, correspondiente a 930 milibares (mbar) – 690 metros (m) sobre el nivel del mar.

2. Evaluar los efectos inducidos en la superficie ocular a través de la variación de los test diagnósticos clínicos de SOS y de las concentraciones de moléculas en lágrima bajo una condición ambiental con baja RH.

Temperatura: 23°C; RH: 5%; Presión Atmosférica de Valladolid, correspondiente a 930 mbar – 690 m sobre el nivel del mar.

3. Evaluar los efectos inducidos en la superficie ocular a través de la variación de los tests diagnósticos clínicos de SOS y de las concentraciones de moléculas en lágrima bajo una condición ambiental con baja RH y baja presión atmosférica, similar a la encontrada similar a la que normalmente se encuentra dentro de una cabina de avión durante un vuelo.

Temperatura: 23°C; RH: 5%; Presión Atmosférica: 750 mbar – 2500 m sobre el nivel del mar.

4. Evaluar la influencia en la superficie ocular de la implementación del flujo de aire en las tres condiciones ambientales del estudio anteriormente descritas.
5. Determinar las diferencias existentes en los valores basales de los tests diagnósticos de SOS de dos poblaciones de estudio homogéneas y equiparables residentes en dos localizaciones geográficas diferentes: Valladolid (España) y Braga (Portugal).

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO

El estudio que ha dado lugar a esta tesis doctoral se ha diseñado como un estudio prospectivo, randomizado y doble enmascarado. Todos los protocolos de estudio fueron aprobados por la Comisión de Investigación del IOBA y por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. El estudio se adhirió a los principios de la Declaración de Helsinki y de la ley española de protección de datos.

MUESTRA

Todos los participantes fueron informados debidamente del estudio en el que iban a participar, y firmaron el consentimiento informado (Anexos I, II y III). Asimismo, fueron libres de interrumpir su participación en el estudio en cualquier momento. Los pacientes de los estudios I y II fueron reclutados en la Unidad Clínica de Inmunología y superficie ocular del IOBA, la Unidad de Lentes de Contacto del IOBA, de la Unidad de Inmunología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y del Hospital Río Hortega de Valladolid. Los sujetos control de los estudios I, II fueron reclutados entre personas ajenas a estas instituciones, mientras que los sujetos control del estudio III fueron reclutados entre el personal de la Universidade do Minho, Braga (Portugal) así como de personas ajenas a la universidad.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

Sujetos control

Los criterios de inclusión y de exclusión de todos los participantes en los estudios que constituyen la tesis doctoral que fueron incluidos como sujetos control fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Sujetos mayores de 40 años que entendieran y firmaran el consentimiento informado.
- No usuarios o usuarios esporádicos de lentes de contacto (≤ 2 días/semana) que se comprometieran a discontinuar su uso dos días antes de la realización de cada una de las visitas del estudio.
- Obtener una puntuación en el test "Ocular Surface Disease Index"-OSDI[®] (versión española) ≤ 12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína ≤ 1 (escala Oxford)
- Tener alterados dos o menos de los siguientes tests:
 - Test de rojo de fenol "Phenol Red Thread Test – PRTT" ≤ 20 milímetros a los 15 segundos.
 - T-BUT ≤ 7 segundos.
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina ≥ 1 (escala Oxford).
 - Test de Schirmer sin anestesia tópica ≤ 5 milímetros a los 5 minutos.

Criterios de exclusión

- Cualquier enfermedad de la superficie ocular.
- Cualquier cirugía ocular realizada en los tres meses antes de realizar el estudio.
- Uso de cualquier medicación tópica y/o sistémica que pudiera influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantuviera constante (tanto en dosis como en tipo de tratamiento) durante el estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Participantes sin compromiso de suspender el uso de cualquier medicación tópica ocular (incluidas las lágrimas artificiales) al menos dos horas antes de cada visita.
- Cualquier patología sistémica que no permitiera al paciente someterse a las condiciones ambientales de estudio.

Pacientes con SOS leve – moderado

Los criterios de inclusión y de exclusión de todos los participantes en los estudios que constituyen la tesis doctoral que fueron incluidos como pacientes con ojo seco leve – moderado fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Sujetos mayores de 40 años que entendieran y firmaran el consentimiento informado.
- No usuarios o usuarios esporádicos de LC (≤ 2 días/semana) que se comprometieran a discontinuar su uso dos días antes de la realización de cada una de las visitas del estudio.

-
- Diagnosticados de SOS leve – moderado en función de los criterios diagnósticos del DEWS (DEWS, 2007a) (Nivel 1-2).
 - Obtener una puntuación en el test OSDI® (versión española) > 12 puntos.
 - Tinción corneal con fluoresceína < 2 (escala Oxford)
 - Tener alterados dos o más de los siguientes tests:
 - PRTT ≤ 20 milímetros a los 15 segundos.
 - T-BUT ≤ 7 segundos.
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina ≥ 1 (escala Oxford).
 - Test de Schirmer sin anestesia tópica ≤ 5 milímetros a los 5 minutos.

Criterios de exclusión

- Cualquier enfermedad de la superficie ocular distinta al SOS.
- Cualquier cirugía ocular realizada en los tres meses antes de comenzar el estudio.
- Uso de cualquier medicación tópica y/o sistémica que pudiera influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantuviera constante (tanto en dosis como en tipo de tratamiento) durante el estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Pacientes sin compromiso de suspender el uso de cualquier medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos dos horas antes de cada visita.
- Cualquier patología sistémica que no permitiera al paciente someterse a cualquiera de las condiciones ambientales de estudio.

Pacientes con SOS severo

Los criterios de inclusión y de exclusión de todos los participantes en los estudios que constituyen la tesis doctoral que fueron incluidos como pacientes con SOS severo fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

- Sujetos mayores de 40 años que entendieran y firmaran el consentimiento informado.
- No usuarios o usuarios esporádicos de LC (≤ 2 días/semana) que se comprometieran a discontinuar su uso dos días antes de la realización de cada una de las visitas del estudio.
- Diagnosticados de SOS severo en función de los criterios diagnósticos del DEWS (DEWS, 2007a) (Nivel 3-4).
- Presentar sintomatología de ojo seco en el cuestionario OSDI® (versión española) >12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína ≥ 2 (escala Oxford).
- Tener alterados dos o menos de los siguientes tests:
 - PRTT ≤ 20 milímetros a los 15 segundos.
 - T-BUT ≤ 7 segundos.
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina ≥ 1 (escala Oxford).
 - Test de Schirmer sin anestesia tópica ≤ 5 milímetros a los 5 minutos.

Criterios de exclusión

- Cualquier enfermedad de la superficie ocular distinta al SOS.
- Cualquier cirugía ocular realizada en los tres meses antes de comenzar el estudio.
- Uso de cualquier medicación tópica y/o sistémica que pudiera influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantuviera constante (tanto en dosis como en tipo de tratamiento) durante el estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Pacientes sin compromiso de suspender el uso de cualquier medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos dos horas antes de cada visita.
- Cualquier patología sistémica que no permitiera al paciente someterse a cualquiera de las condiciones ambientales de estudio.

TABLA 2. Resumen de los criterios de inclusión de los participantes en los estudios I, II y III.

Tests	Grupo Control	Grupo SOS leve-moderado (Nivel 1-2)	Grupo SOS severo (Nivel 3-4)
OSDI® (0-100)	< 12	≥ 12	≥ 12
Tinción corneal con fluoresceína (0-4)	≤ grado 1	> grado 2	≥ grado 2
Otros tests	≤ 2 de 4 tests alterados	≤ 2 de 4 tests alterados	> 2 de 4 tests alterados

SOS: síndrome de ojo seco; OSDI®: ocular surface disease index/ Índice de enfermedad de la superficie ocular; PRTT: test de rojo de fenol; T-BUT: tiempo de ruptura lagrimal.

OTROS TESTS

- PRTT > 20 mm / 15 segundos
- T-BUT > 7 segundos
- Tinción conjuntival con verde de lisamina (0-4) ≤ grado 1
- Test de Schirmer sin anestesia tópica ≥ 5 milímetros / 5 minutos

DESCRIPCIÓN DE LOS TESTS

Cuestionario de historia médica y ocular

El fin de este cuestionario es recopilar información de la historia médica general y ocular del participante para determinar si podía ser candidato o no a formar parte del estudio (Anexo IV).

Cuestionario “Ocular Surface Disease Index” – OSDI®

Los sujetos completaron la versión española homologada el cuestionario OSDI® (anexo V). Este cuestionario recoge información sobre los síntomas subjetivos y la incomodidad ocular que ha tenido el sujeto durante la semana previa a la realización del cuestionario.

El cuestionario OSDI® (Schiffman y cols., 2000; Walt, 2004) (anexos V y VI) consta de un total de 12 preguntas divididas en tres bloques. El primer bloque se compone de cinco cuestiones referentes a la sintomatología ocular presentada por el sujeto durante la última semana: ojos sensibles a la luz, sensación de tener arena en los ojos, dolor/escozor, visión borrosa y mala visión. Este bloque ofrece como posibles respuestas las siguientes: “siempre”, “casi siempre”, “la mitad del tiempo”, “algunas veces” y “nunca”.

El segundo bloque se compone de cuatro cuestiones referentes a si la sintomatología ocular presentada ha limitado al sujeto para realizar ciertas actividades de la vida diaria: leer, conducir por la noche, trabajando con un ordenador o un cajero automático y viendo la televisión. El tercer bloque se

compone de tres cuestiones referentes a la presencia de incomodidad ocular en diferentes situaciones ambientales: condiciones de viento, lugares o zonas con baja humedad (muy secos) o en lugares con aire acondicionado.

El segundo y tercer bloque ofrece como posibles respuestas las mismas que el primer bloque, añadiendo en este caso la posibilidad de marcar “no procede” en caso de que la actividad por la que se pregunta no haya sido realizada por el individuo durante la última semana (ej. conducir de noche) o, como es el caso del tercer bloque, el sujeto no haya estado expuesto a las condiciones ambientales por las que se pregunta (ej. lugares con aire acondicionado).

Cada una de las respuestas tiene asignado un valor diferente que se reflejan en la siguiente Tabla:

TABLA 3. Puntuación asignada a cada una de las respuestas del test OSDI[®].

<u>RESPUESTA</u>	<u>PUNTUACIÓN</u>
Siempre	4 puntos
Casi siempre	3 puntos
La mitad del tiempo	2 puntos
Algunas veces	1 punto
Nunca	0 puntos
No procede	-

OSDI[®]: Ocular surface disease index / Índice de enfermedad de la superficie ocular.

Las respuestas son comunes para ambos ojos; sin embargo, al final del cuestionario se preguntaba al sujeto si la sintomatología e incomodidad indicada en el cuestionario era igual en ambos ojos o preferentemente referida a un ojo, en cuyo caso se determinó qué ojo presentaba más síntomas.

El examinador explicó tanto el cuestionario como las preguntas a cada uno de los candidatos, así como las posibles respuestas de cada uno de los bloques. Se pidió a cada individuo que respondiera de manera verbal a cada una de las doce cuestiones del test, siendo el examinador el que marcó con una “x” la opción que más se adecuaba a la respuesta daba por el sujeto.

Para obtener el índice OSDI[®] (Schiffman y cols., 2000; Walt, 2004) (ver anexo VI), el examinador sumó las puntuaciones obtenidas en cada uno de los bloques, obteniendo los valores A, B, C y D. Posteriormente, y aplicando la fórmula proporcionada por el cuestionario para su cálculo; $OSDI^{\circ} = D \times 25 / E$, siendo:

D: suma de las puntuaciones de todas las preguntas contestadas = A + B + C

E: Número total de preguntas contestadas. No incluye las preguntas contestadas como “no procede”.

El índice OSDI[®] varía en una escala de 0 a 100. Este índice nos permitió categorizar al sujeto en uno de los rangos de SOS establecidos para este cuestionario (Miller y cols., 2010). Los rangos son los siguientes:

TABLA 4. Clasificación del grado de SOS según la puntuación del índice OSDI[®].

PUNTUACIÓN ÍNDICE OSDI [®]	CLASIFICACIÓN
0 – 12 puntos	Superficie ocular normal
13 – 22 puntos	SOS leve
23 – 32 puntos	SOS moderado
33 – 100 puntos	SOS severo

OSDI[®]: Ocular surface disease index / Índice de enfermedad de la superficie ocular; SOS: síndrome de ojo seco.

“Single Item Score Dry Eye Questionnaire (SIDEQ) modificado

Así como el OSDI® se utilizó para seleccionar candidatos (criterio de inclusión), este cuestionario es el que se empleó posteriormente, una vez que el sujeto ya formaba parte del estudio, para evaluar la sintomatología relacionada con el SOS presentada por los sujetos, se empleó el cuestionario de sintomatología de ojo seco “Single Item Score Dry Eye Questionnaire” (SIDEQ) (Simmons PA, y cols. IOVS 2003;44: ARVO E-Abstract 2448), utilizado en ensayos clínicos por compañías farmacéuticas. Este cuestionario evalúa la presencia o ausencia de varios síntomas de ojo seco incluyendo sequedad, sensación de cuerpo extraño en el ojo, quemazón/escozor, dolor, picor, sensibilidad a la luz, visión borrosa y otros (especificar).

En el cuestionario SIDEQ original, cada síntoma es evaluado en una escala de 0 a 4, obteniendo la puntuación total como la suma de las puntuaciones parciales obtenidas en cada uno de los síntomas (Tabla 5).

TABLA 5. Cuestionario de sintomatología de SOS: SIDEQ.

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>ESCALA DE PUNTUACIÓN</u>
Sequedad	0 = No he sentido el síntoma.
Sensación de cuerpo extraño en el ojo	1 = Rara vez he sentido el síntoma, pero no es molesto.
Quemazón / escozor	2 = alguna vez he sentido el síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades.
Dolor	3 = siempre siento este síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades.
Picor	4 = siempre siento este síntoma, me causa molestias y además interfiere en mis actividades.
Sensibilidad a la luz	
Visión borrosa	
Otros (especificar)	

SIDEQ: Single ítem score dry eye questionnaire / Cuestionario de valoración de ojo seco.

En este estudio, se han evaluado los mismos síntomas que evalúa el SIDEQ original; sin embargo, el nivel de presencia de cada uno de los síntomas se recogió mediante escalas de valoración visual (visual analogue scale – VAS) (Aitken, 1969), con el fin de aumentar la sensibilidad de la prueba y determinar el grado de empeoramiento o mejora de cada uno de estos síntomas relacionados con el ojo seco en función de las condiciones ambientales.

El SIDEQ modificado con escalas VAS (anexo VII) muestra a los sujetos una línea horizontal de 10 cm de largo, en la que cada centímetro está señalado con una marca vertical y su número correspondiente de 0 a 10, donde los sujetos debían indicar, marcando la escala en cualquier punto con una línea vertical, el grado en el que sentían en ese momento cada uno de los síntomas. El extremo izquierdo de la línea (marca “0”), indicaba la ausencia de ese síntoma en este momento y el extremo derecho (marca “10”) indicaba la máxima intensidad de sensación de ese síntoma en ese momento.

Posteriormente, el evaluador medía con una regla milimetrada la distancia desde el extremo izquierdo (marca “0”) hasta el lugar donde el sujeto hubiera realizado la marca vertical, anotando el resultado de esta medida en milímetros.

Test de rojo de fenol – PRTT

El propósito de este test es medir la secreción lagrimal con un método mínimamente invasivo. El PRTT es un test de medida menos invasivo que el test de Schirmer (Sakamoto y cols., 1993). Se insertó una tira del test de rojo de fenol (Menicon Ca, LTD, Nagoya, Japón), que consiste en un hilo de algodón de 30 mm de longitud impregnada en rojo de fenol en el área temporal del fórnix conjuntival inferior de ambos ojos durante 15 segundos. Se indicó al sujeto que mantuviera la mirada al frente y que parpadeara con normalidad

durante la realización de la prueba. Transcurridos los 15 segundos se retiró la tira y se midió con la regla milimetrada proporcionada en el envase la longitud del hilo que había cambiado a color rojo debido a que se había humedecido con lágrima (Sakamoto y cols., 1993), anotando este resultado en milímetros. El test fue realizado en ambos ojos y no únicamente en el ojo seleccionado para el estudio, para producir la misma estimulación en ambos ojos. Valores de 20 milímetros o menores se consideraron fuera de los límites normales (Patel y cols., 1998).

Osmolaridad lagrimal

La osmolaridad lagrimal fue evaluada empleando el sistema de diagnóstico in vitro TearLab (TearLab Osmolarity System, Equipsa S.A, Madrid, España) diseñado para recolectar y analizar la osmolaridad lagrimal en una muestra de lágrima de 50 nanolitros (nL). Antes de proceder a la toma de cualquier medición, se comprobó la calibración del TearLab siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de lágrima se recogieron con el lápiz del TearLab del canto externo del ojo de forma no traumática a fin de producir la menor secreción refleja posible. Se empleó un cabezal desechable para cada medida y se realizó una medida por ojo. El sujeto tenía la cabeza ligeramente ladeada hacia el lado del ojo de estudio y miraba hacia el lado opuesto y ligeramente hacia arriba. Se utilizó el valor recomendado de 316 mOsm/l como criterio de corte para el diagnóstico del SOS (DEWS, 2007a; Tomlinson y cols., 2006).

Hiperemia bulbar

La hiperemia bulbar fue evaluada con una lámpara de hendidura SL-8z (TOPCON corporation, Tokyo, Japan) en base a la escala gráfica de Efron (Efron., 1998), que establece un rango de 0 a 4 (Figura 4). Se evaluó la

hiperemia bulbar de las áreas de exposición (nasal y temporal) de forma independientemente; sin embargo, el valor final se obtuvo del promedio de ambos valores. Asimismo, se tomó una fotografía a 16 aumentos e iluminación media de cada una de las áreas evaluadas mediante una cámara fotográfica DC-3 incluida en la lámpara de hendidura SL-8z empleada para la evaluación.



Figura 4. Escala gráfica de la hiperemia conjuntival bulbar (escala Efron). Tomada de Efron N. Grading scales for contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998;18:182-186.

Recogida de muestras de lágrima para el análisis de moléculas en la lágrima

Recogida de muestras de lágrima

Las muestras de lágrima para el posterior análisis de diversas moléculas fueron recolectadas siempre antes de instilar en el ojo cualquier tinción vital. Se recogieron 2 μ l de lágrima del canto externo del ojo de una manera no traumática para evitar tanto como fuera posible la secreción lagrimal refleja. Las muestras se recogieron empleando un capilar de vidrio de 2 μ l (Drummond Scientific Co, Broomall, PA, EE.UU.). Una vez obtenida la muestra, ésta era depositada en un microtubo estéril de 0.5 ml (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Alemania) mediante vaciado por aire empleando un Pipetboy

(Integra Biosciences AG, Zizers, Suiza). Los microtubos se encontraban previamente guardados en frío (5°C) y contenían 16 µl de Cytokine Assay Buffer (Merck Millipore, Millipore Iberica, Madrid, España), completando así, al vaciar en ellos la muestra, un volumen final de 20 µl en dilución 1:10. Cada muestra era sellada inmediatamente después de con parafilm (QUIMILID, Valladolid, España) y etiquetada adecuadamente, Figurando en la etiqueta la siguiente información: número de sujeto, visita, ojo y hora de extracción de la muestra. Tras el sellado y etiquetado, la muestras eran guardadas congeladas a -4°C y llevadas lo antes posible a -80°C hasta su análisis.

Análisis de las muestras de lágrima

Los niveles de las moléculas analizadas en lágrima se determinaron por análisis multianálisis en un Luminex IS-100 (Luminex Corporation, Austin, TX, EE.UU.) usando la tecnología de X-MAP, mediante el uso de ensayos comerciales. Las concentraciones del factor de crecimiento epidérmico (EGF), CX3CL1/fractaquina, interferón gamma (IFN-γ), interleuquina (IL)-1β, IL-1Ra, IL-2, IL-6, CXCL8/IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, factor de necrosis tumoral (TNF-α) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), se midieron simultáneamente con un ensayo de 15-plex (HCYTO-60K-15X Millipore Iberica MILLIPLEX, Madrid, España). La concentración de la metaloproteinasa 9 (MMP-9) se midió en un ensayo separado mediante un ensayo simple de MMP-9-plex (HMMP2-55K Panel 2, MILLIPLEX, Millipore Ibérica).

Brevemente, 10 µl de cada una de las muestras diluidas 1:10 se incubaron en agitación con microesferas recubiertas de anticuerpos específicos para cada molécula durante toda la noche a 4°C. Después del lavado, las microesferas se incubaron con los anticuerpos específicos biotinilados durante 1 hora,

seguido por una incubación con estreptocitocina biotinilado humano / quimioquinas o anticuerpos MMP-9 durante 1 hora, seguido de incubación con estreptavidina-ficoeritrina durante 30 min. Se emplearon curvas estándar, obtenidas a partir de muestras de concentración conocida de citoquinas/quimioquinas, EGF humanas recombinantes o MMP-9, para convertir las unidades de fluorescencia en concentración (pg/ml). Las concentraciones mínimas detectables para las moléculas analizadas se encuentran reflejadas en la Tabla 6. Los datos fueron almacenados y analizados con "Bead View Software" (Upstate-Millipore Corporation, Watford, Reino Unido). En algunas muestras, alguna de las moléculas analizadas fueron indetectables. Para incluir esas muestras en el análisis estadístico, se asignó a cada una de ellas el valor mínimo detectable (proporcionado por el fabricante, Tabla 6). No obstante, las moléculas que fueron detectadas en menos de 30% de la población no fueron analizadas.

TABLA 6. Concentraciones mínimas detectables para cada una de las 16 moléculas analizadas.

<u>MOLÉCULA</u>	<u>CMD</u> (pg/ml)	<u>MOLÉCULA</u>	<u>CMD</u> (pg/ml)
IFN- γ TNF α	0,1	EGF	2,7
CXCL8/IL-8 IL-17	0,2	IL-1Ra	2,9
IL-2 IL-6 IL-10	0,3	VEGF	5,8
IL-1 β IL-12p70	0,4	CX3CL1/ Fractalquina	6,0
CCL5/RANTES	1,0	MMP-9	10,0
CXCL10/IP-10	1,2		

CMD: Concentración mínima detectable (pg/ml); IL-: interleuquina; IFN- γ : interferón gamma; TNF- α : factor de necrosis tumoral; CCL5/RANTES: factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; MMP-9: metaloproteínasa 9.

Tear Break-Up Time (T-BUT)

El T-BUT evalúa la estabilidad de la película lagrimal de forma invasiva, ya que para tomar la medida el evaluador utiliza una sustancia exógena (fluoresceína sódica) que, al menos en teoría, podría afectar a la calidad y cantidad de la lágrima.

El T-BUT se evaluó dos minutos después de la instilación de 5 µl de fluoresceína sódica al 2% (Colircusí Fluoresceína 2%. Alcón Cusí, S.A. Barcelona, España) en el fornix conjuntival inferior con una micropipeta (Capp Single Pipette EcoPipet Red, Capp Pipettes, Everton Park, QLD, Australia). Los sujetos fueron instruidos para que parpadearan varias veces durante unos segundos con el fin de asegurar una repartición adecuada y homogénea del colorante. La película lagrimal fue examinada mediante biomicroscopía a través del filtro amarillo Wratten #12 (Eastman KREak Company, Rochester, NY, EE.UU.) utilizando una lámpara de hendidura SL-8z (TOPCON corporation, Tokyo, Japan) con 10x aumentos y bajo la iluminación del filtro azul cobalto incluido en la SL-8z (TOPCON corporation, Tokyo, Japan). Se pidió a los sujetos que parpadearan tres veces seguidas y posteriormente aguantaran sin parpadear hasta que se les indicase. Se midió en segundos y con ayuda de un cronómetro, el intervalo de tiempo entre el último parpadeo realizado por el sujeto y la aparición del primer punto negro o de la discontinuidad de la tinción con fluoresceína de la película lagrimal. Se realizaron tres medidas por sujeto. El T-BUT fue considerado la media de las tres medidas (Norn., 1969). Valores de 7 segundos o menores fueron considerados fuera de los límites normales (Lam y cols., 2009; Bourcier y cols., 2005).

Tinción corneal con fluoresceína sódica

La tinción con fluoresceína ocurre cuando ésta penetra la barrera de las células epiteliales. Para evaluar la tinción corneal con fluoresceína, se instilaron 5 µl de fluoresceína sódica al 2% en el fornix conjuntival inferior con una micropipeta. Tras dos minutos, se examinó la superficie ocular mediante biomicroscopía, con un objetivo de 16x y a través del filtro amarillo Wratten

#12 y del filtro azul cobalto incluido en SL-8z. La tinción corneal con fluoresceína se evaluó tanto con la escala Oxford (Bron., 1997) (Figura 5) como con la escala de Baylor modificada (Pflugfelder y cols., 2004) (Figura 6). El sistema de clasificación Oxford incluye cinco paneles (grados de 0 a 4) que representan diferentes grados de tinción corneal y conjuntival, siendo ésta la única escala usada durante la visita de inclusión de los sujetos en los estudios.

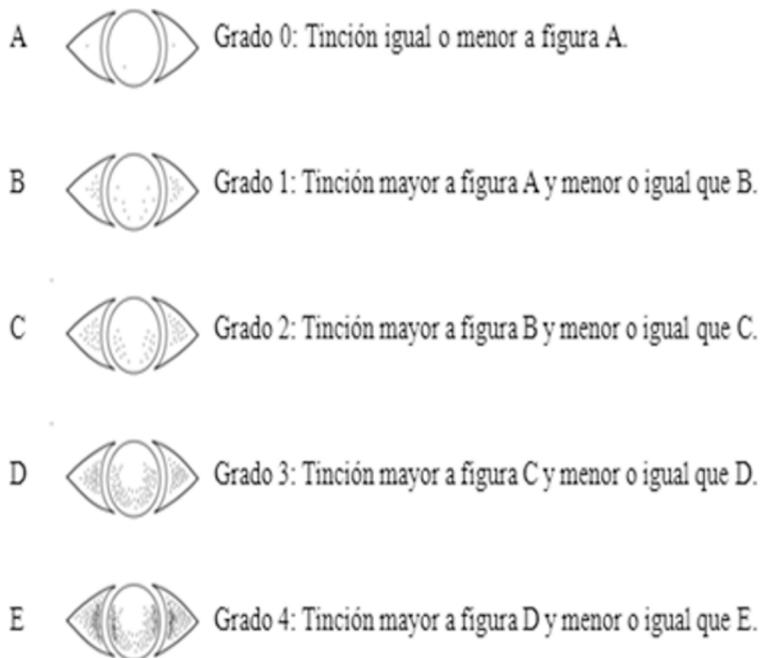


Figura 5. Escala gráfica de Oxford para la evaluación de la tinción corneal y conjuntival. Tomada de Bron AJ. The Doyne Lecture. Reflections on the tears. Eye (Lond) 1997;11 (Pt 5):583-602.

Grado: Contaje de puntos en las 5 áreas de la córnea	Puntuación
0 puntos (sin tinción)	0
1 – 5 puntos	1
6 – 15 puntos	2
16 – 30 puntos	3
≥ 30 puntos	4
Si hay:	
1 área de confluencia	Añadir 1
2 o más áreas de confluencia	Añadir 2
Queratitis filamentosa	Añadir 2

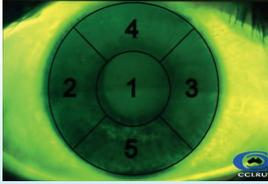


Figura 6. Escala de Baylor para la evaluación de la tinción corneal. Tomada de Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME. Dry Eye and Ocular Surface Disorders. New York: Marcel Decker; 2004a.

La escala Baylor fue utilizada para poder localizar geográficamente en la córnea las áreas donde se encontraban los mayores cambios en la tinción corneal. La córnea se evaluó a través de una plantilla incorporada en el sistema de visualización de la lámpara de hendidura SL-8z (TOPCON corporation, Tokyo, Japan) que dividía la córnea en 5 zonas (central, temporal, nasal, superior e inferior), alineando la circunferencia exterior con el limbo de igual forma en todos los sujetos, por lo que proporcionaba una variabilidad lo más baja posible en la división de áreas entre sujetos. Asimismo se tomó una fotografía general (16x, iluminación máxima, filtro azul cobalto y filtro amarillo) de cada una de las áreas evaluadas mediante una cámara fotográfica DC-3 incluida en la lámpara de hendidura.

Posteriormente, además de la escala Oxford, se utilizó la escala de Baylor (Pflugfelder y cols., 2004 (a, b)). La escala Baylor evalúa la intensidad de la tinción basándose en el número de puntos de tinción que se encuentran en

cada una de las 5 áreas empleando la escala que muestra la Figura 6. Para ello, se contó el número de puntos existentes en cada una de las 5 áreas, anotando la puntuación correspondiente (ej. si el área nasal presentaba 10 puntos de tinción, la puntuación de esa área era de 2). Además, si existía un área de confluencia, se añadía un punto más a la puntuación obtenida de esa área de la córnea; si se encontraban en una zona dos o más áreas de confluencia, se añadían, en lugar de un punto, dos puntos más; y si había queratitis filamentosa, otros 2 puntos.

Con el objetivo de proporcionar un análisis de la tinción corneal con más detalle, para esta tesis se ha modificado el sistema de clasificación de Baylor, dividiéndolo en dos escalas. Por una parte, contabilizamos la intensidad de la tinción, contando el número de puntos teñidos en cada una de las áreas de la córnea y, por otro lado, se cuantificó la gravedad de la tinción global. Es decir, por un lado se obtuvo la tinción corneal en sí (cantidad de daño corneal) presentada en cada una de las áreas evaluadas y clasificada con la escala de 0 a 4 puntos de Baylor; y por otro lado, clasificamos y anotamos de manera separada (no sumada, como ocurre en la escala original) la gravedad de la tinción presentada en cada una de las áreas siguiendo las indicaciones del esquema de Baylor sobre la presencia de confluencia y/o queratitis filamentosa.

Tinción conjuntival con verde de lisamina

La tinción conjuntival se evaluó empleando tiras de verde de lisamina (Menicon Ca, LTD, Nagoya, Japan). Las tiras se humedecieron con 25 µl de suero fisiológico (CINa 0.9% 10 ml, B/Braun, Barcelona, España) medido con una micropipeta. Posteriormente, se tenía la conjuntiva aplicando la tira

humedecida sobre la conjuntiva bulbar superior, al ser un área no expuesta y por lo tanto, no evaluada), para obtener la máxima intensidad de tinción y un buen reparto de la misma con el parpadeo. La tinción con verde de lisamina de la conjuntiva bulbar nasal y temporal se evaluó un minuto después de la instilación y de forma independientemente empleando para ello la escala Oxford (Figura 5) (Bron, 1997); sin embargo, el valor final se obtuvo del promedio de ambos valores. Asimismo se tomó una fotografía a 16 aumentos e iluminación media de cada una de las áreas evaluadas.

Test de Schirmer sin anestesia tópica

Se insertó una tira del test de Schirmer (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, Texas, EE.UU) en el canto externo del margen palpebral inferior de ambos ojos (Van Bijsterveld., 1969). Se pidió a los sujetos que mantuvieran los ojos cerrados durante la prueba. Transcurridos 5 minutos cronometrados, las tiras de Schirmer fueron retiradas de ambos ojos. El test fue realizado en ambos ojos y no únicamente en el ojo seleccionado para el estudio, para producir la misma estimulación en ambos ojos. Se midió y anotó en milímetros la parte de la tira que había sido humedecida con lágrima considerando valores iguales o superiores a 5 milímetros como normales (DEWS, 2007a).

CONTROLLED ENVIRONMENT RESEARCH LABORATORY - CERLab

Los individuos del estudio I fueron expuestos a tres condiciones ambientales diferentes dentro de una cámara ambiental denominada Controlled Environmental Research Laboratory (CERLab), propiedad de la spin off Visión I+D (Visión I+D, SL, Valladolid, España), en una acción de transferencia de tecnología del IOBA. CERLab engloba tanto la cámara ambiental, como el soporte externo dado a Visión I+D, proporcionado en este momento por el IOBA y que incluye principalmente: InmunoLab, el laboratorio de Patología Ocular, el laboratorio de Biología Molecular, la Unidad de Ensayos Clínicos y la Unidad de Estadística. La cámara ambiental se encuentra ubicada en el edificio IOBA de la Universidad de Valladolid, Valladolid, España. Esta instalación se compone de una cámara de exposición con una capacidad máxima de 8 sujetos y una cámara de evaluación (Figuras 7 y 8). Ambas cámaras poseen unas dimensiones de 6 metros de largo por 3 m de ancho (18 m²). En ambas salas (exposición y evaluación) pueden controlarse las siguientes variables ambientales:

- Temperatura: rango de 15 a 30°C, en pasos de 1°C.
- RH: rango de 5 a 80% en incrementos del 1%.

Además, en la sala de exposición se pueden controlar las siguientes variables ambientales:

- Presión atmosférica: rango de 930 a 450 mb, en pasos de 1 mb.
- Iluminación: rango de 10 a 1000 lux, en pasos de 1 lux.
- Flujo de aire: Velocidad del ventilador de salida: rango 0.60 a 3.60 m/s.

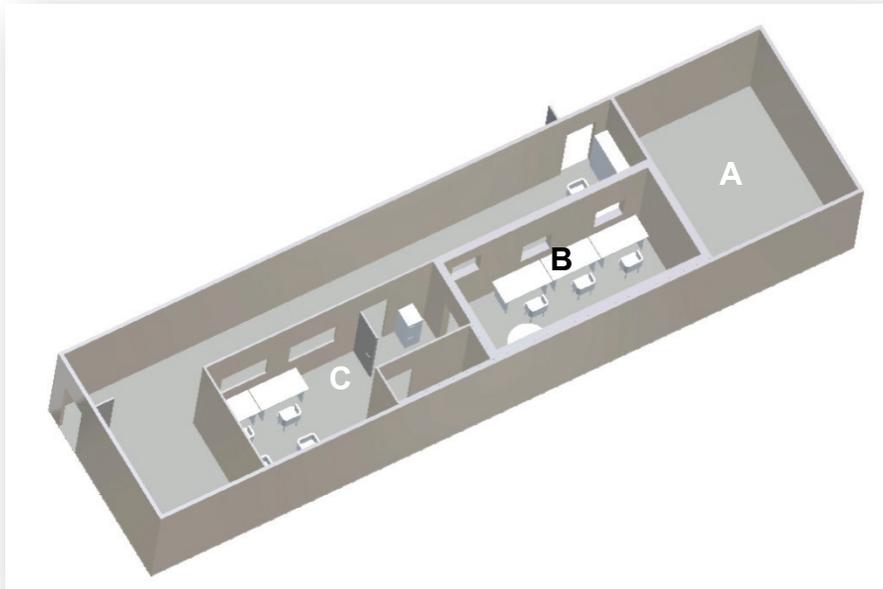


Figura 7. Esquema de la CAC - CERLab. A: sala de maquinaria; B: sala de exposición; C: sala de evaluación.



Figura 8. Imágenes del exterior de la CAC - CERLab. A: Vista exterior de la sala de exposición (al fondo) y de la sala de evaluación. B: Detalle exterior de la sala de exposición.

Todas las condiciones ambientales de CERLab se controlan a través de un panel de control situado fuera de la cámara (Figura 9). CERLab además está dotada de todas las medidas de seguridad necesarias para garantizar la seguridad de los sujetos durante los estudios.



Figura 9. Panel de la CAC para el control de las condiciones ambientales.

La sala de exposición se encuentra equipada con 4 puestos de ordenador cada uno de ellos con ofimática, acceso a internet, webcam y auriculares; un televisor LED de 55 pulgadas y una mesa de trabajo (Figura 10).



Figura 10. Imágenes del interior de la sala de exposición de CERLab. A: puestos de ordenador. B: puerta de acceso a la sala de exposición desde la sala de evaluación de CERLab. C: Sala de exposición. Al fondo observamos la pantalla de TV y a los laterales de la sala los sopladores o toberas individuales (Belnor Engineering Inc., Ottawa, ON, Canada) para la creación del flujo de aire. D: Vista general de la sala de exploración donde podemos observar la mesa de trabajo. Al fondo se localiza la sala de evaluación.

La sala de evaluación se encuentra completamente equipada con los instrumentos oftálmicos clínicos necesarios para evaluar la superficie ocular (Figura 11).

- Test digital LogMAR ETDRS (CC-100XP, Topcon corporation, Tokio, Japón) para toma de agudeza visual, sensibilidad al contraste, visión de colores,...
- Topógrafo corneal computerizado (Medmont E300, Medmont, Australia).
- Aberrómetro de frente de ondas Hartmann-Shack (IRX3, Imagine eyes, Francia).
- Lámpara de hendidura con sistema de vídeo incorporado (SL-8z, con cámara fotográfica DC-3; Topcon corporation, Tokio, Japón)
- Balanza de precisión con mesa antivibración (AS220/C/2, Radwag, Hilden, Alemania).
- Dos osmómetros (Tearlab® y Fiske 210, Equipsa, España).
- Estesiómetro de no contacto de Belmonte.



Figura 11. Imágenes del equipamiento de la sala de evaluación de CERLab.

A continuación se explican las particularidades de cada uno de los estudios que forman el presente trabajo de tesis doctoral.

ESTUDIO I

DESCRIPCIÓN DE LAS VISITAS

Este estudio se ha realizado en la Cámara de Ambiente Controlado – CERLab situada en el IOBA, Universidad de Valladolid, Valladolid, España.

Los sujetos candidatos a participar en él fueron evaluados en una visita inicial (V0) y posteriormente realizaron tres visitas más, completando un total de cuatro visitas. Las visitas estuvieron espaciadas entre sí un mínimo de 48 horas y un máximo de 15 días.

En este estudio participaron sujetos control, pacientes con SOS leve-moderado y pacientes con SOS severo, como se definirá más adelante.

Visita de inclusión (V0)

Todos los sujetos candidatos a participar en el estudio fueron evaluados en V0. En esta visita se determinaba si cumplían los criterios de inclusión y exclusión previamente descritos y en caso de ser así, se le invitaba a participar en el estudio y una vez incluidos, se le asignaba al grupo de estudio correspondiente.

A todos participantes se les realizó en primer lugar una historia clínica completa – Anamnesis (Anexo IV) y completaron el cuestionario OSDI® en su versión homologada española (Anexo V). A continuación, se realizaron una serie de tests clínicos para evaluar el estado de la superficie ocular. Estos

tests fueron realizados en ambos ojos y en el orden que se expone a continuación:

- PRTT.
- Instilación de fluoresceína.
- T-BUT.
- Evaluación de la tinción corneal con fluoresceína (2 minutos después de la instilación).
- Instilación de verde de lisamina.
- Evaluación de la tinción conjuntival con verde de lisamina (1 minuto después de la instilación).
- Test de Schirmer sin anestesia.

A los sujetos que cumplían los criterios de inclusión y exclusión para un grupo de estudio se les hacía entrega del consentimiento informado (ver anexo I) para su lectura.

Visitas de exposición (V1-V3)

Los sujetos que leyeron, comprendieron y firmaron el consentimiento informado fueron asignados al correspondiente grupo de estudio. Todos los sujetos participantes en los estudios realizaron el total de las visitas en la misma franja horaria: mañana (9:30-14:00) o tarde (15:30-20:00) El procedimiento de las visitas del estudio I dentro de la cámara fue el siguiente:

-
- Se seleccionó un único ojo de estudio para cada uno de los participantes.
 - Grupo Control: para el grupo control, se seleccionó como ojo de estudio el que superaba los criterios de inclusión y exclusión. En caso de que ambos ojos pudieran ser candidatos, éste se seleccionó aleatoriamente.
 - Grupo SOS leve-moderado y grupo SOS severo: para estos grupos, se seleccionó como ojo de estudio aquél que presentaba mayor grado de tinción corneal medido con escala Oxford en la visita de inclusión (V0). En caso de que ambos ojos presentaran el mismo grado de tinción corneal, se seleccionó como ojo de estudio aquél que presentaba mayor sintomatología (elegido por el paciente en el test OSDI® realizado en la visita de inclusión (V0). Si el paciente no presentara mayor sintomatología en uno de los dos ojos, el ojo de estudio se eligió aleatoriamente.
 - Entre 2 y 15 días después de la visita de inclusión, los participantes fueron evaluados antes y después de una exposición en la CERLab de dos horas a cada una de las tres condiciones (V1, V2, V3) ambientales del estudio I.
 - Previo a la exposición a las condiciones ambientales de estudio de la visita correspondiente (V1, V2 o V3), se realizó a cada sujeto la batería de tests de evaluación de la superficie ocular del estudio en la sala de evaluación de la cámara (pre-V1, pre-V2, pre-V3).
 - Todos los tests de evaluación de la superficie ocular fueron realizados únicamente en el ojo de estudio, exceptuando el PRTT y el test de

Schirmer, que fueron realizados en ambos ojos con el fin de mantener el mismo grado de estimulación en ambos ojos.

- La evaluación clínica subjetiva, que comprende la evaluación de hiperemia conjuntival, tinción corneal con fluoresceína, tinción conjuntival con verde de lisamina y el T-BUT, fueron realizados siempre por el mismo examinador (MTY), a fin de eliminar variaciones en los resultados de los test subjetivos debidos al examinador, siendo éste el mismo examinador que realizó la evaluación clínica subjetiva del estudio I.
- Posteriormente, los sujetos fueron invitados a entrar dentro de la sala de exposición en donde fueron expuestos a las condiciones ambientales de estudio que correspondieran a la visita que se estuviera realizando (V1-V3), que fueron siempre previamente programadas.
- El orden de las condiciones ambientales correspondientes a cada una de las visitas V1, V2 y V3 fue enmascarado tanto para los sujetos como para los evaluadores, con el fin de reducir tanto la subjetividad de los sujetos a las diferentes condiciones ambientales como la imparcialidad de los examinadores, garantizando así el enmascaramiento del estudio.
- El tiempo de permanencia por visita en la sala de exposición de la cámara fue de entre 2 y 2½ horas, periodo que comprende: el tiempo necesario para conseguir la estabilización y las condiciones óptimas de las variables de exposición, el tiempo de exposición a las variables ambientales (2 horas) y el tiempo de retorno al estado inicial.
- En cada una de las visitas, y tras la primera hora de estancia en la sala de exposición bajo las condiciones ambientales correspondientes, los sujetos completaron el cuestionario SIDEQ modificado dentro de la sala de

exposición, con el fin de evaluar las posibles variaciones en la sintomatología en el punto medio de la exposición.

- En cada visita, al finalizar la exposición a las condiciones ambientales, se realizó de nuevo a cada uno de los participantes en la sala de evaluación de la CERLab la misma batería de tests de evaluación de la superficie ocular realizada previo a la exposición (post-V1, post-V2, post-V3).
- La temperatura, tanto de la sala de exposición como de la sala de evaluación, se mantuvo constante para todas las condiciones ambientales de estudio ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Asimismo, se mantuvo una iluminación suave y constante para todas las exposiciones.
- **Para el estudio I**, la actividad visual llevada a cabo durante el tiempo de exposición de las visitas V1, V2 y V3 en la sala de exposición fue la realización de una tarea visual de cerca (lectura, juegos de mesa,...).
- Todas las exposiciones ambientales realizadas en el **estudio I** fueron **SIN FLUJO DE AIRE**.
- Las condiciones ambientales dentro de CERLab se controlaron durante toda la duración de los experimentos y se registraron en intervalos de 5 min.
- Las sesiones experimentales se llevaron a cabo sólo cuando un especialista en anestesia y reanimación estaba disponible en la unidad quirúrgica (situados en la misma planta) para atender cualquier posible evento médico adverso.

-
- A continuación, se exponen en orden de realización los tests de evaluación de la superficie ocular que se realizaron en cada una de las visitas (V1, V2 y V3) tanto en pre- como en post-
 - Cuestionario SIDEQ modificado.
 - Medida de la osmolaridad lagrimal (TearLab).
 - PRTT.
 - Evaluación de la hiperemia bulbar (nasal y temporal) (escala Efron).
 - Recogida de lágrima para análisis de citoquinas (2µl).
 - 10 minutos de descanso para recuperación de la lágrima basal.
 - Instilación de fluoresceína sódica (5µl al 2%).
 - T-BUT.
 - Evaluación de la tinción corneal con fluoresceína con escala de Oxford y escala de Baylor (2 minutos después de la instilación).
 - Tinción conjuntival con tira de verde de lisamina.
 - Evaluación de la tinción conjuntival con verde de lisamina (1 minuto después de la instilación)
 - Test de Schirmer sin anestesia.
 - Aclarado de ambos ojos con 20 ml de suero fisiológico (10 ml/ojo).

A continuación se adjunta un esquema del procedimiento del estudio (Figura 12).

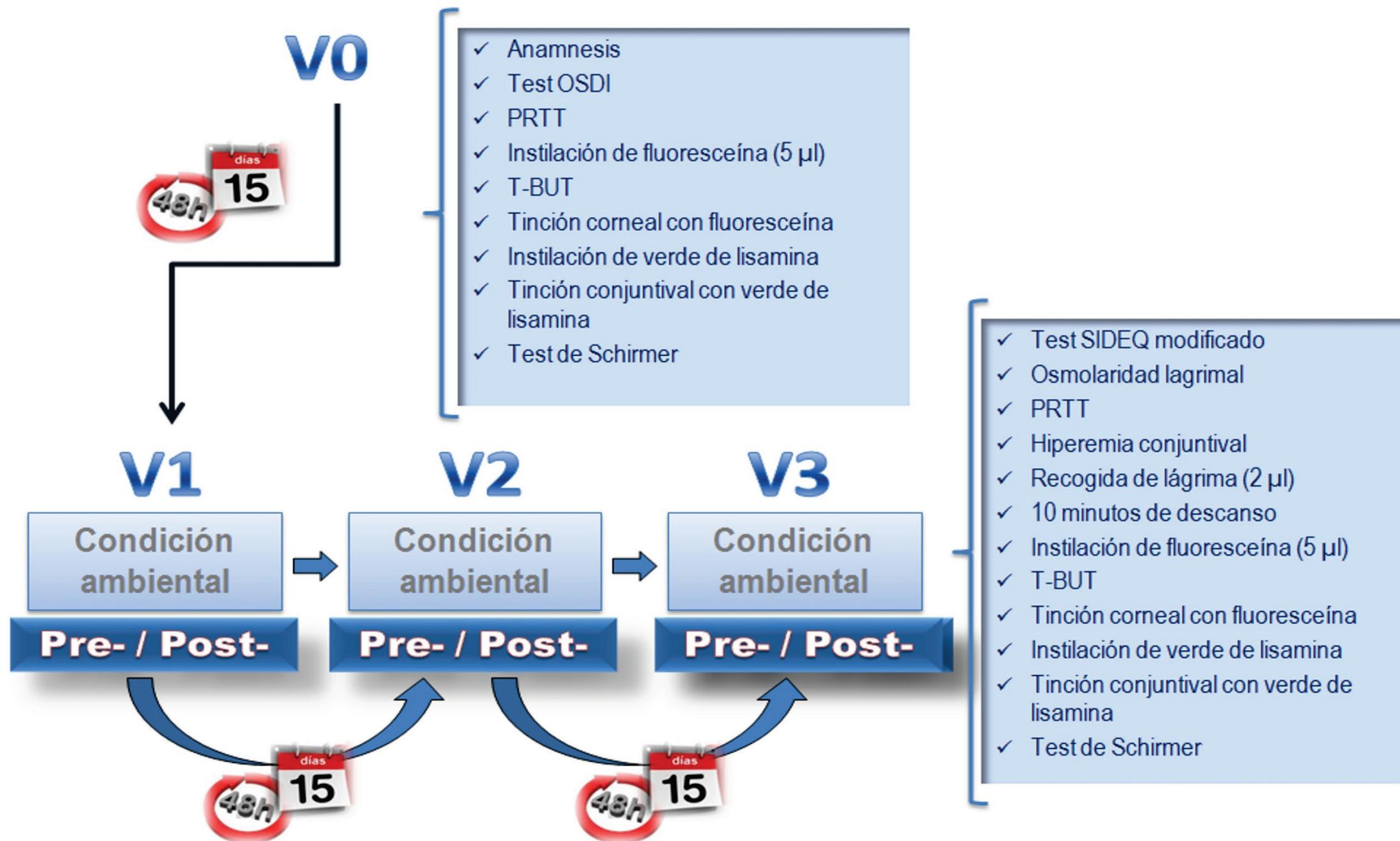


Figura 12. Esquema del procedimiento de los estudios I y II. V0: visita de inclusión; V1: 1ª exposición; V2: 2ª exposición; V3: 3ª exposición; OSDI: Ocular Surface Disease Index; PRTT: test de rojo de fenol; T-BUT: Tiempo de ruptura lagrimal; SIDEQ: Single Item Score Dry Eye Questionnaire.

CONDICIONES AMBIENTALES

A continuación se describen las características específicas de cada una de las condiciones ambientales diseñadas para el estudio I y a las que fueron expuestos los sujetos del mismo.

A. Condición ambiental estándar / standard condition (ST)

- RH: $45 \pm 10\%$ (moderada).
- Presión: presión atmosférica de Valladolid (alrededor de 930 mbar, equivalente a 700 m).
- A esta condición se la denomina a lo largo del estudio condición estándar únicamente por realizarse con condiciones habituales que suelen encontrarse en Valladolid, lugar de realización del estudio.

B. Condición ambiental de baja RH / Low humidity (LH)

- RH: $5 \pm 5\%$ (baja).
- Presión atmosférica de Valladolid (alrededor de 930 mbar).

C. Condición ambiental de baja RH + baja presión atmosférica / Low humidity and pressure (LHP)

- RH: $5 \pm 5\%$ (baja).
- Presión atmosférica de una cabina de avión en vuelo a unos 2500 m de altitud (8333 pies), lo que equivale a una presión en cabina de 750 mbar (la presión del externa del aire es alrededor de 1/3 menos de la presión a nivel del mar).

ESTUDIO II

El estudio II fue iniciado una vez analizados los datos preliminares del estudio I. El estudio I y II comparten íntegramente la metodología descrita, variando entre ellos únicamente las siguientes características:

- En este estudio participaron otro grupo de sujetos control y otro grupo de pacientes con SOS leve-moderado, excluyendo del mismo a pacientes con SOS severo.
- **Para el estudio II**, la actividad visual llevada a cabo durante el tiempo de exposición de las visitas V1, V2 y V3 fue la visualización de un documental en la pantalla de televisión situada dentro de la sala de exposición. La pantalla se encontraba situada superiormente con el fin de mantener a los sujetos con una posición de mirada superior, aumentando así el área de superficie ocular expuesta (similar a la posición que adopta la mirada en una sala de cine)
- Todas las exposiciones ambientales realizadas en el **estudio II** fueron **CON FLUJO DE AIRE**. El flujo de aire era proporcionado por unos sopladores individuales o toberas de las que dispone la sala de exposición y emitían un flujo constante y localizado de aire en la zona ocular. La velocidad del flujo de aire fue de 0,43 m/s a una distancia de la superficie ocular de los sujetos de aproximadamente 1 m.

ESTUDIO III

El estudio III fue realizado una vez finalizados los estudios I y II. Fue llevado a cabo en Braga durante una estancia breve realizada en el Laboratório de Investigação em Optometria Clínica e Experimental (CEORLab) del Centro de Física de la Universidade do Minho, Braga (Portugal). La estancia fue llevada a cabo durante los meses de abril, mayo y junio de 2012. El estudio III tiene parte de la metodología descrita, variando ciertas características que se describen a continuación:

- Previamente a la realización del estudio III se seleccionó una sub-muestra de sujetos de entre los sujetos control que participaron en los estudios I y II de Valladolid en los meses de Abril, Mayo y Junio de 2011 y 2012 (coincidiendo con los meses de la estancia en los que se evaluó a los sujetos control en Braga).
- En el estudio III, fue reclutada y analizada una muestra de sujetos control de Braga pareada en edad y sexo con la sub-muestra de sujetos control seleccionada entre los estudios I y II de Valladolid.
- Los participantes fueron reclutados siguiendo los mismos criterios de inclusión y exclusión utilizados para el grupo control en los estudios I y II (ver criterios de inclusión y exclusión). Asimismo, se realizó una visita de inclusión (V0) exactamente igual a la realizada en los estudios I y II para comprobar si cumplían los requisitos para formar parte del estudio. En caso de ser así, se les invitó a participar en el estudio, haciéndoles entrega del consentimiento informado, (ver anexo III) para su lectura y firma.

- El consentimiento informado del estudio III fue previamente aprobado por la Comisión de Investigación del IOBA y por el Comité Ético de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid y traducido al portugués.
- La evaluación completa de los participantes de Braga (Portugal) del estudio III fue realizada íntegramente por el mismo examinador (MTY) que fue quién realizó la evaluación clínica subjetiva de los estudios I y II, a fin de eliminar variaciones debidas a la subjetividad del examinador y que los resultados pudieran ser comparables.
- Se seleccionó el ojo de estudio siguiendo los mismos criterios empleados anteriormente para la selección del ojo de estudio de los sujetos control en los estudios I y II.
- Los sujetos control incluidos en el estudio III realizaron tres visitas (V1, V2 y V3) separadas un mínimo de 48 horas y un máximo de 15 días (siguiendo los mismos criterios que fueron empleados para los estudios I y II). En cada una de las visitas se realizó a cada sujeto la misma batería de tests de evaluación de la superficie ocular que fue realizada en los estudios I y II previamente a ser expuestos a las condiciones ambientales, con el objetivo de comparar estos resultados con los obtenidos en el subgrupo de controles de Valladolid. salvo dos de los tests: medida de la osmolaridad lagrimal con TearLab® y recogida de lágrima para el análisis de factores de crecimiento, citoquinas/quimioquinas y MMP-9.
- La osmolaridad lagrimal no pudo medirse debido a que el CEORLab no disponía del dispositivo empleado para la medición de la osmolaridad en los estudios I y II (TearLab®) y la imposibilidad de transportar el sistema a

la Universidade do Minho debido a que el dispositivo estaba siendo empleado en otros estudios en Valladolid durante la realización del estudio III.

- La recogida de lágrima para el análisis de moléculas en lágrima no fue llevado a cabo en este estudio por la dificultad que conllevaba el envío de las muestras al IOBA para su análisis.
- Tanto el consentimiento informado (como se ha especificado anteriormente), como el cuestionario OSDI[®] (anexo VIII) y el cuestionario SIDEQ modificado (anexo IX) fueron traducidos al portugués para facilitar la comprensión de los mismos a los participantes del estudio.
- Las condiciones ambientales exteriores (temperatura y RH) de los días correspondientes a las visitas de los sujetos del estudio III, así como de los días correspondientes a las visitas de los sujetos control seleccionados como sub-muestra de los estudios I y II fueron obtenidas y recogidas de la misma fuente de información meteorológica: <http://www.wunderground.com>.

A continuación, se adjunta un esquema del procedimiento del estudio (Figura 13).

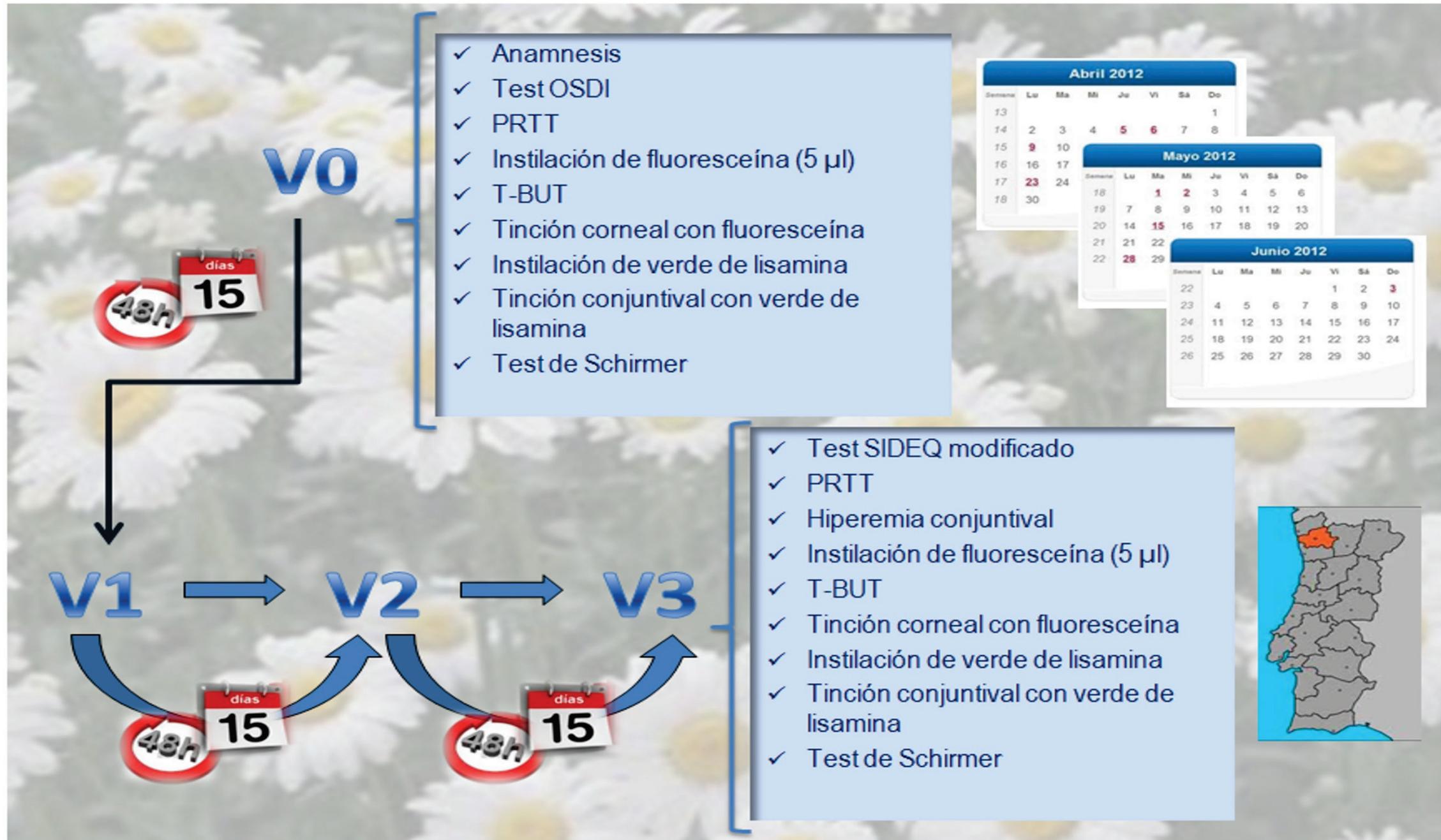


Figura 13. Esquema del procedimiento del estudio III. V0: visita de inclusión; V1: 1ª exposición; V2: 2ª exposición; V3: 3ª exposición; OSDI: Ocular Surface Disease Index; PRTT: test de rojo de fenol; T-BUT: Tiempo de ruptura lagrimal; SIDEQ: Single Item Score Dry Eye Questionnaire.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de todos los estudios (I, II y III) se han expresado como la media \pm error estándar de la media ($M \pm SEM$). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico para el software de Ciencias Sociales “SPSS 18,0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU” (RDC TEAM., 2010) y R software (R Development Core Team., 2010) por un estadístico licenciado (MEM) perteneciente al grupo de estadística del IOBA.

La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para la comparación de dos grupos de muestras independientes. Para las comparaciones entre las pruebas realizadas antes y después de la exposición al medio ambiente, se utilizó el test de Wilcoxon para las variables cuantitativas y la prueba de McNemar para las variables cualitativas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p-valor fue $p \leq 0.05$.

Además, en el estudio III se evaluó la fiabilidad de los tests diagnósticos realizados tanto en la población control de Braga como en la sub-muestra seleccionada de los estudios I y II de Valladolid. Estos tests se han medido en tres días distintos a todos los sujetos en condiciones similares cada día (en condiciones ambientales no controladas; al llegar de la calle antes de entrar en la cámara ambiental en el caso de la sub-muestra de Valladolid (pre-X), y antes de entrar en el gabinete en el caso de la sub-muestra de Braga).

La evaluación de la fiabilidad de las pruebas diagnósticas indica hasta qué punto se obtienen los mismos valores al efectuar la medición en más de una ocasión, bajo condiciones similares. En este caso, se han tomado las mediciones de los **tres días distintos** (separadas entre sí, al igual que para los estudios I y II, un mínimo de 48 horas y un máximo de 15 días), considerando similares el resto de condiciones.

Para estudiar la fiabilidad se han utilizado las siguientes técnicas:

Coefficiente de correlación intraclase (CCI): para las *variables cuantitativas* se calcula el CCI, que es la proporción de la variabilidad total que se debe a la variabilidad entre sujetos (la variabilidad total de las mediciones tiene dos componentes: la variabilidad debida a las diferencias entre los distintos sujetos y la variabilidad debida a las diferencias entre las medidas para cada sujeto). El CCI, al ser una proporción, toma valores entre 0 y 1. La máxima concordancia posible corresponde a un valor CCI=1, que significa que toda la variabilidad observada se debe a las diferencias entre sujetos y no a las distintas mediciones realizadas en ocasiones distintas. Si CCI=0 significa que la concordancia observada es la misma a la que se esperaría al azar.

Índice Kappa ponderado: para las *variables medidas en escala ordinal* (tinciones e hiperemia), se ha calculado el índice Kappa ponderado con pesos cuadráticos (asigna mayor diferencia en los pesos cuanto más alejadas estén las categorías en las discordancias). Este índice representa la proporción del acuerdo observado que excede la proporción de acuerdo por azar. Si el coeficiente es 1, es el caso de concordancia perfecta (proporción por azar es 0). Si el valor es 0, es total desacuerdo. La Tabla 7 muestra los valores de referencia el CII (Fleiss., 1986) y el índice Kappa (propuesta de Landis y Koch., 1977).

TABLA 7. Magnitud de la concordancia del coeficiente de correlación intraclase (ICC) y del índice Kappa ponderado.

ICC	FUERZA DE CONCORDANCIA	Índice Kappa
< 0,30	Mala o nula	< 0,20
0,31 – 0,50	Mediocre	0,21 – 0,40
0,51 – 0,70	Moderada	0,41 – 0,60
0,71 – 0,90	Buena	0,61 – 0,80
> 0,90	Muy buena	0,81 - 1

ICC: coeficiente de correlación intraclase.

RESULTADOS

ESTUDIO I

Validación del modelo

ESTUDIO I

RESULTADOS

VISITA DE INCLUSIÓN (V0)

Se reclutaron un total de 50 sujetos para el estudio I, de los cuales 20 fueron clasificados en base a los criterios de inclusión y exclusión como sujetos control, 15 como pacientes con SOS leve-moderado y otros 15 como pacientes con SOS severo. Un sujeto control abandonó el estudio por motivos de incompatibilidad de horarios. Los pacientes con SOS leve-moderado se encontraban bajo tratamiento para el SOS con lubricantes oculares y/o higiene palpebral, y los pacientes con SOS severo se encontraban estabilizados con CsA tópica.

Todos los grupos fueron pareados por edad. Ningún sujeto sufrió ningún efecto adverso durante la realización del estudio. Las características de los individuos que formaron parte del estudio I se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Distribución en edad y sexo de los participantes del estudio I.

GRUPOS	Grupo control	Grupo SOS leve-moderado	Grupo SOS severo	TOTAL
Varones n	9	10	1	20
Edad: M ± SEM	62,6 ± 3,1	57,5 ± 2,7	53,0 ± 0,0	62,8 ± 2,0
Mujeres n	10	5	14	29
Edad: M ± SEM	58,9 ± 1,6	65,8 ± 1,6	58,9 ± 2,8	60,0 ± 1,6
Total n	19	15	15	49
Edad: M ± SEM	60,6 ± 1,7	60,3 ± 2,1	58,5 ± 2,7	60,8 ± 1,2

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). SOS: síndrome de ojo seco; n: número de sujetos.

Tabla 9. Resultados de la visita de inclusión (V0) de los grupos del estudio I.

	Grupo control (n=19)	Grupo SOS leve-moderado (n=15)	Grupo SOS severo (n=15)	p valor
Índice OSDI[®]	2,26 ± 0,90	40,6 ± 5,97	57,03 ± 5,08	<0,001 / <0,001 / NS
Test de rojo de fenol (PRTT)	20,84 ± 1,74	24,13 ± 1,60	15,73 ± 2,23	NS / NS / 0,03
Tiempo de ruptura lagrimal (T-BUT)	5,39 ± 0,98	4,62 ± 0,86	2,20 ± 0,32	NS / 0,007 / 0,05
Tinción corneal (escala Oxford)	0,37 ± 0,11	0,33 ± 0,13	2,47 ± 0,29	NS / <0,001 / <0,001
Tinción conjuntival (escala Oxford)	0,51 ± 0,10	0,63 ± 0,18	1,70 ± 0,28	NS / 0,006 / 0,019
Test de Schirmer (sin anestesia)	14,97 ± 2,15	14,50 ± 1,94	5,13 ± 2,14	NS / 0,001 / 0,003

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). Comparación múltiple mediante el test U de Mann-Whitney entre: grupo control / grupo SOS leve-moderado; grupo control / grupo SOS severo y grupo SOS leve-moderado/ grupo SOS severo. SOS; síndrome de ojo seco; n: número de sujetos OSDI[®]; ocular surface disease index / Índice de enfermedad de la superficie ocular; NS: no significativo.

Como cabía esperar, el índice OSDI[®] fue significativamente menor en el grupo control que en ambos grupos de SOS, no observando ninguna diferencia significativa en el resto de los tests realizados entre el grupo control y el grupo de SOS leve-moderado. Es decir, la diferencia entre estos grupos era que éstos últimos presentaban síntomas y sus signos clínicos se encontraban bajo un buen control, ya que eran pacientes que llevaban tiempo bajo tratamiento.

El grupo control ha mostrado valores significativamente mejores que el grupo de SOS severo en todos los test realizados exceptuando el PRTT donde, a pesar de ser mayor el valor del grupo control, no ha habido diferencias significativas entre ambos grupos.

Ambos grupos de SOS han mostrado diferencias significativas entre sí en todos los tests realizados durante V0 a excepción del índice OSDI[®]. Es decir, ambos grupos son igualmente sintomáticos pero los SOS severos presentan una alteración mayor en los tests clínicos.

TESTS CLÍNICOS

Los resultados de los tests clínicos realizados antes y después de las exposiciones ambientales se encuentran en la Tabla 10. A continuación, se resumen los hallazgos significativos en los tests clínicos entre el examen pre- y el post-exposición a cada una de las condiciones ambientales (ST, LH, LHP) y para cada uno de los grupos.

Sintomatología

La puntuación obtenida en el cuestionario SIDEQ modificado por el grupo de SOS severo disminuyó significativamente después de una hora de exposición a la condición ST; sin embargo, esta diferencia no fue significativa a las 2 horas de exposición (Figura 14A, Tabla 10). No se observaron cambios significativos después de las condiciones de LH y LHP.

Osmolaridad

La osmolaridad lagrimal no se alteró significativamente en ningún grupo de estudio después de la Condición ST, aunque se observaron cifras menores (Figura 14A, Tabla 10). Además, se observó una tendencia al aumento de la osmolaridad en todos los grupos tras la exposición a las dos condiciones más adversas (LH y LHP), alcanzando significación estadística para el grupo control y el grupo de SOS severo después de la exposición a la condición LH, y para el grupo control después de la condición LHP.

PRTT y Test de Schirmer

En cuanto al PRTT, se observó una tendencia a la disminución en todos los grupos después de las condiciones con baja humedad (LH y LHP) alcanzando esta disminución significación estadística en el grupo control después de la condición LH y para el grupo de SOS grave después de la condición LHP. Los valores del test de Schirmer, sin embargo, no variaron significativamente después de la exposición a ninguna de las condiciones en ninguno de los grupos de estudio (Figura 14A y 14B, Tabla 10).

Hiperemia conjuntival (escala Efron)

La hiperemia conjuntival aumentó significativamente después de todas las condiciones para todos los grupos, excepto para el grupo de SOS severo tras la exposición a la condición ST y en el grupo control después de la exposición a la condición de LH, en el que el aumento no fue significativo (Figura 14B, Tabla 10).

T-BUT

A pesar de que los valores de T-BUT tendieron a disminuir en todos los grupos después de la exposición a las dos condiciones más adversas (LH y LHP), la reducción fue únicamente significativa para el grupo de SOS severo tras la exposición a la condición LHP (Figura 14B, Tabla 10).

Tinción corneal (escala Oxford y escala de Baylor)

Respecto a los resultados de la tinción corneal con fluoresceína evaluada con la escala de Oxford, ésta tendió a aumentar en todos los grupos después de la exposición a todas las condiciones de estudio, excepto para el grupo de SOS leve-moderado después de la exposición a la condición ST. Estas diferencias fueron significativas para el grupo control después de la exposición a las condiciones ST y LH y para el grupo de SOS severo tras la exposición a la condición LHP (Figura 14C, Tabla 10).

Asimismo, la tinción corneal evaluada con la escala de Baylor modificada mostró una tendencia al aumento de los valores en todas las áreas de la córnea para todos los grupos de estudio después de la exposición a todas las condiciones, excepto para la condición ST en el grupo de SOS severo en las áreas central (tendencia a la disminución) y superior (no cambia). Este aumento fue significativo en algunas de las áreas (Figura 15 y 16, Tabla 10). Se observó una tendencia clara al aumento de la severidad de la tinción para todas las áreas corneales evaluadas con la escala de Baylor modificada después de las condiciones más desfavorables (LH y LHP) en el grupo de SOS severo, alcanzando valores significativos tras la exposición a la condición LH (Figura 15 y 16, Tabla 10). En los otros dos grupos no se observa ningún cambio significativo o tendencia tras la exposición a ninguna de las condiciones ambientales estudiadas. Debido a su magnitud, la tabla 10 muestra únicamente los datos de tinción corneal en los que hubo diferencias estadísticamente significativas.

Tinción conjuntival (escala Oxford)

La tinción conjuntival con verde de lisamina mostró también una tendencia al aumento en todos los grupos después de todas las exposiciones (excepto para el grupo de SOS severo en la condición LH), alcanzando significación estadística después de la exposición a la condición LH para el grupo de SOS leve-moderado (Figura 14C, Tabla 10).

Comparativa entre los tres grupos

Cuando se compararon los tres grupos de sujetos entre sí, se observaron diferencias significativas en los resultados de las pruebas clínicas tanto en la evaluación pre- como en la post- exposición, mayoritariamente entre el grupo de SOS severo y los otros dos grupos de estudio, a excepción de la osmolaridad lagrimal bajo las condiciones ST y LHP, la hiperemia conjuntival en ambas condiciones extremas (LH y LHP) y en la severidad de la tinción corneal central en la escala de Baylor modificada en la condición ST y en la severidad central y nasal previo a la exposición a la condición LHP (Tabla 10). Mención especial merece la sintomatología, en la que las diferencias significativas se encuentran sobre todo entre el grupo control y los otros dos grupos de estudio.

Tabla 10. Resultados de los tests clínicos. Estudio I

TEST	Exposición	CONDICIÓN ESTANDAR -ST				CONDICIÓN BAJA HUMEDAD - LH				CONDICIÓN BAJA HUMEDAD Y BAJA PRESIÓN - LHP					
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo	p valor (entre grupos)	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo	p valor (entre grupos)	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo	p valor (entre grupos)		
SIDEQ Modificado	Pre	4,22 ± 1,24	10,32 ± 3,40	20,26 ± 2,12	B§;C‡	2,05 ± 0,57	10,14 ± 2,57	21,97 ± 3,33	A‡;B§	1,71 ± 0,52	8,33 ± 3,54	19,19 ± 2,73	B§;C‡		
	1 hora	2,29 ± 0,72	9,65 ± 3,39	13,88 ± 2,41*	A‡;B§	1,26 ± 0,54	9,11 ± 3,09	17,65 ± 3,34	A‡;B§	0,91 ± 0,35	9,26 ± 3,02	17,81 ± 3,75	A‡;B§		
	Post	1,83 ± 0,54	11,95 ± 3,47	15,21 ± 2,35	A‡;B§	1,65 ± 0,67	10,64 ± 3,27	17,21 ± 2,75	A‡;B§	2,26 ± 1,03	11,06 ± 3,22	17,60 ± 3,96	A‡;B§		
Osmolaridad Lagrimal	Pre	315,13 ± 4,60	319,13 ± 4,75	323,33 ± 4,98	-	309,38 ± 4,23	305,20 ± 5,36	317,33 ± 3,27	C‡	309,50 ± 5,18	307,00 ± 3,56	317,60 ± 5,18	-		
	Post	312,31 ± 2,94	314,53 ± 4,00	316,64 ± 4,82	-	322,63 ± 4,19*	312,40 ± 3,16	332,53 ± 6,82**	C‡	333,31 ± 7,05**	313,87 ± 3,49	326,60 ± 6,14	-		
Test de Rojo de Fenol (PRTT)	Pre	19,47 ± 1,37	18,53 ± 1,51	13,20 ± 1,81	B‡	21,95 ± 1,29	20,20 ± 1,79	12,47 ± 1,63	B§;C‡	18,11 ± 1,47	21,00 ± 1,78	12,20 ± 1,75	C‡		
	Post	18,89 ± 1,73	20,00 ± 1,75	13,20 ± 2,01	C‡	16,68 ± 1,68**	17,00 ± 1,37	12,46 ± 1,31	-	16,42 ± 1,66	19,20 ± 1,93	10,20 ± 1,44*	C‡		
Hiperemia Conjuntival (media)	Pre	0,89 ± 0,09	0,93 ± 0,14	1,57 ± 0,13	B§;C‡	1,26 ± 0,10	0,93 ± 0,12	1,33 ± 0,15	-	0,84 ± 0,08	1,07 ± 0,15	1,33 ± 0,20	-		
	Post	1,47 ± 0,12***	1,33 ± 0,13**	1,67 ± 0,14	-	1,45 ± 0,09	1,27 ± 0,11*	1,50 ± 0,14*	-	1,39 ± 0,15***	1,50 ± 0,15**	1,60 ± 0,15*	-		
Tear Break-Up Time (T – BUT)	Pre	3,60 ± 0,65	3,93 ± 0,87	1,31 ± 0,11	B§;C§	3,00 ± 0,37	4,29 ± 1,38	1,33 ± 0,14	B§;C‡	3,58 ± 0,55	3,80 ± 0,79	1,55 ± 0,19	B§;C‡		
	Post	3,12 ± 0,48	4,51 ± 1,81	1,57 ± 0,21	-	2,65 ± 0,23	2,24 ± 0,30	1,20 ± 0,15	B§;C§	2,97 ± 0,83	3,20 ± 0,82	0,87 ± 0,17**	B§;C§		
Tinción Corneal (Escala Oxford)	Pre	0,53 ± 0,16	0,80 ± 0,24	2,47 ± 0,19	B§;C§	0,47 ± 0,19	0,73 ± 0,21	2,60 ± 0,16	B§;C§	0,68 ± 0,19	0,60 ± 0,19	2,27 ± 0,21	B§;C§		
	Post	1,11 ± 0,24**	1,00 ± 0,26	2,33 ± 0,23	B‡;C‡	1,11 ± 0,23**	0,93 ± 0,28	2,73 ± 0,18	B§;C§	1,21 ± 0,21	0,80 ± 0,24	2,67 ± 0,23*	B‡;C§		
Tinción Corneal (escala Baylor modificada)	Central	Pre	0,21 ± 0,12	0,20 ± 0,14	2,00 ± 0,32	B§;C§	0,00 ± 0,00	0,27 ± 0,15	1,80 ± 0,37	B§;C§	0,32 ± 0,17	0,33 ± 0,16	2,00 ± 0,34	B§;C§	
		Post	0,26 ± 0,17	0,67 ± 0,23*	1,93 ± 0,33	B§;C‡	0,26 ± 0,15	0,53 ± 0,32	2,07 ± 0,38	B§;C‡	0,53 ± 0,14	0,73 ± 0,30	2,13 ± 0,41	B‡;C‡	
	Nasal	Pre	0,63 ± 0,25	1,00 ± 0,31	2,47 ± 0,35	B§;C‡	0,37 ± 0,17	0,73 ± 0,25	2,93 ± 0,33	B§;C§	0,63 ± 0,26	0,67 ± 0,21	2,67 ± 0,32	B§;C§	
		Post	1,16 ± 0,25*	1,40 ± 0,32	3,00 ± 0,32*	B§;C‡	0,95 ± 0,22**	1,20 ± 0,31	3,20 ± 0,24	B§;C§	1,32 ± 0,28*	1,07 ± 0,32	2,93 ± 0,33	B‡;C‡	
	Temporal	Pre	0,89 ± 0,20	0,73 ± 0,30	2,53 ± 0,27	B§;C§	0,37 ± 0,19	0,60 ± 0,23	2,60 ± 0,30	B§;C§	0,74 ± 0,19	0,67 ± 0,21	2,53 ± 0,26	B§;C§	
		Post	1,21 ± 0,26	1,00 ± 0,32	2,67 ± 0,30	B‡;C‡	1,11 ± 0,23**	1,13 ± 0,32*	3,27 ± 0,27**	B§;C§	1,26 ± 0,24*	1,13 ± 0,34*	2,60 ± 0,29	B‡;C‡	
	Superior	Pre	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07	1,00 ± 0,36	B§;C‡	0,05 ± 0,05	0,00 ± 0,00	1,20 ± 0,34	B§;C§	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,09	1,00 ± 0,31	B§;C‡	
		Post	0,21 ± 0,21	0,27 ± 0,27	1,00 ± 0,36	B‡	0,11 ± 0,07	0,40 ± 0,21	1,60 ± 0,36	B§;C‡	0,16 ± 0,11	0,40 ± 0,29	1,33 ± 0,40	B‡;C‡	
	Inferior	Pre	1,21 ± 0,28	1,27 ± 0,33	3,33 ± 0,19	B§;C§	0,79 ± 0,26	1,67 ± 0,36	3,33 ± 0,21	B§;C‡	1,37 ± 0,29	1,33 ± 0,39	3,20 ± 0,26	B‡;C‡	
		Post	2,05 ± 0,33*	2,00 ± 0,43*	3,40 ± 0,29	B‡;C‡	1,95 ± 0,31**	2,13 ± 0,36	3,53 ± 0,24	B‡;C‡	2,05 ± 0,28	1,73 ± 0,40	3,40 ± 0,26	B‡;C‡	
	Tinción Corneal - Severidad (escala Baylor modificada)	Central	Pre	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,34	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,67 ± 0,32	B‡;C‡	0,05 ± 0,05	0,13 ± 0,13	0,60 ± 0,30	-
			Post	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,60 ± 0,30	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,73 ± 0,25	B§;C‡	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,93 ± 0,32	B§;C§
Nasal		Pre	0,11 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,80 ± 0,33	B‡;C‡	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,87 ± 0,26	B§;C§	0,16 ± 0,11	0,07 ± 0,07	0,80 ± 0,33	-	
		Post	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,93 ± 0,33	B§;C‡	0,16 ± 0,11	0,00 ± 0,00	1,47 ± 0,31*	B§;C§	0,21 ± 0,14	0,07 ± 0,07	1,40 ± 0,30	B§;C§	
Temporal		Pre	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,32	B§;C§	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,27 ± 0,37	B§;C§	0,05 ± 0,06	0,07 ± 0,07	1,00 ± 0,32	B‡;C‡	
		Post	0,05 ± 0,05	0,13 ± 0,13	0,93 ± 0,33	B‡;C‡	0,21 ± 0,12	0,00 ± 0,00	1,60 ± 0,29	B§;C§	0,05 ± 0,06	0,00 ± 0,00	1,40 ± 0,21	B§;C§	
Inferior		Pre	0,05 ± 0,05	0,13 ± 0,13	1,73 ± 0,27	B§;C§	0,16 ± 0,11	0,07 ± 0,07	1,47 ± 0,24	B§;C§	0,37 ± 0,17	0,20 ± 0,14	1,13 ± 0,26	B‡;C‡	
		Post	0,21 ± 0,14	0,33 ± 0,19	1,53 ± 0,29	B§;C‡	0,42 ± 0,18	0,13 ± 0,13	1,87 ± 0,31	B§;C§	0,37 ± 0,17	0,13 ± 0,13	1,60 ± 0,29	B‡;C§	
Tinción Conjuntival (media)		Pre	0,68 ± 0,15	0,60 ± 0,16	2,03 ± 0,28	B‡;C‡	0,53 ± 0,14	0,33 ± 0,14	2,00 ± 0,27	B§;C§	0,68 ± 0,14	0,33 ± 0,13	1,77 ± 0,33	C§	
		Post	0,89 ± 0,25	0,73 ± 0,18	2,17 ± 0,32	B‡;C‡	0,79 ± 0,18	0,60 ± 0,16*	1,90 ± 0,29	B‡;C‡	0,79 ± 0,16	0,43 ± 0,14	2,17 ± 0,34	B‡;C§	
Test de Schirmer (sin anestesia)	Pre	11,11 ± 2,37	14,33 ± 2,61	4,87 ± 1,62	C§	8,42 ± 1,66	12,87 ± 2,67	3,87 ± 0,74	C§	11,63 ± 2,08	10,93 ± 2,26	4,00 ± 1,29	B‡;C‡		
	Post	11,53 ± 2,00	13,20 ± 2,36	4,93 ± 1,38	B‡;C‡	9,05 ± 1,85	12,00 ± 2,27	5,47 ± 2,31	C‡	11,05 ± 1,97	10,73 ± 2,16	4,33 ± 1,13	B‡;C‡		

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). Diferencias entre los tests antes y después de la exposición (test de Wilcoxon, test de Friedman para el cuestionario SIDEQ modificado): *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001. Significación estadística entre grupos (Test U de Mann-Whitney) (controles Vs SOS leve-moderado =A, controles Vs SOS severo = B y SOS leve-moderado Vs SOS severo =C) †p ≤ 0,05, ‡p ≤ 0,01, §p ≤ 0,001. SOS: síndrome de ojo seco; SIDEQ: Single Item Score Dry Eye Questionnaire.

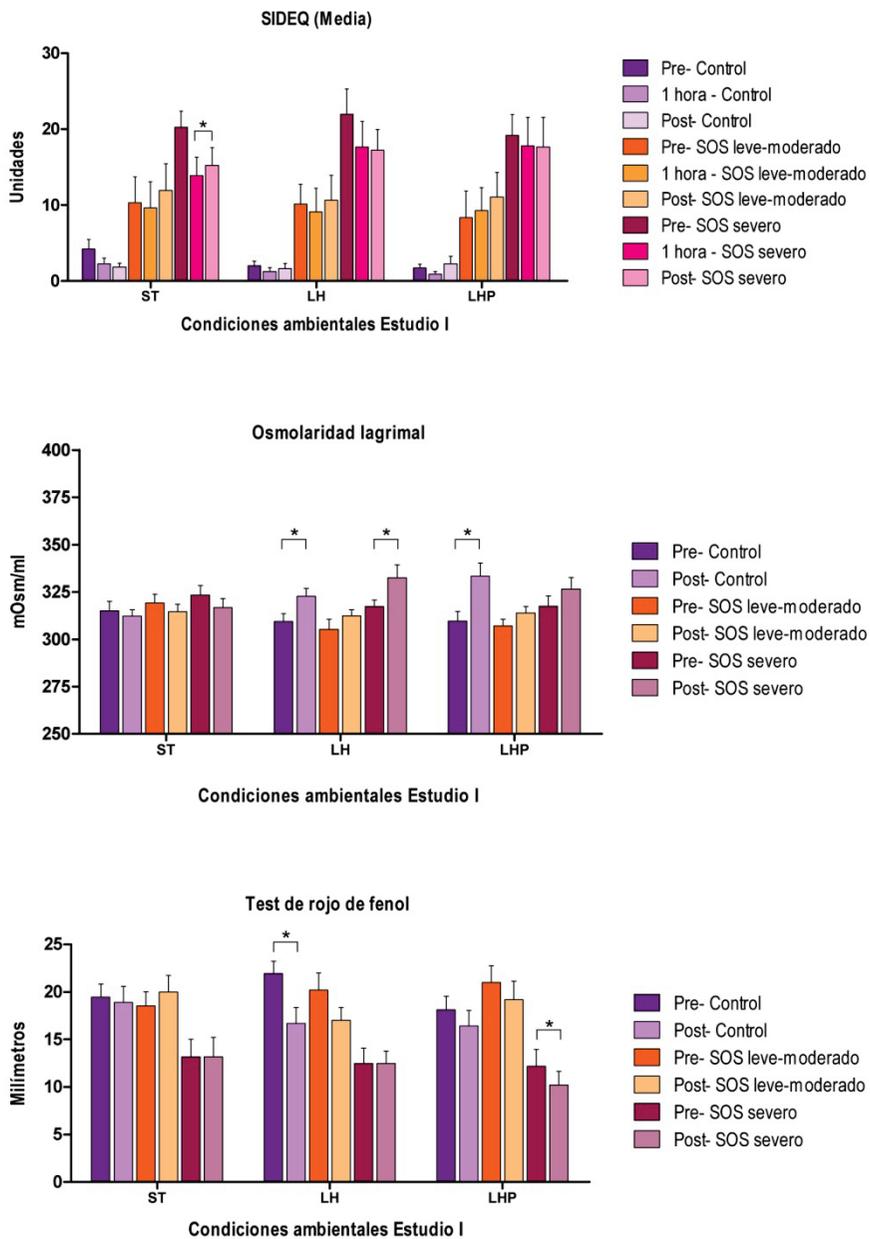


Figura 14A. Resultados de los tests clínicos: SIDEQ (media), osmolaridad lagrimal y PRTT. Estudio I. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

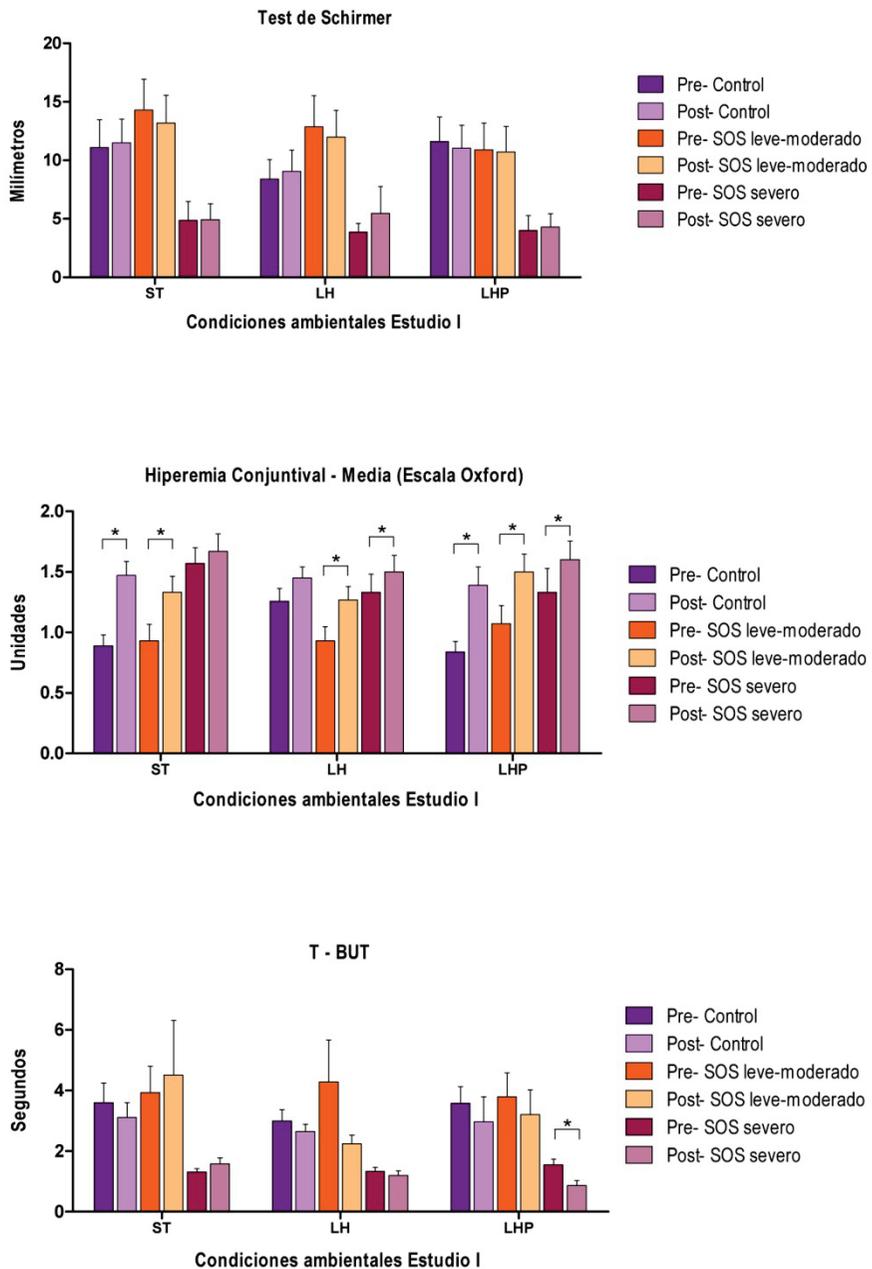


Figura 14B. Resultados de los tests clínicos: test de Schirmer, hiperemia conjuntival media (escala Oxford) y T-BUT. Estudio I. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

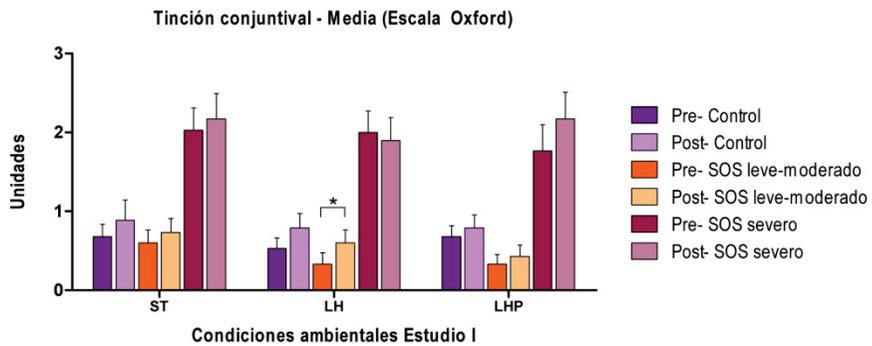
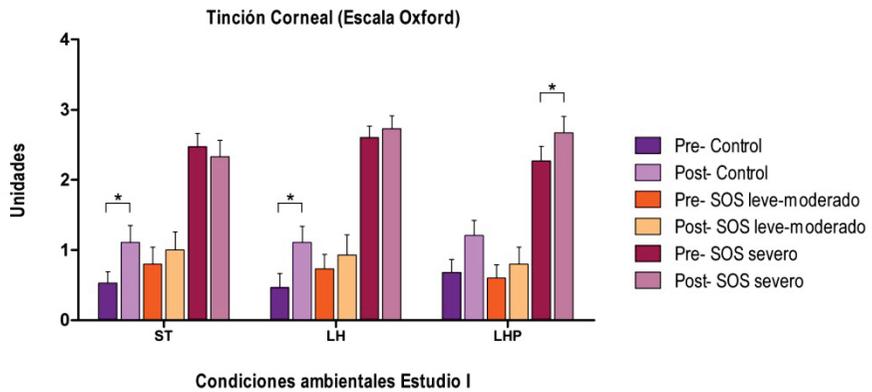


Figura 14C. Resultados de los test clínicos: tinción corneal y tinción conjuntival media (escala Oxford). Estudio I. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

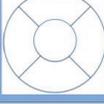
	CONDICIÓN ESTÁNDAR - ST	CONDICIÓN BAJA HUMEDAD - LH	CONDICIÓN BAJA HUMEDAD Y BAJA PRESIÓN - LHP
GRUPO CONTROL			
GRUPO SOS LEVE-MODERADO			
GRUPO SOS SEVERO			

Figura 15. Esquema de las áreas de tinción corneal con la escala de Baylor modificada que han presentado diferencias entre la valoración pre- y post- exposición para cada uno de los grupos del estudio I. El color azul representa un incremento significativo de la intensidad de tinción para esa área determinada (incremento del número de puntos de tinción). El color gris representa el incremento significativo de la severidad del daño encontrado en esa zona (áreas de confluencia de puntos y/o presencia de queratitis filamentosa). SOS: síndrome de ojo seco.

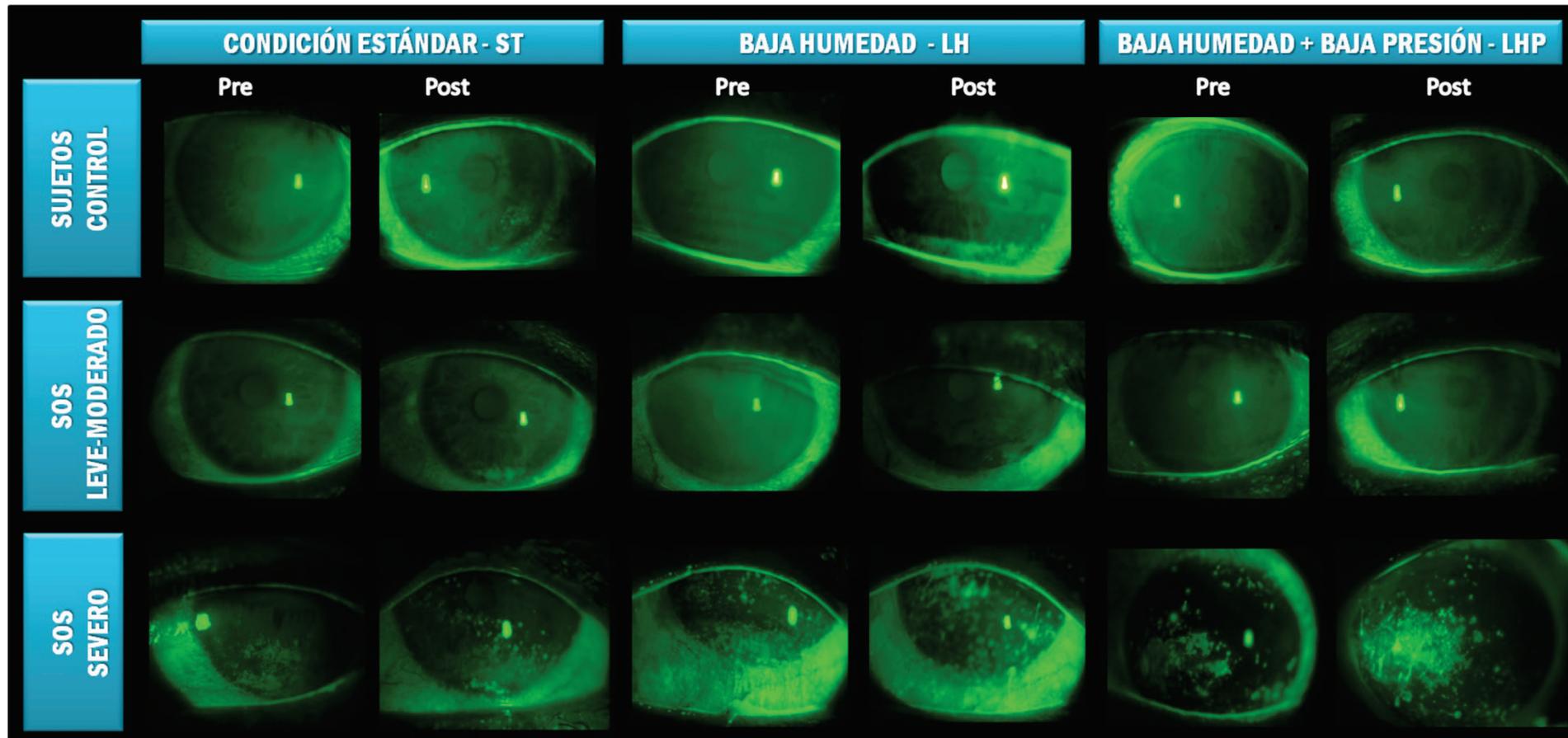


Figura 16. Imágenes de tinción corneal de los sujetos del estudio I.

ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS EN LA LÁGRIMA

Entre las 16 moléculas analizadas en lágrima, IL-1Ra, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 y MMP-9 tuvieron una tasa de detección por encima del 80% de los sujetos de estudio para todos los grupos en todas las condiciones. EGF, CX3CL1/fractalquina, IL-6 y VEGF se detectaron en una tasa superior al 50% y CCL5/RANTES por encima de 30% (Tabla 11). Los valores de detección de IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-12p70, IL-17 y TNF- α estaban por debajo del 30% para todos los grupos de estudio y en todas las condiciones de exposición, por lo tanto, sus valores no han sido considerados para el análisis estadístico por no ser lo suficientemente representativas; excepto para IL-10 en la condición LHP en la que se detectó por encima del 30% en los tres grupos de estudio. En la mayoría de las moléculas, se observó una tendencia a aumentar la tasa de detección tras la exposición. Merece mención especial la disminución en el porcentaje de detección de EGF para ambos grupos de SOS tras la exposición a las condiciones de baja humedad (LH y LHP). IL-8, IP-10, y MMP-9 tuvieron una detección casi siempre del 100%.

Los niveles en lágrima obtenidos para aquellas moléculas en las que hubo un porcentaje de detección por encima del 30% de la población se pueden consultar en la tabla 12. Ninguna de las 9 moléculas analizadas mostró cambios significativos en ninguno de los grupos de estudio en la comparación pre- y post- exposición a la condición ST. Además, el grupo control no varió significativamente en ninguna de las tres condiciones exceptuando un incremento significativo de los niveles de IL-1RA bajo la condición LHP. No obstante encontró una disminución significativa de los niveles de EGF en la condición LHP para el grupo de SOS severo (Figura 17A), de IL-1RA en la condición LH para los dos grupos de SOS (Figura 17A) y de IL-6 en la condición LH para el grupo de SOS severo (Figura 17B).

Comparativa entre los tres grupos

Comparando los grupos entre sí, se observaron diferencias significativas en los niveles de EGF entre el grupo control y el grupo de SOS severo antes y después de la exposición a todas las condiciones ambientales del estudio I. Además, hubo diferencias significativas en esta molécula entre ambos grupos de SOS antes de la exposición a la condición ST; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre estos grupos después de la exposición. Por otra parte, después de la exposición a la condición LHP, los dos grupos de SOS mostraron valores de EGF significativamente diferentes (Figura 17A).

Los niveles en lágrima de IL-1Ra fueron significativamente mayores en el grupo de SOS severo en comparación con el grupo control antes de la exposición a la condición ST (Figura 17A). Además, se encontraron también significativamente elevados en el grupo de SOS severo con respecto al grupo control y de SOS leve-moderado tras la exposición a la condición LH y con respecto al grupo SOS leve-moderado antes y después de la exposición a la condición LHP (Figura 17A).

Con respecto a IL-6, los valores pre- y post exposición en el grupo de SOS severo fueron mayores que en los otros dos grupos; sin embargo, no siempre hubo diferencias entre grupos (Figura 17B).

MMP-9 mostró diferencias significativas entre ambos grupos de SOS después de la exposición a las condiciones ST y entre controles y el grupo de SOS severo tras la exposición a la condición LH (Figura 17B).

Tabla 11. Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima. Estudio I

Moléculas	Tiempo	CONDICIÓN ESTÁNDAR - ST			CONDICIÓN BAJA HUMEDAD - LH			CONDICIÓN BAJA HUMEDAD y BAJA PRESIÓN - LHP		
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo
EGF	Pre	100%	100%	> 80%	100%	> 80%	> 80%	100%	100%	> 80%
	Post	100%	100%	> 80%	100%	> 80%	50 – 80%	100%	> 80%	50 – 80%
CX3CL1/FRACTALQUINA	Pre	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%	50 – 80%	50 – 80%
	Post	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	50 – 80%	50 – 80%
IL-1Ra	Pre	> 80%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
IL-6	Pre	50 – 80%	50 – 80%	> 80%	30 - 50%	50 - 80%	50 – 80%	> 80%	100%	100%
	Post	> 80%	> 80%	> 80%	30 - 50%	30 - 50%	> 80%	100%	100%	100%
CXCL8/IL-8	Pre	> 80%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
CXCL10/IP-10	Pre	> 80%	100%	> 80%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
CCL5/RANTES	Pre	50 – 80%	> 80%	50 – 80%	30 - 50%	< 30%	30 - 50%	50 – 80%	50 – 80%	50 – 80%
	Post	50 – 80%	50 – 80%	50 – 80%	< 30%	< 30%	30 - 50%	50 – 80%	50 – 80%	50 – 80%
VEGF	Pre	50 – 80%	50 – 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%	> 80%	50 – 80%	50 – 80%	50 – 80%
	Post	100%	> 80%	> 80%	100%	> 80%	> 80%	> 80%	50 – 80%	50 – 80%
IL-10	Pre	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50 – 80%	30 - 50%	30 - 50%
	Post	ND	ND	ND	ND	ND	ND	30 - 50%	30 - 50%	30 - 50%
MMP-9	Pre	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Niveles de detección de las moléculas analizadas en lágrima que alcanzaron más del 30% de detección, tanto antes como después de la exposición a las diferentes condiciones ambientales. SOS: síndrome de ojo seco; IL-: interleuquina; IFN- γ : interferón gamma; TNF- α : factor de necrosis tumoral; CCL5/RANTES: factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; MMP-9: metaloproteína 9.

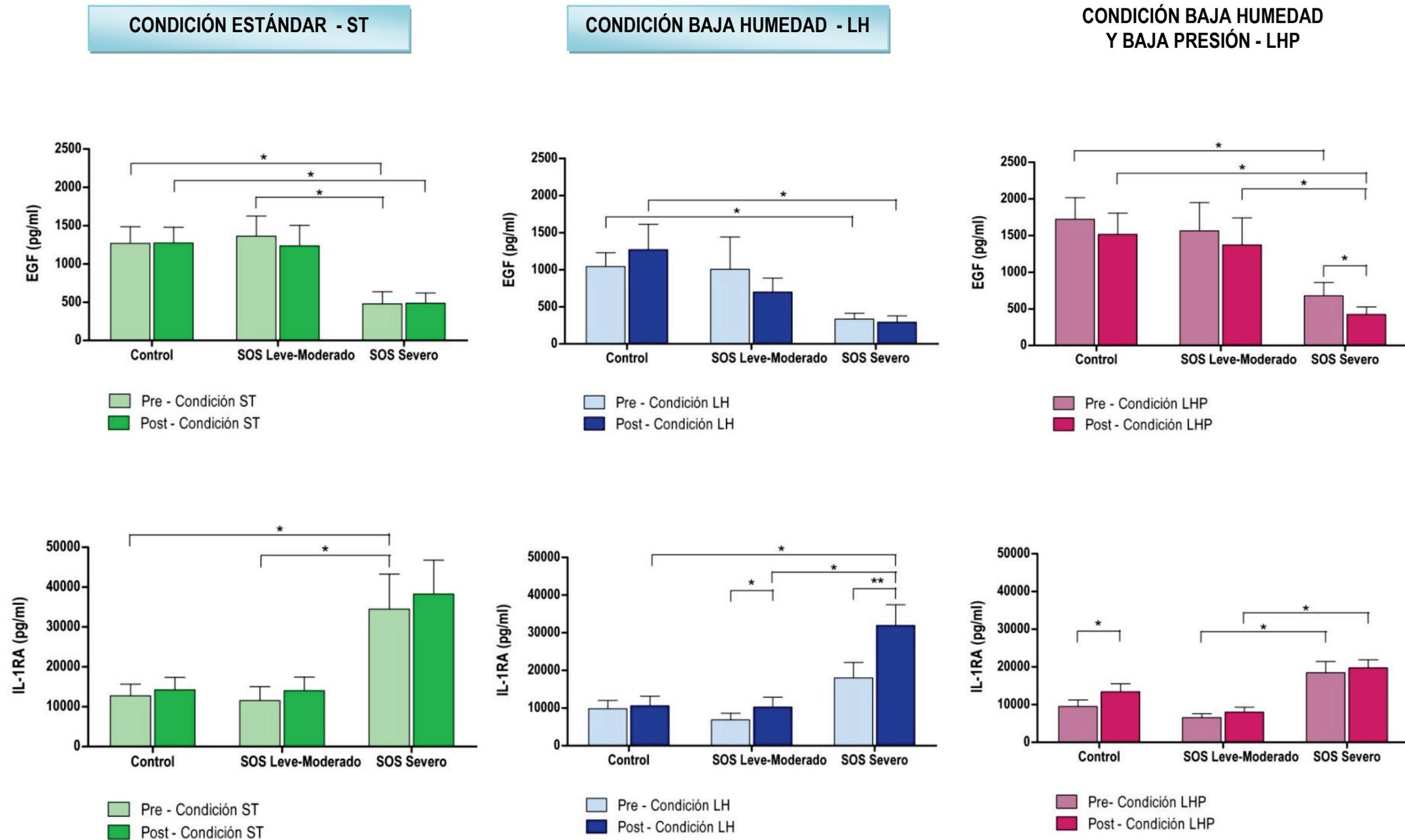


Figura 17A. Variación de los niveles de EGF e IL-1Ra en lágrima antes (barras claras) y tras dos horas (barras oscuras) de exposición en la cámara de ambiente controlado durante el estudio I. Verde: Condición estándar (ST); Azul: Condición de baja humedad (LH); Rojo: Condición de baja humedad y baja presión (LHP). SOS: síndrome de ojo seco.

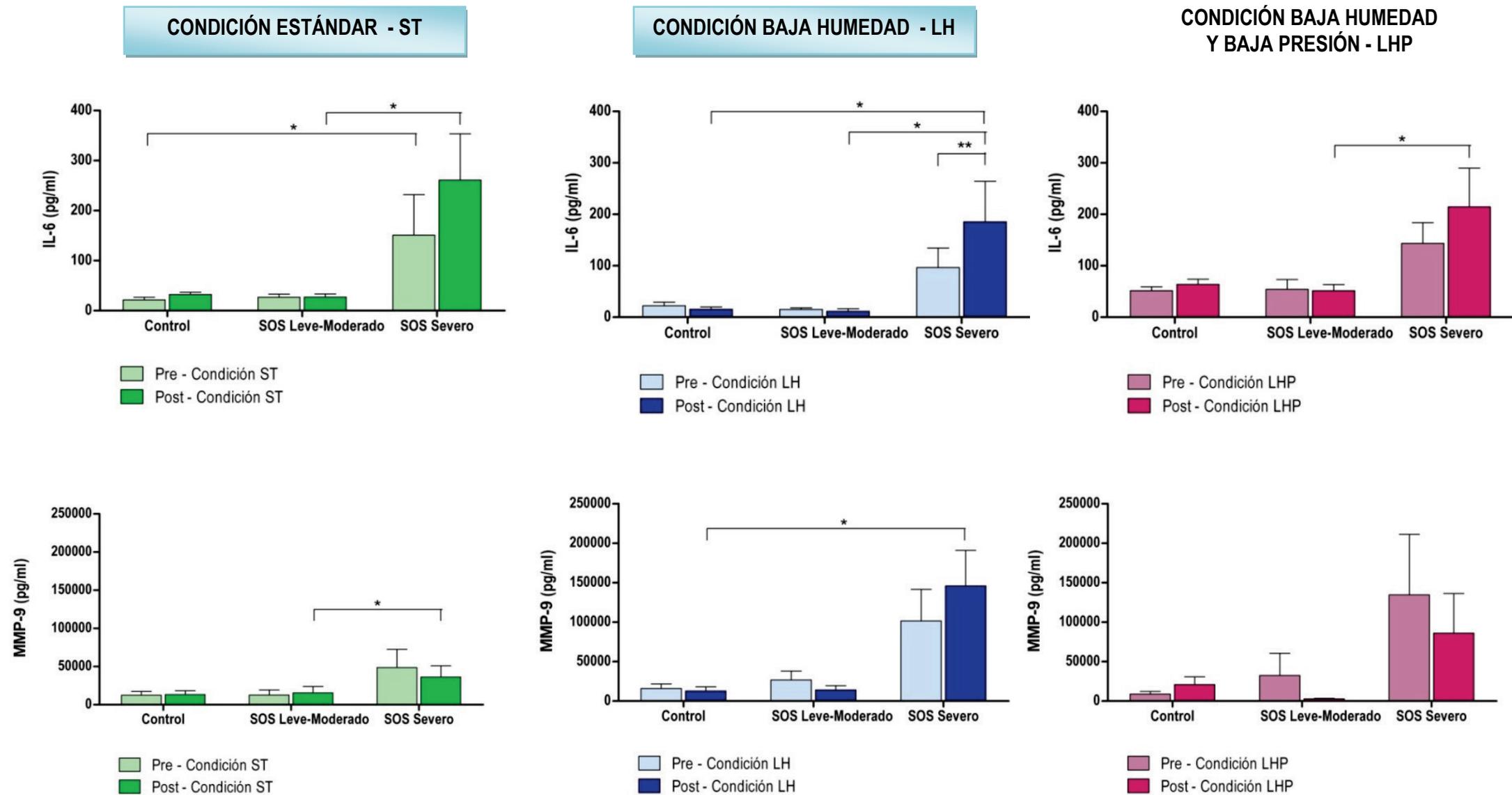


Figura 17B. Variación de los niveles de IL-6 y MMP-9 en lágrima antes (barras claras) y tras dos horas (barras oscuras) de exposición en la cámara de ambiente controlado durante el estudio I. Verde: Condición estándar (ST); Azul: Condición de baja humedad (LH); Rojo: Condición de baja humedad y baja presión (LHP). SOS: síndrome de ojo seco.

Tabla 12. Niveles de las moléculas detectadas en lágrima en un porcentaje mayor al 30%. Estudio I

Moléculas	Tiempo	CONDICIÓN ESTÁNDAR - ST			CONDICIÓN BAJA HUMEDAD - LH			CONDICIÓN BAJA HUMEDAD Y BAJA PRESIÓN - LHP		
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo SOS Severo
EGF	Pre	1267,3 ± 217,9	1362,3 ± 261,3	478,1 ± 157,5	1043,1 ± 184,5	1005,3 ± 434,5	334,5 ± 78,2	1720,9 ± 295,4	1563,9 ± 385,0	677,3 ± 181,0
	Post	1272,7 ± 205,0	1234,5 ± 268,8	486,4 ± 132,8	1268,9 ± 342,3	698,9 ± 187,6	293,7 ± 84,1	1516,4 ± 287,9	1371,7 ± 369,8	423,3 ± 102,0*
CX3CL1/ FRACTALQUINA	Pre	826 ± 205,2	741,8 ± 219,0	1671,9 ± 474,7	72,5 ± 155,9	587,9 ± 386,5	1125,1 ± 242,9	928,6 ± 156,1	836,7 ± 239,8	1945,3 ± 494,1
	Post	983,8 ± 236,2	780,8 ± 149,8	1807,5 ± 464,6	744,3 ± 124,0	677,5 ± 308,0	1673,2 ± 401,9	1106,8 ± 168,3	920,3 ± 332,8	1905,0 ± 412,7
IL-1Ra	Pre	12713,4 ± 2914,7	11529,3 ± 3476,8	34466,4 ± 8812,6	9800,0 ± 2225,8	6841,0 ± 1802,2	18040,0 ± 4049,6	9524,7 ± 1742,2	6566,9 ± 1033,9	18496,3 ± 2944,4
	Post	14234,7 ± 3101,2	14018,5 ± 3426,7	38263,7 ± 8505,4	10599,4 ± 2527,8	10252,7 ± 2625,6*	31935,6 ± 5508,1**	13429,1 ± 2111,5*	8006,4 ± 1310,4	19766,7 ± 2119,3
IL-6	Pre	21,5 ± 5,4	26,9 ± 6,4	150,9 ± 80,9	22,0 ± 7,1	15,0 ± 3,1	96,6 ± 37,8	51,5 ± 7,8	54,3 ± 19,0	143,6 ± 40,3
	Post	32,4 ± 4,5	27,3 ± 6,2	261,0 ± 92,6	15,6 ± 4,2	11,7 ± 4,8	185,4 ± 78,9**	63,9 ± 9,8	51,5 ± 12,1	214,5 ± 75,2
CXCL8/IL-8	Pre	1299,6 ± 489,1	2085,8 ± 936,2	4719,7 ± 1728,1	915,8 ± 212,1	3713,0 ± 2384,8	4169,7 ± 2089,8	1211,7 ± 328,1	1185,5 ± 312,3	4382,7 ± 1456,9
	Post	887,4 ± 257,0	855,1 ± 244,8	5307,9 ± 1695,1	1545,1 ± 1018,1	825,2 ± 372,6	4976,4 ± 1598,8	1178,0 ± 281,2	751,9 ± 163,9	3542,9 ± 912,5
CXCL10/IP-10	Pre	67899,6 ± 11258,0	50300 ± 6262,3	48050,9 ± 9767,1	63263,0 ± 7103,4	47920,0 ± 5455,3	47426,7 ± 8862,8	39273,7 ± 7188,9	30780,0 ± 3716,7	28028,0 ± 7197,2
	Post	67378,9 ± 11500,7	45513,3 ± 5627,9	45074,3 ± 11329,7	59194,7 ± 7309,1	45711,3 ± 6543,5	54014,0 ± 8079,3	37515,8 ± 5867,0	27232,7 ± 3970,6	26530,7 ± 4828,0
CCL5/RANTES	Pre	22,2 ± 4,6	27,3 ± 1,7	104,4 ± 49,6	41,7 ± 14,7	25,9 ± 8,5	36,7 ± 12,1	61,2 ± 20,7	26,8 ± 6,3	124,3 ± 6,0
	Post	20,7 ± 4,0	20,7 ± 1,3	105,4 ± 38,5	28,2 ± 13,6	14,8 ± 3,4	73,6 ± 33,7	89,2 ± 53,6	31,1 ± 9,5	46,9 ± 9,1
VEGF	Pre	611,9 ± 102,9	492,3 ± 133,8	872,7 ± 294,4	443,1 ± 73,6	422,9 ± 126,1	685,8 ± 240,4	773,4 ± 150,3	553,4 ± 159,7	1108,9 ± 343,4
	Post	653,0 ± 71,5	505,8 ± 80,4	1077,1 ± 236,4	490,9 ± 72,0	320,9 ± 109,6	901,2 ± 270,1	850,0 ± 155,8	569,1 ± 156,1	1061,3 ± 289,7
IL-10	Pre	ND	ND	17,6 ± 7,8	ND	ND	ND	9,9 ± 1,7	8,0 ± 2,7	32,7 ± 22,8
	Post	ND	ND	61,5 ± 33,1	ND	ND	ND	12,5 ± 2,3	16,6 ± 3,5*	17,2 ± 8,6
MMP-9	Pre	12334,2 ± 5091,4	12606,8 ± 6755,0	48585,8 ± 24044,1	15849,2 ± 5873,7	24972,2 ± 23591,8	101515,6 ± 40060,1	8907,6 ± 3370,3	3080,9 ± 878,2	134648,4 ± 58000,5
	Post	13141,0 ± 5169,8	15528,8 ± 8365,6	36423,3 ± 2412,6	12817,9 ± 5135,0	37136,9 ± 40239,2	145867,1 ± 44988,7	20925,4 ± 9455,7	2914,6 ± 821,7	86242,0 ± 35470,1

Niveles de las moléculas analizadas en lágrima que alcanzaron más del 30% de detección, tanto antes como después de la exposición a las diferentes condiciones ambientales. SOS: síndrome de ojo seco; IL-: interleuquina; IFN-γ: interferón gamma; TNF-α: factor de necrosis tumoral; CCL5/RANTES: factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; MMP-9: metaloproteína 9.

ESTUDIO II

Mejora del modelo

ESTUDIO II

RESULTADOS

VISITA DE INCLUSIÓN (V0)

Para este estudio se reclutaron un total de 40 sujetos, de los cuales 20 fueron clasificados en base a los criterios de inclusión y exclusión como sujetos control y otros 20 como pacientes con SOS leve-moderado. No fueron incluidos pacientes con SOS severo. Ninguno de los individuos reclutados abandonó el estudio. Los pacientes con SOS leve-moderado se encontraban bajo tratamiento para el SOS con lubricantes oculares y/o higiene palpebral. Ambos grupos fueron pareados por edad. Las características de los individuos que formaron parte del estudio II se muestran en las Tablas 13 y 14.

Se siguió el protocolo descrito previamente para el estudio II, por lo que fueron expuestos a las tres condiciones ambientales descritas anteriormente e iguales a las condiciones ambientales del estudio I (ST, LH y LHP), variando la presencia de flujo de aire y la tarea visual a realizar (documental o película en el televisor LED).

Tabla 13. Distribución en edad y sexo de los participantes del estudio II.

GRUPOS	Grupo control	Grupo SOS leve-moderado	TOTAL
Varones n	6	6	12
Edad: M ± SEM	62,2 ± 3,0	63,0 ± 3,7	62,6 ± 2,3
Mujeres n	14	14	28
Edad: M ± SEM	58,1 ± 2,3	65,36 ± 2,12	61,7 ± 1,7
Total n	20	20	40
Edad: M ± SEM	59,3 ± 1,9	64,65 ± 1,81	62,0 ± 1,4

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). SOS: síndrome de ojo seco; n: número de sujetos.

Tabla 14. Resultados de la visita de inclusión (V0) de los grupos del estudio II.

	Grupo control (n=19)	Grupo SOS leve-moderado (n=15)	Grupo SOS severo (n=15)
Índice OSDI®	3,27 ± 0,84	35,73 ± 2,79	<0,0001
Test de rojo de fenol (PRTT)	23,44 ± 1,26	21,40 ± 1,26	NS
Tiempo de ruptura lagrimal (T-BUT)	4,22 ± 0,61	3,82 ± 0,55	NS
Tinción corneal (escala Oxford)	0,50 ± 0,11	0,75 ± 0,15	NS
Tinción conjuntival (escala Oxford)	0,45 ± 0,14	0,25 ± 0,08	NS
Test de Schirmer (sin anestesia)	10,82 ± 1,22	11,83 ± 1,68	NS

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). Comparación múltiple mediante el test U de Mann-Whitney entre: grupo control / grupo SOS leve-moderado; grupo control / grupo SOS severo y grupo SOS leve-moderado/ grupo SOS severo. SOS; síndrome de ojo seco; n: número de sujetos OSDI®; ocular surface disease index / Índice de enfermedad de la superficie ocular; NS: no significativo.

Las puntuaciones de OSDI® para los pacientes con SOS leve-moderado fueron significativamente mayores que para los sujetos control sin que hubiera diferencias significativas en el resto de medidas objetivas realizadas. Ningún sujeto sufrió ningún efecto adverso durante la realización del estudio.

TESTS CLÍNICOS

Las puntuaciones de OSDI® para los pacientes con SOS leve-moderado fueron significativamente mayores que para los sujetos control sin que hubiera diferencias significativas en el resto de medidas realizadas. Ningún sujeto sufrió ningún efecto adverso durante la realización del estudio.

Sintomatología

La puntuación de la sintomatología medida mediante el cuestionario SIDEQ modificado mostró una tendencia a disminuir en ambos grupos de estudio después de la exposición a la condición ST, mientras que para la condición LHP la tendencia para ambos fue la opuesta, sin llegar en ninguno de los dos casos a ser significativa. Además, ambos grupos mostraron diferencias significativas antes de la exposición, manteniéndose estas diferencias a la hora y a la finalización de todas las exposiciones (ST, LH y LHP) (Figura 18A, Tabla 15).

Osmolaridad

La osmolaridad lagrimal disminuyó en ambos grupos de estudio después de la exposición a la condición ST, siendo esta diferencia significativa en el grupo de SOS leve-moderado. Sin embargo, mientras que la tendencia de ambos grupos fue contraria bajo la condición de LH (en el grupo control a disminuir la osmolaridad tras la exposición y en el grupo de SOS leve-moderado a aumentarla), el comportamiento de ambos grupos tras la exposición a la condición LHP fue a aumentar la osmolaridad lagrimal, a pesar de no alcanzar la significación estadística en ninguno de los dos grupos. Además, ambos grupos mostraron diferencias significativas antes de la exposición tanto a la

condición ST como a la de LH, sin embargo, en ambos casos desaparecieron tras la exposición (Figura 18A, Tabla 15).

PRTT y Test de Schirmer

El PRTT disminuyó en ambos grupos únicamente después de la exposición a la condición LHP aunque sólo alcanzó la significación estadística en el grupo de SOS leve-moderado, y no se han encontrado en ningún caso diferencias entre grupos ni antes ni después de las exposiciones. Sin embargo, se han encontrado diferencias significativas en los valores del test de Schirmer entre ambos grupos, manteniendo estas diferencias después de la exposición a la condición ST y perdiéndolas tras la exposición a la condición de LH. Además, los valores del test de Schirmer sin anestesia han sido significativamente superiores en el grupo de SOS leve-moderado después de la exposición a la condición de LH, observando también una tendencia a aumentar en el grupo control bajo ésta condición (Figura 18A y 18B, Tabla 15).

Hiperemia conjuntival (escala Efron)

La hiperemia conjuntival muestra una tendencia a aumentar tras todas las exposiciones del estudio, sin embargo, éste aumento fue únicamente significativo para ambos grupos tras la exposición LHP y en el grupo SOS leve-moderado tras la exposición a la condición ST (Figura 18B, Tabla 15).

T-BUT

El T-BUT se ha encontrado significativamente disminuido en ambos grupos de estudio tras la exposición a las dos condiciones ambientales con baja RH (LH y LHP), no mostrando cambios singificativos en ninguno de los dos grupos después de exponerse a la condición ST. (Figura 18B, Tabla 15).

Tinción corneal (escala Oxford y escala de Baylor)

La tinción corneal evaluada mediante la escala Oxford aumentó significativamente en ambos grupos tras la exposición a todas las condiciones del estudio. Del mismo modo, utilizando la escala de Baylor modificada, observamos en el grupo control un aumento en el número de puntos de tinción en cuatro de las cinco áreas evaluadas con esta escala (exceptuando el área superior) tras la exposición a todas las condiciones, así como un aumento significativo en la severidad de la tinción (presencia de áreas de confluencia y/o de queratitis filamentosa) en el área inferior después de la exposición a las condiciones ST y LH (Tabla 15, Figura 18C). El grupo de SOS leve-moderado mostró un aumento significativo de la tinción corneal medida con la escala Baylor modificada en las áreas temporal e inferior tras la exposición a la condición ST, sumando a éstas el área nasal después de la exposición a la condición LH y en todas ellas tras la exposición a la condición LHP (Tabla 15, Figura 18C). Debido a su magnitud, la tabla 15 muestra únicamente los datos de tinción corneal en los que hubo diferencias estadísticamente significativas.

Tinción conjuntival (escala Oxford)

La tinción conjuntival con verde de lisamina (escala Oxford) aumentó significativamente en el grupo control tras la exposición a las condiciones ST y LH, aumento que no fue significativo para la condición LHP en el grupo control, ni para ninguna de las condiciones en el caso del grupo de SOS leve-moderado (Figura 18C, Tabla 15).

Tabla 15. Resultados de los tests clínicos. Estudio II

TEST	Exposición	CONDICIÓN ESTÁNDAR (ST)		CONDICIÓN BAJA HUMEDAD (LH)		CONDICIÓN BAJA HUMEDAD Y BAJA PRESIÓN (LHP)	
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado
SIDEQ Modificado	Pre	2.19 ± 0.72 †††	12.48 ± 2.36	0.63 ± 0.24 †††	10.14 ± 2.14	0.69 ± 0.30 †††	9.61 ± 1.74
	1 hora	2.86 ± 0.90 †††	12.31 ± 2.65	1.28 ± 0.51 †††	10.18 ± 2.07	1.43 ± 0.88 †††	10.47 ± 2.01
	Post	1.93 ± 0.75 †††	11.49 ± 2.30	0.89 ± 0.34 †††	9.11 ± 1.83	2.90 ± 1.11 †††	12.38 ± 2.22
Osmolaridad lagrimal	Pre	316.25 ± 2.95 †	335.65 ± 6.88	307.10 ± 2.63 †	327.35 ± 6.03	309.90 ± 3.30	325.70 ± 6.68
	Post	311.90 ± 3.22	317.30 ± 3.72**	313.85 ± 4.60	322.60 ± 5.15	316.70 ± 3.48	328.20 ± 6.01
Test de Rojo de Fenol (PRTT)	Pre	21.85 ± 1.41	18.55 ± 1.58	21.26 ± 1.72	18.85 ± 1.59	21.37 ± 1.51	20.95 ± 1.53
	Post	22.45 ± 1.46	19.05 ± 1.51	21.45 ± 1.37	17.40 ± 1.60	19.20 ± 1.26	16.75 ± 1.34*
Hiperemia Conjuntival (media)	Pre	1.10 ± 0.12	1.13 ± 0.11	1.25 ± 0.10	1.10 ± 0.09	1.28 ± 0.13	1.10 ± 0.11
	Post	1.35 ± 0.14	1.35 ± 0.12*	1.48 ± 0.10	1.25 ± 0.11	1.58 ± 0.12*	1.43 ± 0.11**
Tear Break-Up Time (T – BUT)	Pre	3.15 ± 0.46	2.23 ± 0.20	2.81 ± 0.24	2.75 ± 0.53	3.53 ± 0.43 †	2.18 ± 0.28
	Post	2.18 ± 0.24	2.30 ± 0.28	2.13 ± 0.19**	1.90 ± 0.24**	2.08 ± 0.26 † ***	1.53 ± 0.20**
Tinción Corneal (Escala Oxford)	Pre	0.70 ± 0.15	0.65 ± 0.15	0.50 ± 0.15	0.65 ± 0.15	0.70 ± 0.15	0.50 ± 0.14
	Post	1.45 ± 0.22**	1.10 ± 0.19*	1.30 ± 0.19***	1.10 ± 0.14**	1.70 ± 0.18***	1.25 ± 0.19**
Tinción Corneal - (escala Baylor modificada)							
Central	Pre	0.05 ± 0.05	0.25 ± 0.14	0.10 ± 0.07	0.10 ± 0.07	0.05 ± 0.05	0.25 ± 0.10
	Post	0.30 ± 0.13*	0.75 ± 0.23	0.40 ± 0.13*	0.40 ± 0.18	0.45 ± 0.13**	0.70 ± 0.18*
Nasal	Pre	0.30 ± 0.13	0.60 ± 0.17	0.55 ± 0.19	0.55 ± 0.11	0.40 ± 0.13	0.60 ± 0.15
	Post	1.10 ± 0.22**	1.05 ± 0.25	1.60 ± 0.28***	1.10 ± 0.22*	1.85 ± 0.22***	1.40 ± 0.23**
Temporal	Pre	0.60 ± 0.20	0.80 ± 0.17	0.50 ± 0.14	0.65 ± 0.15	0.40 ± 0.13	0.35 ± 0.15
	Post	1.05 ± 0.21*	1.20 ± 0.25*	1.30 ± 0.22***	1.25 ± 0.23**	1.55 ± 0.20***	1.65 ± 0.24***
Superior	Pre	0.00 ± 0.00	0.15 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.07	0.05 ± 0.05
	Post	0.05 ± 0.05	0.05 ± 0.05	0.30 ± 0.18	0.15 ± 0.08	0.10 ± 0.10	0.25 ± 0.10*
Inferior	Pre	0.85 ± 0.21	1.10 ± 0.22	0.80 ± 0.25 †	1.25 ± 0.19	1.10 ± 0.23	1.15 ± 0.18
	Post	2.25 ± 0.35***	1.95 ± 0.30**	2.40 ± 0.29***	2.10 ± 0.24***	3.00 ± 0.29***	2.25 ± 0.29**
Tinción Corneal - Severidad (escala Baylor modificada)							
Inferior	Pre	0.15 ± 0.11	0.15 ± 0.11	0.10 ± 0.10	0.10 ± 0.10	0.15 ± 0.11	0.00 ± 0.00
	Post	0.70 ± 0.22*	0.50 ± 0.20	0.40 ± 0.18	0.25 ± 0.14	0.80 ± 0.23**	0.60 ± 0.20**
Tinción Conjuntival (media)	Pre	0.53 ± 0.18	0.58 ± 0.13	0.48 ± 0.14	0.80 ± 0.13	0.63 ± 0.19	0.60 ± 0.13
	Post	0.70 ± 0.17*	0.63 ± 0.14	0.75 ± 0.19*	0.90 ± 0.16	0.80 ± 0.19	0.68 ± 0.12
Test de Schirmer (sin anestesia)	Pre	16.30 ± 2.15 †	11.50 ± 2.22	14.30 ± 2.07 †	10.00 ± 2.01	14.70 ± 2.31	10.80 ± 1.87
	Post	16.30 ± 2.15 †	11.65 ± 2.00	16.25 ± 2.38	11.95 ± 2.34*	14.80 ± 2.01	11.00 ± 1.95

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). Diferencias entre los tests antes y después de la exposición (test de Wilcoxon y test de Friedman para el cuestionario SIDEQ modificado): *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001. Significación estadística entre grupos (Test U de Mann-Whitney): †p ≤ 0,05, †† p ≤ 0,01, ††† p ≤ 0,001. SIDEQ: Single-Item Score Dry Eye Questionnaire; SOS: síndrome de ojo seco

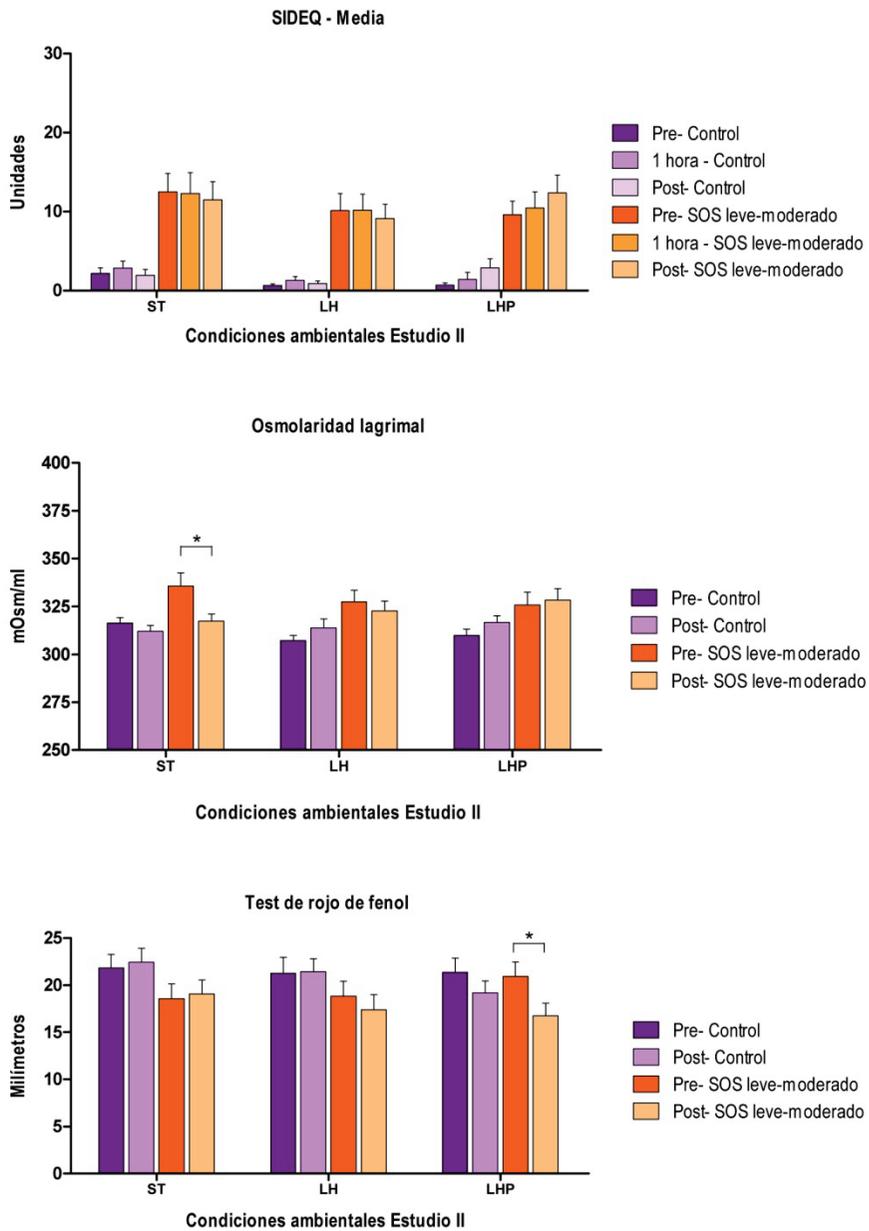


Figura 18A. Resultados de los tests clínicos SIDEQ (media), osmolaridad lagrimal y PRTT. Estudio II. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

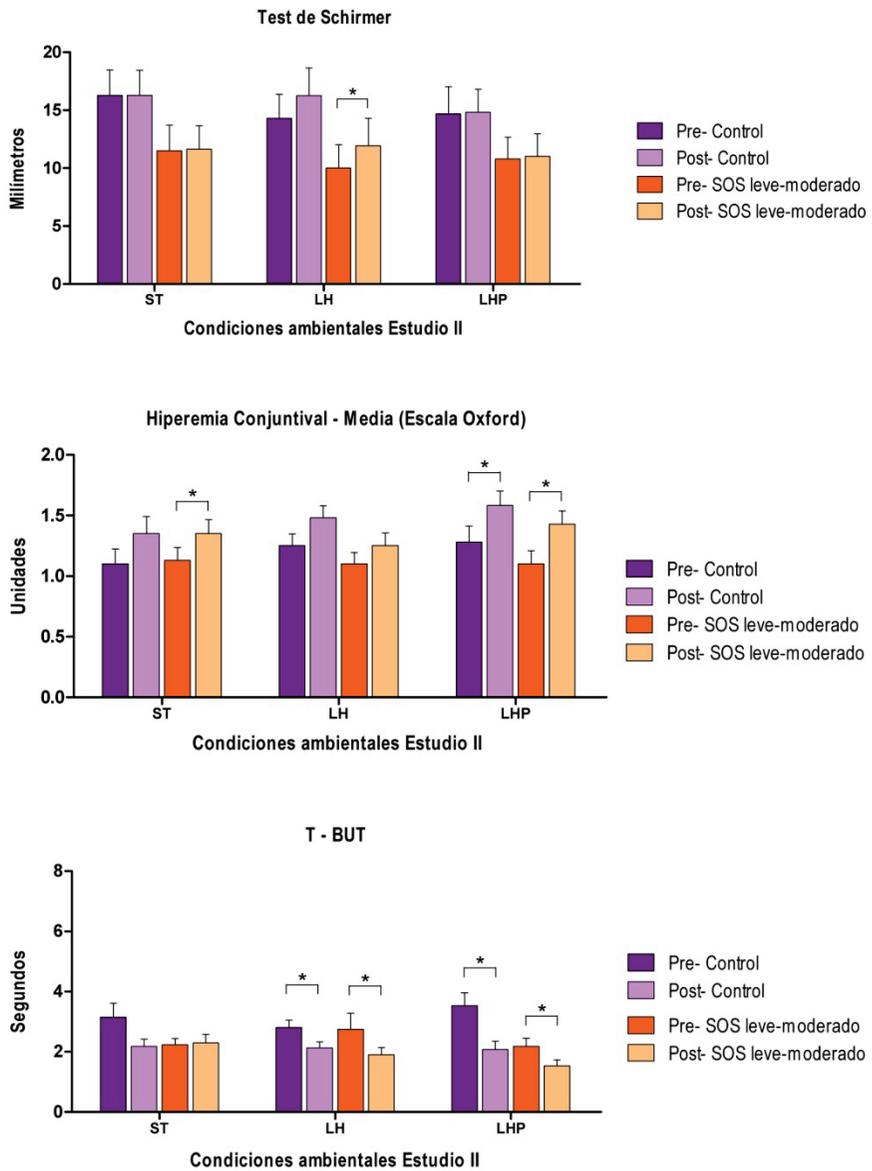


Figura 18B. Resultados de los tests clínicos: test de Schirmer, hiperemia conjuntival media (escala Oxford) y T-BUT. Estudio II. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

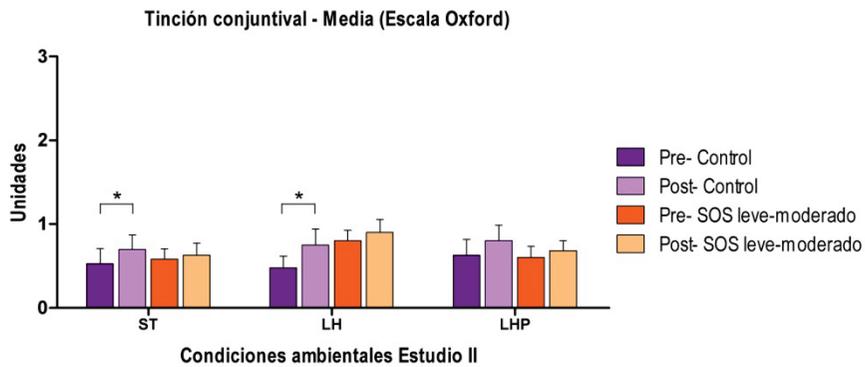
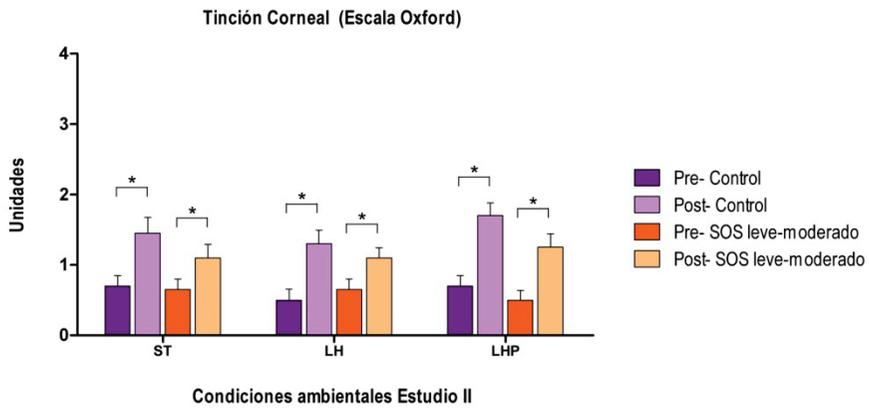


Figura 18C. Resultados de los tests clínicos: tinción corneal y conjuntival media (escala Oxford). Estudio II. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

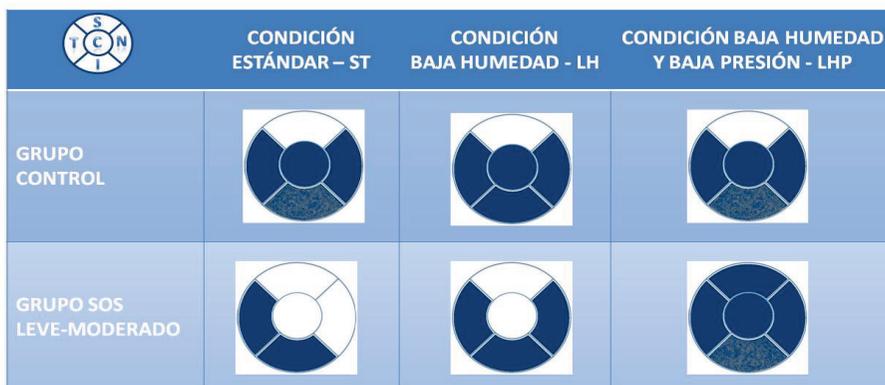


Figura 19. Esquema de las áreas de tinción corneal con la escala de Baylor modificada que han presentado diferencias entre la valoración pre- y post- exposición para cada uno de los grupos del estudio II. El color azul representa un incremento significativo de la intensidad de tinción para esa área determinada (incremento del número de puntos de tinción). La mezcla de color azul con color gris representa un área que ha aumentado significativamente tanto la tinción (número de puntos de tinción) como la severidad del daño encontrado en esa zona (áreas de confluencia de puntos y/o presencia de queratitis filamentosa). SOS: síndrome de ojo seco.

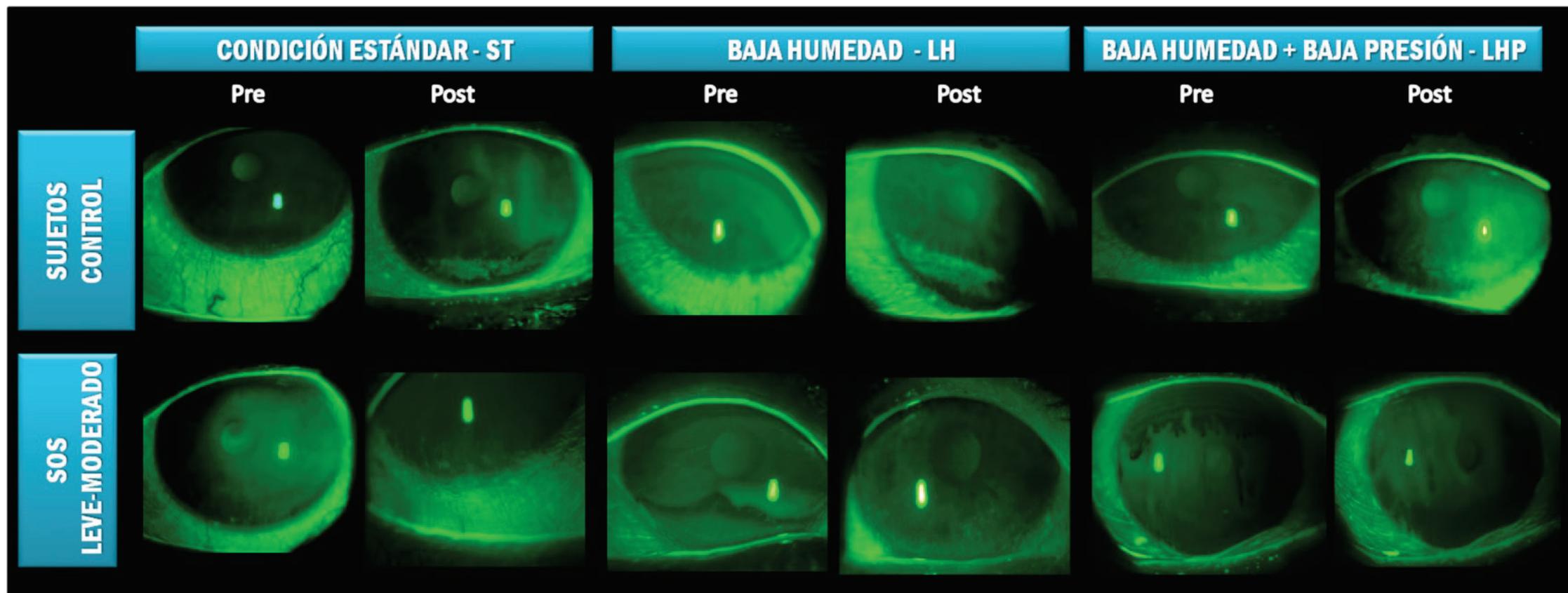


Figura 20. Imágenes de tinción corneal de los sujetos del estudio II.

ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS EN LA LÁGRIMA

Entre las 16 moléculas analizadas en lágrima, EGF, IL-1Ra, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES y MMP-9 tuvieron una tasa de detección en las muestras recogidas por encima del 80% para todos los grupos en todas las condiciones. CX3CL1/fractalquina, IL-6 y VEGF tuvieron una tasa superior al 50%. Por el contrario, IL-1 β e IL-2 tuvieron una tasa de detección por debajo del 30% en algunos grupos y condiciones, y los valores de detección de IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-17 y TNF- α estaban por debajo del 30% para todos los grupos de estudio y en todas las condiciones de exposición, por lo tanto, sus valores y los de IL-1 β e IL-2 no han sido considerados para el análisis estadístico por no ser lo suficientemente relevantes (Tabla 16).

Después de la exposición a la condición ST, en el grupo control los niveles de EGF disminuyeron mientras que los niveles de MMP-9 aumentaron significativamente (Tabla 17, Figura 21A y 21C respectivamente). El grupo de SOS leve-moderado mostró un aumento significativo en las moléculas IL-1Ra, CXCL8/IL-8 y MMP-9 bajo esta condición (Tabla 17, Figura 21A, 21B y 21C).

Después de la exposición a la condición LH, los niveles de EGF en el grupo control sufrieron un descenso significativo (Tabla 17, Figura 21A) mientras que los niveles de IL-6 y MMP-9 se incrementaron significativamente (Tabla 17, Figura 21B y 21C respectivamente). Por el contrario, el grupo de SOS leve-moderado mostró únicamente un incremento significativo en los niveles de MMP-9 bajo esta condición (Tabla 17, Figura 21C). Además, se han detectado diferencias significativas en los niveles basales previos de CCL5/RANTES entre ambos grupos ($p=0,03$), siendo ligeramente más elevados los presentados por los pacientes con SOS leve-moderado (Figura 21C).

Tras la exposición a la condición LHP, EGF mostró también un descenso significativo, en este caso para ambos grupos, control y SOS leve-moderado (Tabla 17, Figura 21A). Los niveles de IL-6 se incrementaron significativamente en ambos grupos de estudio (Tabla 17, Figura 21B). El grupo control mostró además un incremento en los niveles de CCL5/RANTES tras la exposición a la condición LHP y los niveles basales iniciales de esta citoquina fueron significativamente diferentes entre ambos grupos ($p=0,02$) (Figura 21B), mientras que MMP-9 mostró un aumento en ambos grupos, siendo únicamente significativo para el grupo de SOS leve-moderado. No se detectaron cambios significativos en los niveles de lágrima del resto de moléculas analizadas (Tabla 17).

Tabla 16. Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima. Estudio II

Moléculas	Tiempo	CONDICIÓN ESTÁNDAR (ST)		CONDICIÓN BAJA HUMEDAD (LH)		CONDICIÓN BAJA HUMEDAD y BAJA PRESIÓN (LHP)	
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado
EGF	Pre	100%	> 80%	> 80%	> 80%	100%	> 80%
	Post	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	100%	> 80%
CX3CL1/FRACTALKINA	Pre	> 80%	> 80%	> 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%
	Post	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
IL-1 β	Pre	< 30%	30 – 50%	< 30%	30 – 50%	< 30%	30 – 50%
	Post	30 – 50%	30 – 50%	< 30%	< 30%	< 30%	30 – 50%
IL-1Ra	Pre	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Post	> 80%	100%	100%	100%	100%	> 80%
IL-2	Pre	< 30%	< 30%	< 30%	< 30%	< 30%	50 – 80%
	Post	< 30%	< 30%	< 30%	30 – 50%	50 – 80%	50 – 80%
IL-6	Pre	50 – 80%	> 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%	> 80%
	Post	> 80%	100%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
CXCL8/IL-8	Pre	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	> 80%	100%	100%
CXCL10/IP-10	Pre	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
	Post	> 80%	> 80%	100%	> 80%	> 80%	> 80%
CCL5/RANTES	Pre	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
	Post	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
VEGF	Pre	50 – 80%	> 80%	> 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%
	Post	50 – 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
MMP-9	Pre	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima que alcanzaron más del 30% de detección, tanto antes como después de la exposición a las diferentes condiciones ambientales. SOS: síndrome de ojo seco. SOS: síndrome de ojo seco; IL-: interleuquina; IFN- γ : interferón gamma; TNF- α : factor de necrosis tumoral; CCL5/RANTES: factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; MMP-9: metaloproteína 9.

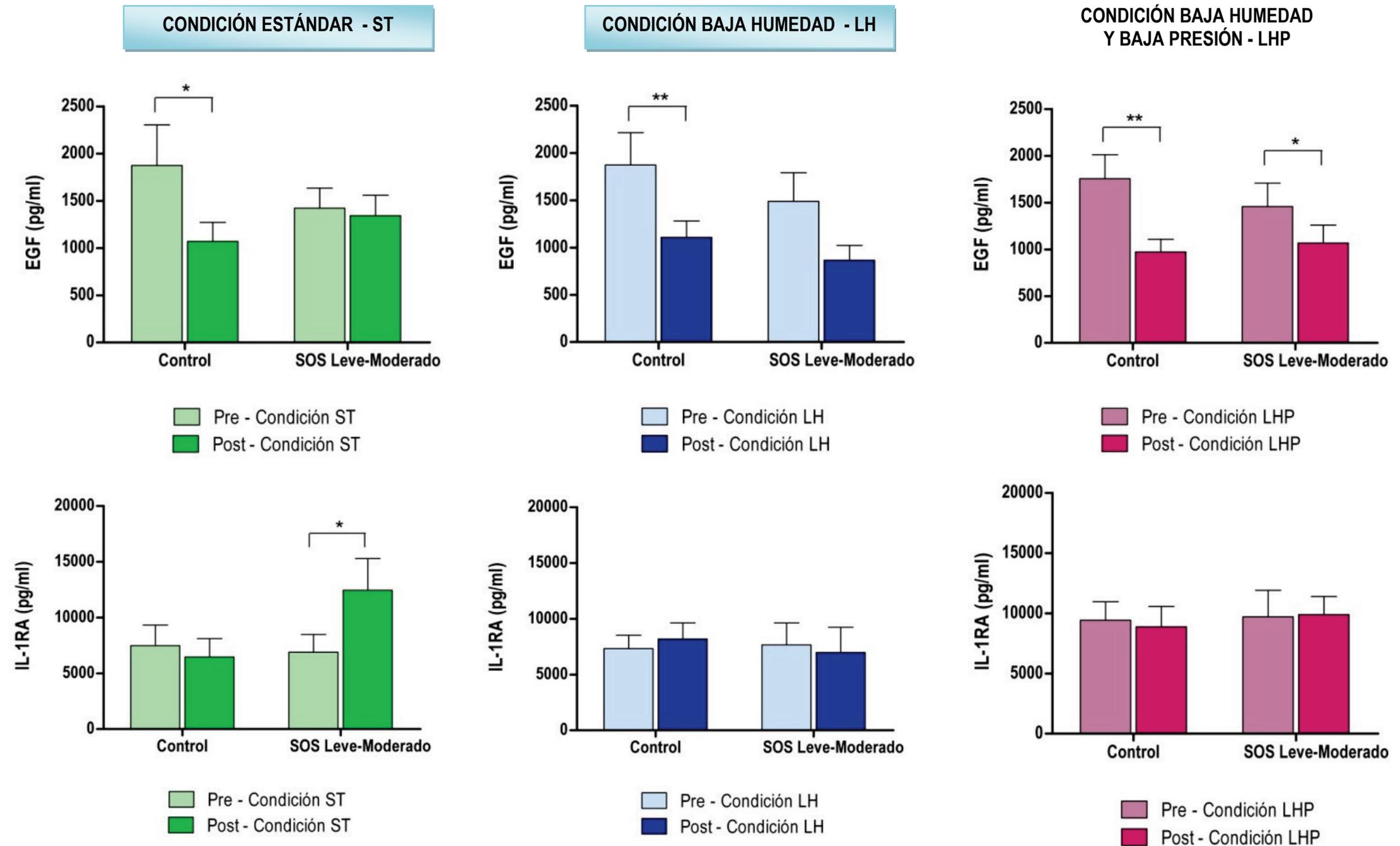


Figura 21A. Variación de los niveles de EGF y IL-1RA en la lágrima antes (barras claras) y tras dos horas (barras oscuras) de exposición en la cámara de ambiente controlado durante el estudio II. Verde: Condición estándar (ST); Azul: Condición de baja humedad (LH); Rojo: Condición de baja humedad y baja presión (LHP). SOS: síndrome de ojo seco.

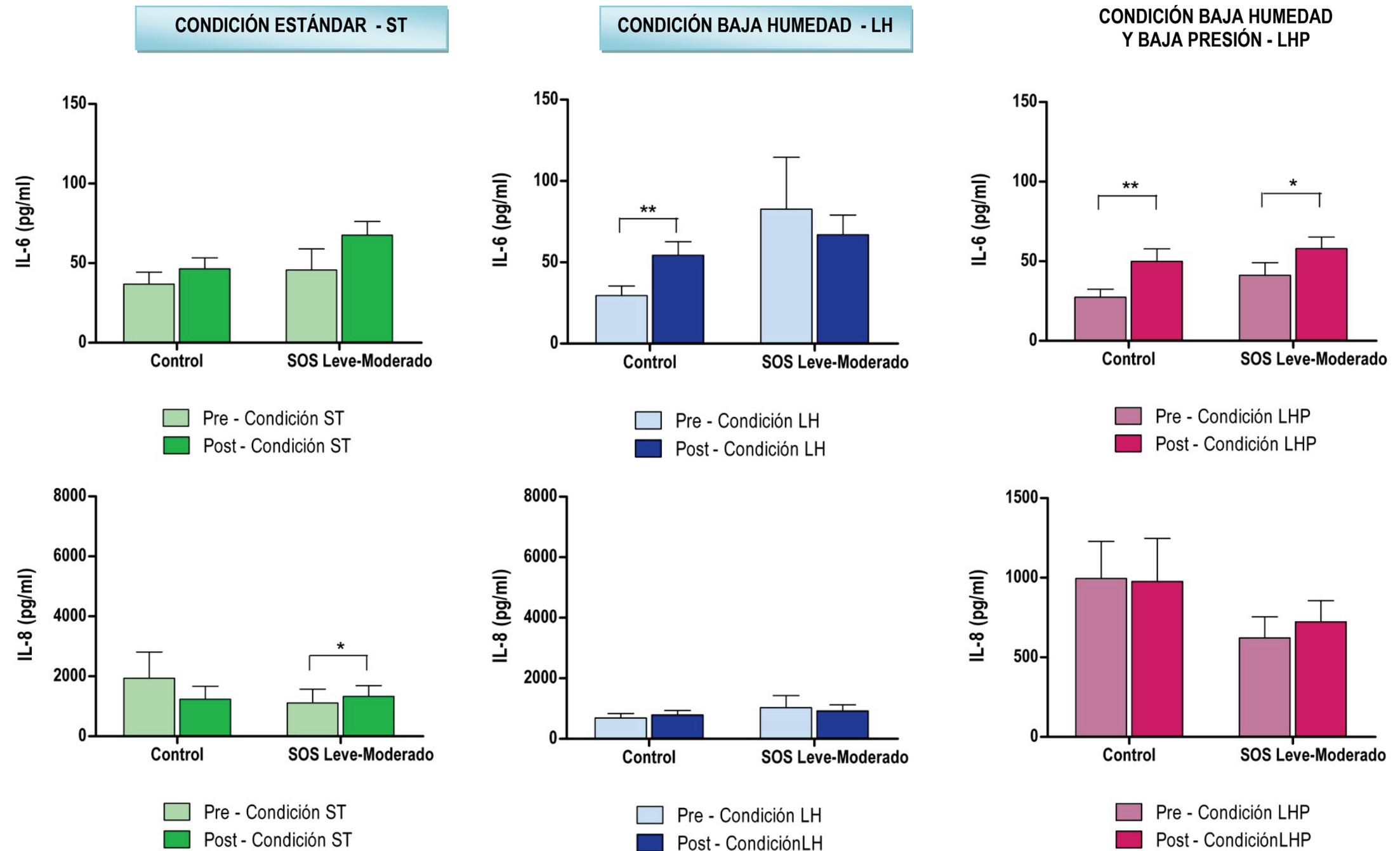


Figura 21B. Variación de los niveles de IL-6 e IL-8 en la lágrima antes (barras claras) y tras dos horas (barras oscuras) de exposición en la cámara de ambiente controlado durante el estudio II. Verde: Condición estándar (ST); Azul: Condición de baja humedad (LH); Rojo: Condición de baja humedad y baja presión (LHP). SOS: síndrome de ojo seco.

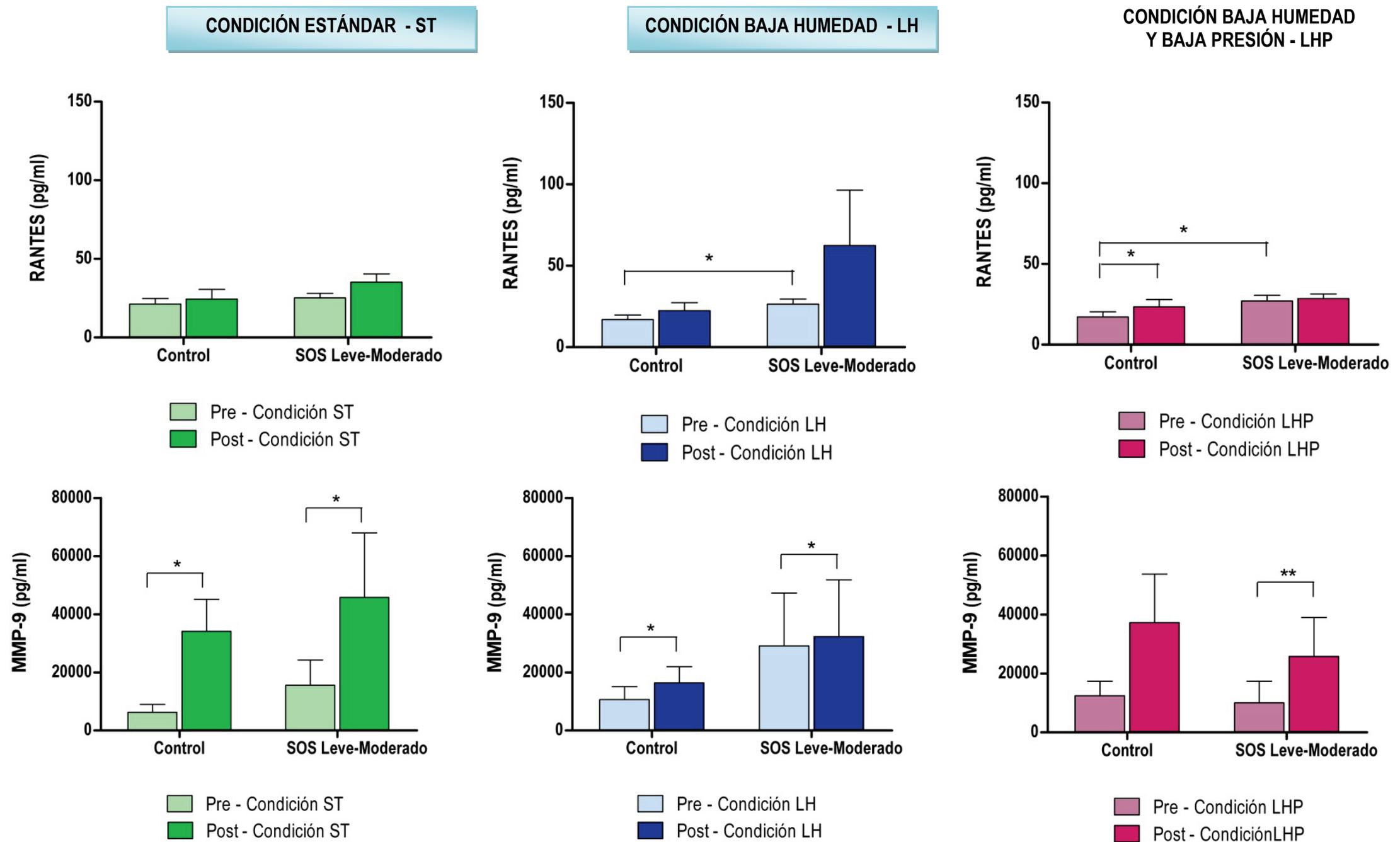


Figura 21C. Variación de los niveles de RANTES y MMP-9 en la lágrima antes (barras claras) y tras dos horas (barras oscuras) de exposición en la cámara de ambiente controlado durante el estudio II. Verde: Condición estándar (ST); Azul: Condición de baja humedad (LH); Rojo: Condición de baja humedad y baja presión (LHP). SOS: síndrome de ojo seco.

Tabla 17. Niveles de las moléculas detectadas en la lágrima en un porcentaje mayor al 30%. Estudio II

Moléculas	Tiempo	CONDICIÓN ESTÁNDAR – ST		CONDICIÓN BAJA HUMEDAD – LH		CONDICIÓN BAJA HUMEDAD Y BAJA PRESIÓN - LHP	
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado
EGF	Pre	1874,95 ± 427,57	1422,45 ± 211,08	1872,10 ± 340,69	1489,25 ± 302,20	1754,5 ± 256,1	1457,2 ± 249,6
	Post	1070,77 ± 201,10*	1341,78 ± 217,71	1107,05 ± 173,64**	865,81 ± 155,40	972,0 ± 136,1**	1068,7 ± 190,4*
CX3CL1/FRACTALQUINA	Pre	1014,50 ± 225,71	1175,11 ± 215,94	855,05 ± 163,10	1277,20 ± 264,12	1010,9 ± 256,6	1158,9 ± 148,6
	Post	926,80 ± 177,52	1544,75 ± 305,80	970,61 ± 196,62	1052,86 ± 284,37	1111,4 ± 252,8	1079,2 ± 172,9
IL-1β	Pre	8,46 ± 2,17	13,16 ± 4,49	7,19 ± 1,60	17,89 ± 7,90	7,8 ± 2,2	26,4 ± 10,8
	Post	7,03 ± 1,15	11,97 ± 3,05	6,70 ± 1,73	8,94 ± 2,02	7,2 ± 1,6	15,9 ± 4,2
IL-1Ra	Pre	7477,85 ± 1848,28	6889,80 ± 1590,69	7321,85 ± 1197,09	7654,90 ± 1970,34	10091,4 ± 2147,3	9039,3 ± 1595,1
	Post	6457,35 ± 1646,90	12446,30 ± 2832,76*	8196,20 ± 1437,06	6981,14 ± 2255,64	8617,5 ± 1595,3	10156,6 ± 1593,7
IL-2	Pre	ND	5,30 ± 1,22	5,58 ± 1,22	5,77 ± 1,33	4,5 ± 0,8	7,6 ± 1,6
	Post	ND	6,40 ± 1,42	7,26 ± 2,37	7,19 ± 1,56	7,5 ± 2,0	7,4 ± 1,9
IL-6	Pre	36,77 ± 7,59	45,64 ± 13,35	29,60 ± 5,80	82,66 ± 31,89	27,5 ± 5,0	41,2 ± 7,8
	Post	46,48 ± 6,81	67,51 ± 8,64	54,32 ± 8,33**	66,95 ± 12,06	50,0 ± 7,8**	58,0 ± 7,2*
CXCL8/IL-8	Pre	1938,16 ± 869,76	1111,85 ± 458,63	690,76 ± 146,69	1027,42 ± 403,44	866,0 ± 198,8	621,8 ± 129,0
	Post	1236,11 ± 434,30	1330,00 ± 359,09*	789,35 ± 145,03	922,25 ± 201,77	976,3 ± 264,1	760,6 ± 130,0
IL-10	Pre	ND	ND	ND	ND	4,84 ± 1,01	5,28 ± 1,75
	Post	ND	ND	ND	ND	5,97 ± 1,45	6,63 ± 1,42
CXCL10/IP-10	Pre	48600,60 ± 9055,48	68410,60 ± 17595,35	40985,70 ± 6603,24	67779,10 ± 19776,76	41126,9 ± 5534,1	49725,3 ± 6413,2
	Post	44373,20 ± 10077,38	62533,60 ± 15478,04	46328,00 ± 4989,62	59398,70 ± 15682,75	40316,4 ± 5764,0	48241,0 ± 6386,3
CCL5/RANTES	Pre	21,30 ± 3,51	25,16 ± 2,85	16,93 ± 2,71	26,41 ± 3,15	17,2 ± 3,1	27,0 ± 3,6
	Post	24,42 ± 6,09	35,25 ± 5,17	22,45 ± 4,82	62,39 ± 34,00	23,5 ± 4,4*	28,6 ± 2,9
VEGF	Pre	748,95 ± 168,93	487,24 ± 117,75	651,00 ± 153,62	620,89 ± 155,35	649,7 ± 134,7	465,9 ± 103,0
	Post	620,10 ± 126,43	591,10 ± 142,61	649,35 ± 96,77	599,70 ± 123,23	635,0 ± 120,2	470,2 ± 95,5
MMP-9	Pre	6263,74 ± 2636,24	15536,22 ± 8704,55	10620,51 ± 4494,34	29089,07 ± 17761,89	12447,5 ± 4944,6	10054,4 ± 6754,8
	Post	34131,80 ± 10968,48*	45758,20 ± 22214,81*	16398,75 ± 5538,30*	32270,26 ± 19066,24*	37244,8 ± 16442,5	25744,5 ± 12181,2**

Comparación mediante el test de Wilcoxon de los niveles de las moléculas analizadas en la lágrima antes (pre) y después (post) de la exposición a las diferentes condiciones ambientales para cada uno de los grupos de estudio: *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01. ND = No detectado. SOS: síndrome de ojo seco; IL-: interleuquina; IFN-γ: interferón gamma; TNF-α: factor de necrosis tumoral; CCL5/RANTES: factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; MMP-9: metaloproteína 9.

ESTUDIO I y II

Análisis comparativo

ESTUDIO I y II. Análisis comparativo

RESULTADOS

Con el fin de poder establecer comparaciones entre el estudio I y II, se realizó un análisis comparativo entre las condiciones ambientales más extremas desarrolladas en la cámara de ambiente controlado CERLab. Por ese motivo, se realiza la comparativa entre la condición ambiental menos adversa a la que se han sometido a los sujetos, correspondiente a la condición ST del primer estudio (sin flujo de aire) y la condición ambiental más adversa creada, correspondiente a la condición LHP del segundo estudio (con flujo de aire). Se comparan los grupos control y SOS leve-moderado por ser ambos los que se han sometido a ambas condiciones ambientales y por ser los grupos comunes participantes en ambos estudios a pesar de ser grupos formados por diferentes sujetos, lo cuál se ha tenido en cuenta en la realización del análisis estadístico.

VISITA DE INCLUSIÓN (V0)

Para la comparativa entre el estudio I y II se seleccionaron los datos de los 19 sujetos control (9 hombres, 10 mujeres, $60,6 \pm 1,7$ años) y los datos de los 15 pacientes con SOS leve-moderado (5 hombres, 10 mujeres, $60,3 \pm 2,1$ años) de la condición ST del estudio I y fueron pareados y comparados con los datos de los 20 sujetos control (6 hombres, 14 mujeres, $59,3 \pm 1,9$ años) y los 20 pacientes con SOS leve-moderado (6 hombres, 14 mujeres, $64,7 \pm 1,8$ años)

de la condición LHP del estudio II (a partir de ahora llamada condición adversa para facilitar la lectura de la comparativa entre ambos estudios) (Tabla 18). Ambos grupos estaban pareados por edad, Para ambas condiciones, las puntuaciones en el test de OSDI® del grupo con SOS leve-moderado fueron significativamente mayores que para los sujetos control (Tabla 19), no existiendo diferencias significativas entre los dos grupos en el resto de medidas. Ningún sujeto sufrió ningún efecto adverso.

Tabla 18. Distribución en edad y sexo de los participantes del análisis comparativo entre el los estudios I y II.

	<i>ESTUDIO I</i>	<i>ESTUDIO II</i>	<i>TOTAL</i>
	<u>CONDICIÓN ESTÁNDAR</u>	<u>CONDICIÓN ADVERSA</u>	
	N (Varones/Mujeres) Edad: M ± SEM	N (Varones/Mujeres) Edad: M ± SEM	N (Varones/Mujeres) Edad: M ± SEM
Grupo Control	19 (9/10) 60,6 ± 1,7	20 (6/14) 59,3 ± 1,9	39 (15/24) 60,0 ± 1,3
Grupo SOS Leve-Moderado	15 (5/10) 60,3 ± 2,1	20 (6/14) 64,7 ± 1,8	35 (11/24) 62,8 ± 1,4
Total	34 (14/20) 60,5 ± 1,3	40 (12/28) 62,0 ± 1,4	74 (26/48) 61,3 ± 1,0

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). n: número de participantes; SOS: síndrome de ojo seco.

Tabla 19. Resultados de la visita de inclusión (VO) de los participantes del análisis comparativo entre los estudios I y II.

	<i>ESTUDIO I</i>		<i>ESTUDIO II</i>	
	<u>CONDICIÓN ESTÁNDAR</u>	<u>CONDICIÓN ADVERSA</u>	<u>CONDICIÓN ESTÁNDAR</u>	<u>CONDICIÓN ADVERSA</u>
	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado
Índice OSDI®	2,26 ± 0,90*	40,6 ± 5,97*	3,27 ± 0,85*	35,73 ± 2,79*
PRTT	20,84 ± 1,74	24,13 ± 1,60	23,44 ± 1,29	21,40 ± 1,29
T-BUT	5,39 ± 0,98	4,62 ± 0,86	4,22 ± 0,64	3,82 ± 0,57
Tinción Corneal	0,37 ± 0,11	0,33 ± 0,13	0,50 ± 0,11	0,75 ± 0,16
Tinción Conjuntival	0,51 ± 0,10	0,63 ± 0,18	0,45 ± 0,16	0,25 ± 0,09
Test de Schirmer	14,97 ± 2,15	14,50 ± 1,94	11,30 ± 1,28	12,70 ± 1,85

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). *Diferencias entre grupos de la misma condición (test de Wilcoxon, $p \leq 0,001$). SOS: síndrome de ojo seco; OSDI®: Ocular Surface Disease Index / Índice de enfermedad de la superficie ocular; PRTT: test de rojo de fenol; T-BUT: tiempo de ruptura lagrimal; tinción corneal y conjuntival (escala Oxford); test de Schirmer (sin anestesia tópica).

TEST CLÍNICOS

Los resultados de los test clínicos comparativos entre la condición estándar (ST) del estudio I y la condición adversa (LHP) del estudio II se encuentran en la Tabla 20. A continuación, se resumen los hallazgos significativos en los tests clínicos entre el examen pre- y el post-exposición a cada una de las condiciones ambientales (ST, LH, LHP) y para cada uno de los grupos.

Sintomatología

Las puntuaciones obtenidas en el cuestionario SIDEQ modificado para el grupo SOS leve-moderado fueron significativamente mayores que las del grupo control después de la primera hora y tras dos horas de exposición a las condiciones ST (Figura 22A, Tabla 20). Bajo la condición adversa, las puntuaciones del grupo SOS leve-moderado fueron significativamente mayores a las del grupo control tanto antes, como a la hora y a la finalización (2 horas) de la exposición a esta condición ambiental (Figura 22A, Tabla 20). En ninguna de las dos condiciones ambientales analizadas se encontraron cambios significativos tras la exposición en la sintomatología.

Osmolaridad

La exposición a la condición ST del estudio I no indujo cambios significativos en la osmolaridad lagrimal, en ninguno de los grupos de estudio, al igual que la exposición a la condición adversa del estudio II (LHP), que tampoco provocó cambios significativos en este test; sin embargo, se puede observar una tendencia a la disminución después de la exposición a la condición ST y al aumento después de la condición LHP en todos los grupos de estudio. (Figura 22A, Tabla 20).

PRTT y Test de Schirmer

Observamos una disminución en el valor del PRTT en ambos grupos de estudio después de dos horas bajo la condición adversa del estudio II (LHP), sin embargo, esta reducción fue significativa únicamente para el grupo de SOS leve-moderado. Esta tendencia no se encontró bajo la condición ST del estudio I; (Figura 22A, Tabla 20). Ninguna de las dos condiciones seleccionadas para el análisis comparativo indujo cambios significativos en el test de Schirmer en ninguno de los grupos de estudio (Figura 22B, Tabla 20).

Hiperemia conjuntival (escala Efron)

La hiperemia conjuntival aumentó significativamente tanto para el grupo control y el grupo de SOS leve-moderado después de la exposición a la condición ST del estudio I, como para sus grupos pareados tras la exposición a la condición LHP del estudio II (Figura 22B, Tabla 20).

T-BUT

Los valores de T-BUT se redujeron significativamente en ambos grupos de estudio después de dos horas bajo la condición adversa (LHP) del estudio II y no bajo la condición ST del estudio I. Asimismo, el valor del T-BUT de los pacientes con SOS leve-moderado fue significativamente menor que el de los sujetos control tanto antes como después de la exposición a la condición adversa (Figura 22B, Tabla 20).

Tinción corneal (escala Oxford y escala de Baylor)

La tinción corneal (escala Oxford) mostró un aumento en ambos grupos de estudio bajo ambas condiciones. Este incremento de la tinción corneal fue significativo en ambos grupos bajo la condición adversa (LHP) del estudio II,

pero únicamente para el grupo control después de la exposición a la condición ST del estudio I (Figura 22C, Tabla 20).

Del mismo modo, utilizando la escala de valoración de Baylor modificada, en general observamos un incremento en todos los grupos de estudio en el número de puntos de tinción corneal en las cinco áreas corneales evaluadas, tanto bajo la condición ST del estudio I como bajo la condición adversa (LHP) del estudio II; sin embargo, este incremento sólo alcanza la significación estadística en dos de las cinco áreas para ambos grupos bajo la condición ST (nasal/inferior para el grupo control y central/inferior para el grupo SOS leve-moderado) (Figura 23, Tabla 20), mientras que bajo la condición adversa, encontramos un aumento significativo en cuatro de las cinco áreas de evaluación (excepto superior) en el grupo control y en todas las áreas de evaluación en los pacientes con SOS leve-moderado así como un incremento en la severidad de la tinción del área inferior en ambos grupos expuestos a esta condición ambiental (Figura 23, Tabla 20). Adicionalmente observamos que los pacientes con SOS leve-moderado mostraron un aumento mayor de la tinción corneal independientemente del método de evaluación, Oxford o escala Baylor modificada, utilizado. Debido a su magnitud, la tabla 20 muestra únicamente los datos de tinción corneal en los que hubo diferencias estadísticamente significativas.

Tinción conjuntival (escala Oxford)

La exposición a ambas condiciones de la comparativa entre estudios (ST y LHP) no indujo cambios significativos en la tinción conjuntival para ninguno de los grupos de estudio (Figura 22C, Tabla 20).

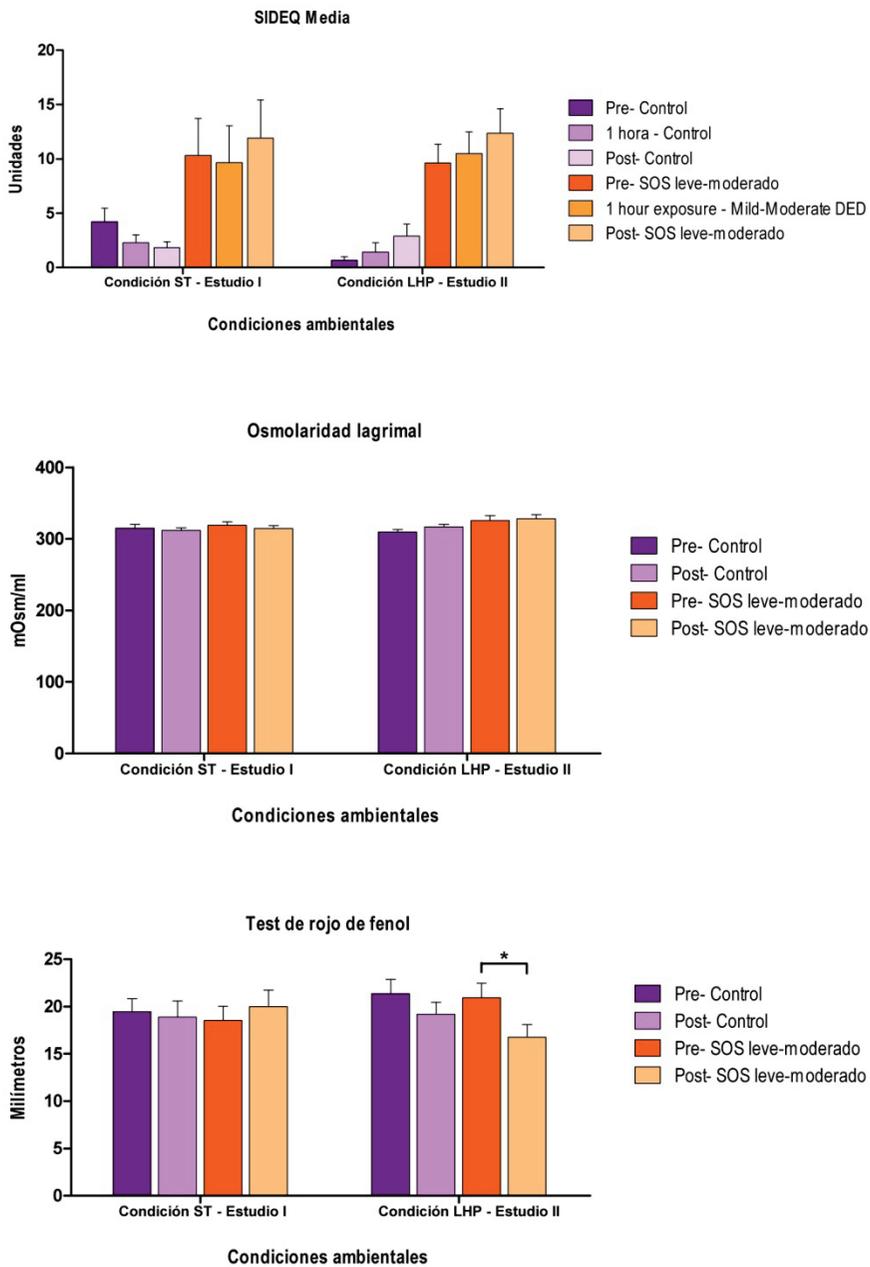


Figura 22A. Resultados de los tests clínicos: SIDEQ (media), osmolaridad lagrimal y PRTT. Análisis comparativo entre los estudios I y II. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

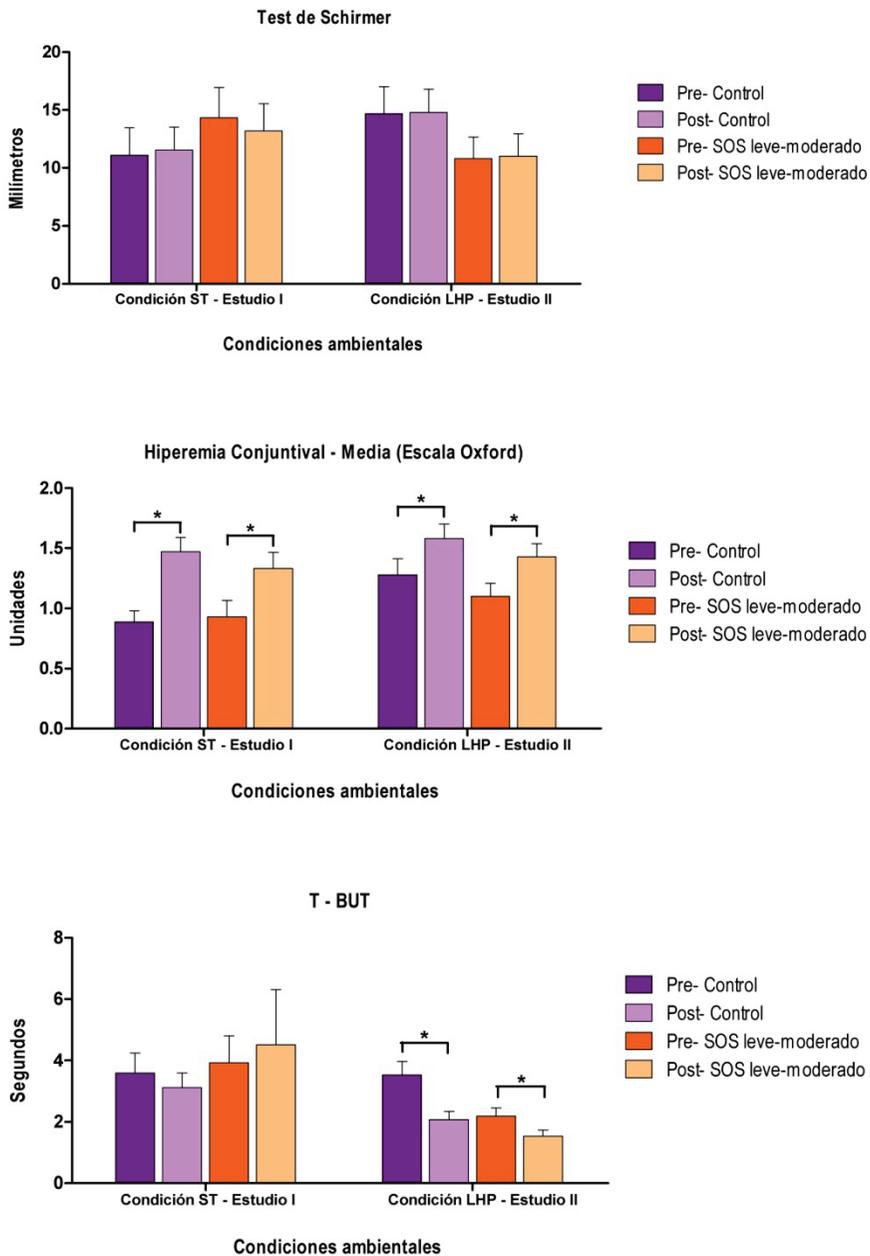


Figura 22B. Resultados de los tests clínicos: test de Schirmer, hiperemia conjuntival media (escala Oxford) y T-BUT. Análisis comparativo entre los estudios I y II. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LH: condición de baja humedad; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

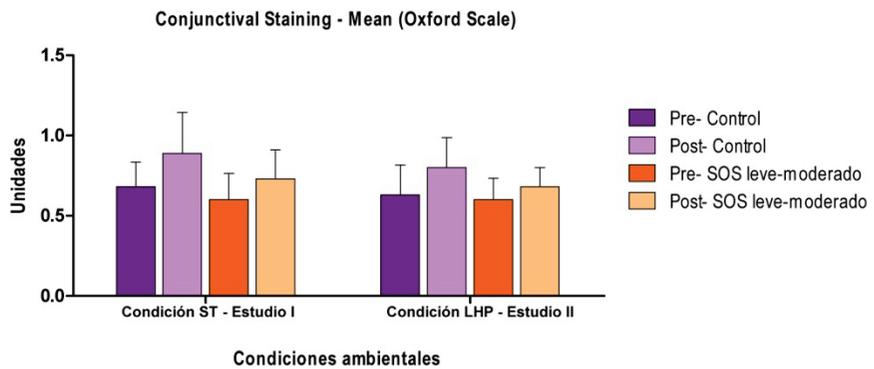
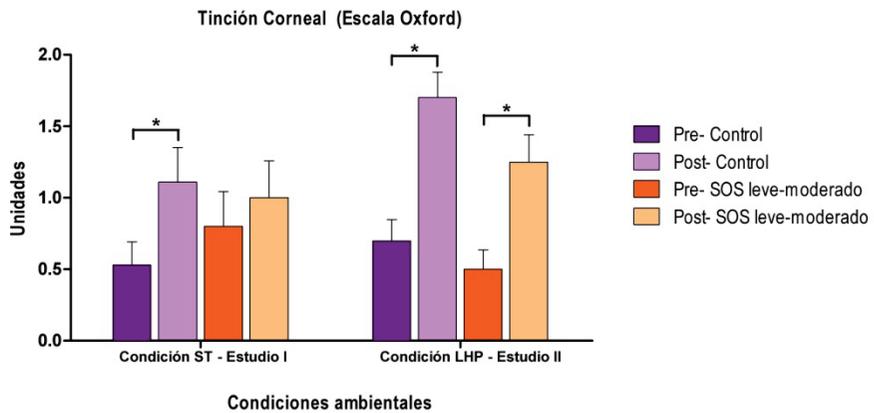


Figura 22C. Resultados de los tests clínicos: tinción corneal y conjuntival media (escala Oxford). Análisis comparativo entre los estudios I y II. SOS: síndrome de ojo seco; ST: condición estándar; LHP: condición de baja humedad y baja presión.

Tabla 20. Resultados de los tests clínicos del análisis comparativo entre los estudios I y II.

TEST	Exposición	ESTUDIO I CONDICIÓN ESTÁNDAR – ST		ESTUDIO II CONDICIÓN ADVERSA - LHP	
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado
SIDEQ Modificado	Pre	4,22 ± 1,24	10,32 ± 3,40	0,69 ± 0,30	9,61 ± 1,69 †
	1 hora	2,29 ± 0,72	9,65 ± 3,39 †	1,43 ± 0,88	10,47 ± 2,01 ††
	Post	1,83 ± 0,54	11,95 ± 3,47 ††	2,90 ± 1,11	12,38 ± 2,16 †††
Osmolaridad lagrimal	Pre	315,13 ± 4,60	319,13 ± 4,75	309,90 ± 3,30	325,70 ± 6,68
	Post	312,31 ± 2,94	314,53 ± 4,00	316,70 ± 3,48	328,20 ± 6,01
Test de Rojo de Fenol (PRTT)	Pre	19,47 ± 1,37	18,53 ± 1,51	21,37 ± 1,47	20,95 ± 1,53
	Post	18,89 ± 1,73	20,00 ± 1,75	19,20 ± 1,26	16,75 ± 1,34**
Hiperemia Conjuntival (media)	Pre	0,89 ± 0,09	0,93 ± 0,14	1,28 ± 0,13	1,10 ± 0,11
	Post	1,47 ± 0,12***	1,33 ± 0,13**	1,58 ± 0,12*	1,43 ± 0,11**
Tear Break-up Time (T-BUT)	Pre	3,60 ± 0,65	3,93 ± 0,87	3,53 ± 0,43	2,18 ± 0,28 †
	Post	3,12 ± 0,48	4,51 ± 1,81	2,08 ± 0,26**	1,53 ± 0,20 †† **
Tinción Corneal (escala Oxford)	Pre	0,53 ± 0,16	0,80 ± 0,24	0,70 ± 0,15	0,50 ± 0,14
	Post	1,11 ± 0,24**	1,00 ± 0,26	1,70 ± 0,18**	1,25 ± 0,19**
Tinción Corneal (escala Baylor modificada)					
Central	Pre	0,21 ± 0,12	0,20 ± 0,14	0,05 ± 0,05	0,25 ± 0,10
	Post	0,26 ± 0,17	0,67 ± 0,23*	0,45 ± 0,13**	0,70 ± 0,18*
Nasal	Pre	0,63 ± 0,25	1,00 ± 0,31	0,40 ± 0,13	0,60 ± 0,15
	Post	1,16 ± 0,25*	1,40 ± 0,32	1,85 ± 0,22***	1,40 ± 0,23**
Temporal	Pre	0,89 ± 0,20	0,73 ± 0,30	0,40 ± 0,13	0,35 ± 0,15
	Post	1,21 ± 0,26	1,00 ± 0,32	1,55 ± 0,20***	1,65 ± 0,24***
Superior	Pre	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07	0,10 ± 0,07	0,05 ± 0,05
	Post	0,21 ± 0,21	0,27 ± 0,27	0,10 ± 0,10	0,25 ± 0,10*
Inferior	Pre	1,21 ± 0,28	1,27 ± 0,33	1,1 ± 0,23	1,15 ± 0,18
	Post	2,05 ± 0,33*	2,00 ± 0,43*	3,00 ± 0,29**	2,25 ± 0,29**
Tinción Corneal – Severidad (escala Baylor modificada)					
Inferior	Pre	0,05 ± 0,05	0,13 ± 0,13	0,15 ± 0,11	0,00 ± 0,00
	Post	0,21 ± 0,14	0,33 ± 0,19	0,80 ± 0,23**	0,60 ± 0,20**
Tinción Conjuntival (media)	Pre	0,68 ± 0,15	0,60 ± 0,16	0,63 ± 0,19	0,60 ± 0,13
	Post	0,89 ± 0,25	0,73 ± 0,18	0,80 ± 0,19	0,68 ± 0,12
Test de Schirmer (sin anestesia)	Pre	11,11 ± 2,37	14,33 ± 2,61	14,70 ± 2,31	10,80 ± 1,87
	Post	11,53 ± 2,00	13,20 ± 2,36	14,80 ± 2,01	11,00 ± 1,95

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). Comparación con test de Wilcoxon antes (pre) y después (post) de la exposición a cada condición ambiental: *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001. Comparación con test U de Mann-Whitney U entre grupos control y grupos de SOS leve-moderado después de la exposición a cada condición ambiental: †p ≤ 0,05, ††p ≤ 0,01, †††p ≤ 0,001. SOS: síndrome de ojo seco; SIDEQ: single item score dry eye questionnaire / Cuestionario de valoración de ojo seco.



Figura 23. Esquema de las áreas de tinción corneal con escala de Baylor modificada que han presentado diferencias entre la evaluación (pre-) y la exposición (post-) a cada una de las condiciones y para cada uno de los grupos de los estudios I (izquierda) y II (derecha). El color azul representa un incremento significativo en esa área de la tinción corneal (incremento del número de puntos de tinción). La mezcla de color azul con color gris representa un área que ha aumentado significativamente, tanto en la tinción (número de puntos de tinción), como en la severidad del daño encontrado en esa zona (áreas de confluencia de puntos y/o presencia de queratitis filamentosa). SOS: síndrome de ojo seco.

ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS EN LA LÁGRIMA

Entre las 16 moléculas analizadas en la lágrima, EGF, CX3CL1/Fractalquina, IL-1RA, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 y MMP-9 fueron detectadas entre un 80 y 100% de las muestras de ambos grupos, tanto antes como después de someterse a cualquiera de los dos condiciones ambientales. IL-6, CCL5/RANTES y VEGF se detectaron con un máximo de entre un 50-80% en ambos grupos (Tabla 21). Los valores de detección de IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-12p70, IL-17 y TNF- α se encontraban por debajo de 30% en ambos grupos y para ambas condiciones de exposición, por lo que no se consideran estadísticamente representativas, excepto para IL-2 en la condición LHP en la que se detectó por encima del 30% en los tres grupos de estudio (Tabla 21).

Los niveles en lágrima de EGF, IL-6, CCL5/RANTES y MMP-9 variaron significativamente después de la exposición a la condición adversa (LHP) del estudio II, pero no bajo la condición estándar (ST) del estudio I (Figura 24). EGF disminuyó significativamente, tanto en el grupo control, como en el grupo de SOS leve-moderado, mientras que IL-6 aumentó en ambos después de la exposición a las condiciones adversas. Asimismo se observó un aumento significativo en los valores de CCL5/RANTES en el grupo control después de la exposición a la condición adversa. Además, los niveles iniciales (pre-) de CCL5/RANTES detectados en la lágrima de los pacientes con SOS leve-moderado fueron significativamente mayores que el nivel basal del grupo control. Asimismo, los niveles de MMP-9 se incrementaron en ambos grupos después de la exposición a ambas condiciones ambientales, aunque sólo el incremento del grupo de SOS leve-moderado después de la exposición a la condición adversa fue significativo (Figura 24). No se detectaron cambios significativos en los niveles del resto de moléculas analizadas. Los valores de las mismas se muestran en la tabla 22.

Tabla 21. Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima. Estudio I y II. Análisis comparativo.

Moléculas	Tiempo	<i>ESTUDIO I</i> <u>CONDICIÓN ESTÁNDAR – ST</u>		<i>ESTUDIO II</i> <u>CONDICIÓN ADVERSA - LHP</u>	
		Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado	Grupo Control	Grupo SOS Leve-Moderado
EGF	Pre	100%	100%	100%	> 80%
	Post	100%	100%	100%	> 80%
CX3CL1/FRACTALQUINA	Pre	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
	Post	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
IL-1Ra	Pre	> 80%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	> 80%
IL-6	Pre	50 – 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%
	Post	> 80%	> 80%	> 80%	> 80%
CXCL8/IL-8	Pre	> 80%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	100%
CXCL10/IP-10	Pre	> 80%	100%	> 80%	> 80%
	Post	100%	100%	> 80%	> 80%
CCL5/RANTES	Pre	50 – 80%	> 80%	> 80%	> 80%
	Post	50 – 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%
VEGF	Pre	50 – 80%	50 – 80%	> 80%	> 80%
	Post	100%	> 80%	> 80%	> 80%
MMP-9	Pre	100%	100%	100%	100%
	Post	100%	100%	100%	100%

Niveles de detección de las moléculas analizadas en la lágrima que alcanzaron más del 30% de detección, tanto antes como después de la exposición a las diferentes condiciones ambientales. SOS: síndrome de ojo seco. IL-: interleuquina; IFN- γ : interferón gamma; TNF- α : factor de necrosis tumoral; CCL5/RANTES: factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; MMP-9: metaloproteínasa 9.

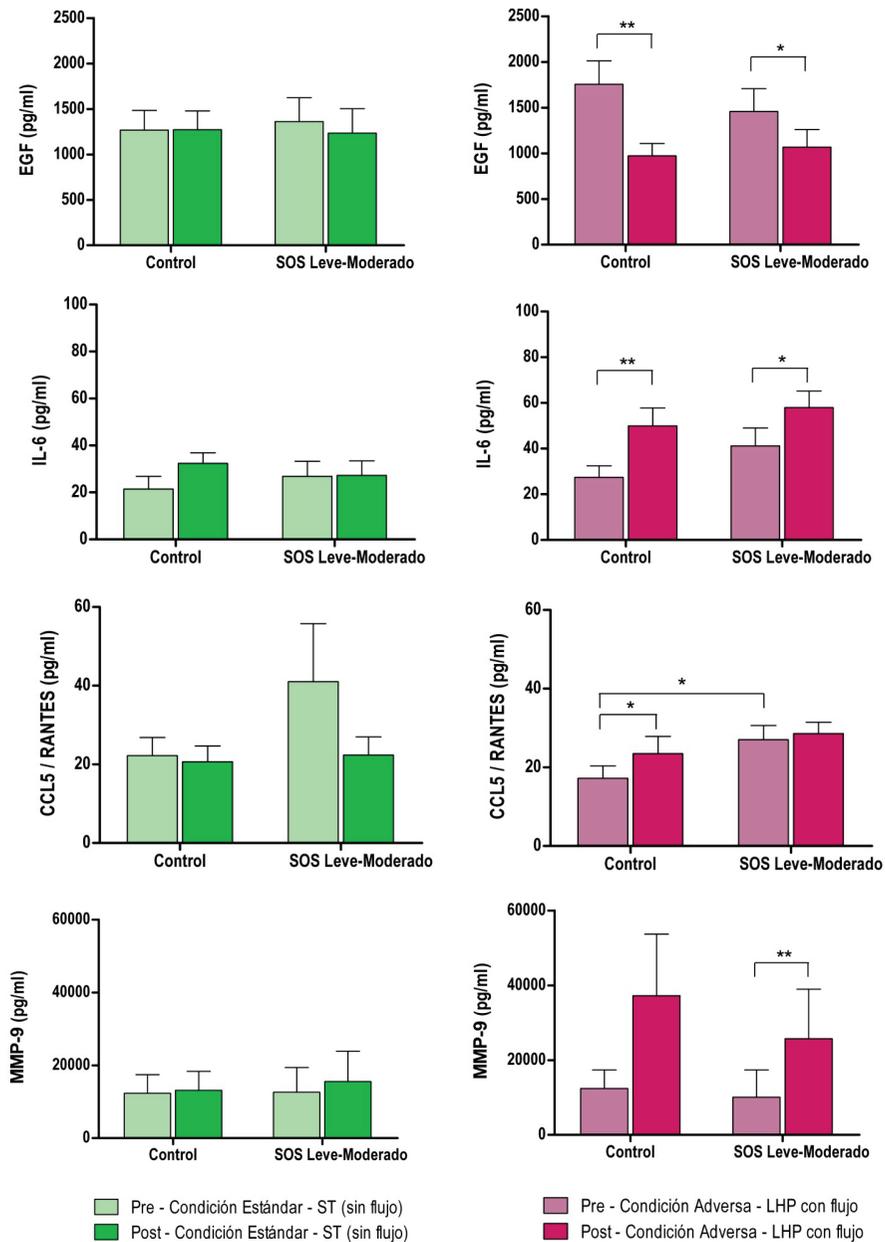


Figura 24. Moléculas en la lágrima que mostraron cambios significativos en el análisis comparativo entre el estudio I y II. Verde: Condición estándar sin flujo; Rojo: Condición adversa con flujo. Las barras claras indican el nivel antes de la exposición (pre-). Las barras oscuras el nivel después de dos horas de exposición (post-). SOS: síndrome de ojo seco

Tabla 22. Niveles de las moléculas detectadas en lágrima en un porcentaje mayor al 30%. Estudio I y II. Análisis comparativo.

MOLÉCULAS	Tiempo	ESTUDIO I CONDICIÓN ESTÁNDAR – ST				ESTUDIO II CONDICIÓN ADVERSA - LHP			
		Grupo Control	N	Grupo SOS Leve-Moderado	N	Grupo Control	N	Grupo SOS Leve-Moderado	N
EGF	Pre	1267,3 ± 217,9	19	1362,3 ± 261,3	15	1754,5 ± 256,1	20	1457,2 ± 249,6	20
	Post	1272,7 ± 205,0	19	1234,5 ± 268,8	15	972,0 ± 136,1**	20	1068,7 ± 190,4*	20
CX3CL1/FRACTALQUINA	Pre	826,0 ± 205,2	19	741,8 ± 219,0	15	1010,9 ± 256,6	20	1158,9 ± 148,6	20
	Post	983,8 ± 236,2	19	780,8 ± 149,8	15	1111,4 ± 252,8	20	1079,2 ± 172,9	20
IL-1Ra	Pre	12713,4 ± 2914,7	19	11529,3 ± 3476,8	15	10091,4 ± 2147,3	20	9039,3 ± 1595,1	20
	Post	14234,7 ± 3101,2	19	14018,5 ± 3426,7	15	8617,5 ± 1595,3	20	10156,6 ± 1593,7	20
IL-2	Pre	ND	19	ND	15	4,5 ± 0,8	20	7,6 ± 1,6	20
	Post	ND	19	ND	15	7,5 ± 2,0	20	7,4 ± 2,0	20
IL-6	Pre	21,5 ± 5,4	19	26,9 ± 6,4	15	27,5 ± 5,0	20	41,2 ± 7,8	20
	Post	32,4 ± 4,5	19	27,3 ± 6,2	15	50,0 ± 7,8**	20	58,0 ± 7,2*	20
CXCL8/IL-8	Pre	1299,6 ± 489,1	19	2085,8 ± 936,2	15	866,1 ± 204,0	20	621,8 ± 132,4	20
	Post	887,4 ± 257,0	19	855,1 ± 244,8	15	976,3 ± 271,0	20	760,6 ± 133,4	20
CXCL10/IP-10	Pre	67899,6 ± 11258,0	19	50300,0 ± 6262,3	15	41126,9 ± 5677,9	20	49725,4 ± 6579,9	20
	Post	67378,9 ± 11500,7	19	45513,3 ± 5627,9	15	40316,4 ± 5913,8	20	48241,0 ± 6552,3	20
CCL5/RANTES	Pre	22,2 ± 4,6	19	27,3 ± 1,7	15	17,2 ± 3,1	20	27,0 ± 3,6	20
	Post	20,7 ± 4,0	19	20,7 ± 1,3	15	23,5 ± 4,4**	20	28,6 ± 2,9	20
VEGF	Pre	611,9 ± 102,9	19	492,3 ± 133,8	15	649,7 ± 134,7	20	465,9 ± 103,0	20
	Post	653,0 ± 71,5	19	505,8 ± 80,4	15	635,0 ± 120,2	20	470,2 ± 95,5	20
MMP-9	Pre	12334,2 ± 5091,4	19	12606,8 ± 6755,0	15	12447,5 ± 4944,6	20	10054,4 ± 6754,8	20
	Post	13141,0 ± 5169,8	19	15528,8 ± 8365,6	15	37244,8 ± 16442,5	20	25744,5 ± 12181,2**	20

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). Comparación mediante el test de Wilcoxon de los niveles de las moléculas analizadas en la lágrima antes (pre-) y después (post-) de la exposición a las diferentes condiciones ambientales para cada uno de los grupos de estudio. ND; no detectado; SOS: síndrome de ojo seco; IL-: interleuquina; IFN-γ: interferón gamma; TNF-α: factor de necrosis tumoral; CCL5/RANTES: factor expresado y secretado por las células T normales y reguladas; EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; MMP-9: metaloproteína 9.

ESTUDIO III

Justificación del modelo

ESTUDIO III

RESULTADOS

VISITA DE INCLUSIÓN (V0)

Se seleccionaron 14 sujetos control (7 varones y 7 mujeres; edad media $63,07 \pm 1,76$ años) de entre los participantes control de los estudios I y II, que fueron evaluados en los meses de abril, mayo y junio de 2010 y 2011. De igual forma, se reclutaron y evaluaron 14 sujetos control en Braga (Portugal), (7 varones y 7 mujeres; edad media $59,07 \pm 0,87$), siguiendo el mismo protocolo descrito para los estudios I y II con las excepciones especificadas en la metodología del estudio III. Ninguno de los individuos reclutados en Braga (Portugal) abandonó el estudio y estos fueron pareados en edad y sexo con los sujetos seleccionados de Valladolid, no habiendo diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros.

REPRODUCIBILIDAD DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Los resultados de las pruebas diagnósticas obtenidas en las tres evaluaciones previas a la exposición de los sujetos control seleccionados de los estudios I y II (pre-V1, pre-V2, pre-V3) se compararon con los resultados de las mismas pruebas obtenidas en las tres visitas de los sujetos control reclutados en Braga (V1, V2, V3). Para ello, primero se analizó la reproducibilidad (fiabilidad) de las pruebas diagnósticas realizadas tanto en la muestra de Valladolid (España) como en la muestra de Braga (Portugal) para determinar la mejor forma

comparación de los datos entre ambos grupos. La fiabilidad de las variables cuantitativas (PRTT, T-BUT y test de Schirmer) fueron analizadas mediante el CCI mientras que para las variables que adoptaban un valor ordinal (tinción corneal y conjuntival e hiperemia conjuntival) se utilizó el coeficiente Kappa. Las tablas 23 y 24 muestran los resultados de fiabilidad de los tests diagnósticos de Valladolid mientras que las tablas 25 y 26 muestran los resultados de fiabilidad de los test diagnósticos de Braga.

Tabla 23. Coeficiente de correlación intraclase (ICC) de las variables cualitativas de los tests diagnósticos de Valladolid.

VARIABLES CUANTITATIVAS	ICC	FUERZA DE CONCORDANCIA
PRTT	0,40	Mediocre
T - BUT	0,11	Mala o nula
Schirmer test	0,61	Moderada

ICC: coeficiente de correlación intraclase; PRTT: test de rojo de fenol; T-BUT: tiempo de ruptura lagrimal.

Tabla 24. Coeficiente Kappa de las variables ordinales de los tests diagnósticos de Valladolid.

VARIABLES ORDINALES	Coeficiente Kappa	Fuerza de Concordancia
Hiperemia Conjuntival		
Nasal	0,49	Moderada
Temporal	0,21	Mediocre
Tinción Corneal (escala Oxford)		
	0,41	Moderada
Tinción Corneal (escala Baylor)		
Central	0,33	Mediocre
Nasal	0,49	Moderada
Temporal	0,30	Mediocre
Superior	-	Mala o nula
Inferior	0,33	Mediocre
Tinción Conjuntival (escala Oxford)		
Nasal	0,55	Moderada
Temporal	0,59	Moderada

Tabla 25. Coeficiente de correlación intraclase (ICC) de las variables cualitativas de los tests diagnósticos de Braga.

VARIABLES CUANTITATIVAS	ICC	FUERZA DE CONCORDANCIA
PRTT	0,55	Moderada
T - BUT	0,14	Mala o nula
Schirmer test	0,69	Moderada

ICC: coeficiente de correlación intraclase; PRTT: test de rojo de fenol; T-BUT: tiempo de ruptura lagrimal.

Tabla 26. Coeficiente Kappa de las variables ordinales de los tests diagnósticos de Braga.

Variables Ordinales	Coeficiente Kappa	Fuerza de Concordancia
Hiperemia Conjuntival		
Nasal	0,43	Moderada
Temporal	0,61	Buena
Tinción Corneal (escala Oxford)	0,08	Mala o nula
Tinción Corneal (escala Baylor)		
Central	-	Mala o nula
Nasal	0,00	Mala o nula
Temporal	0,00	Mala o nula
Superior	-	Mala o nula
Inferior	0,00	Mala o nula
Tinción Conjuntival (escala Oxford)		
Nasal	0,36	Mediocre
Temporal	0,48	Moderada

En términos generales, todas las pruebas diagnósticas realizadas tanto en Valladolid (España) como en Braga (Portugal) han mostrado una baja fiabilidad, siendo ésta ligeramente peor en los resultados obtenidos en Braga (Portugal) en lo que respecta a la tinción corneal.

Por lo tanto, para comparar los resultados de las pruebas entre los sujetos control de Valladolid y los de Braga, no era estadísticamente correcto utilizar el valor medio de las tres visitas en cada localización ya que en el estudio de reproducibilidad de estas pruebas no se obtuvo una reproducibilidad alta en las variables estudiadas en ninguna de las dos muestras estudiadas (Valladolid y Braga), como acaba de mencionarse.

Teniendo en cuenta que las condiciones ambientales del entorno de procedencia de los sujetos control seleccionados en ambas ciudades pueden “alterar” los resultados de estas pruebas clínicas, para poder comparar los resultados obtenidos entre ambas ciudades, se ordenaron cada una de las tres visitas realizadas por cada sujeto (pre-V1, pre-V2 y pre-V3 en el caso de los datos obtenidos en Valladolid, y V1, V2 y V3, en el caso de los datos obtenidos en Braga) por la RH ambiental externa que hubo el día que se realizó cada una de las visitas, separando los días en: RH baja, RH media y RH alta, y se han seleccionado y comparado únicamente los resultados de la visita que se correspondía con la RH media ambiental de entre las tres visitas (Tabla 27).

Tabla 27. Valores de temperatura y RH en Valladolid y Braga durante las visitas, clasificadas por la RH ambiental externa.

VISITA	CIUDAD	HR (%)	Temperatura (°C)
RH BAJA	Valladolid	36,80 ± 1,99	21,60 ± 1,50
	Braga	75,80 ± 1,60	16,60 ± 0,75
RH MEDIA	Valladolid	52,60 ± 3,69	16,00 ± 0,89
	Braga	81,25 ± 1,22	16,50 ± 0,71
RH ALTA	Valladolid	62,40 ± 5,47	17,40 ± 1,08
	Braga	85,29 ± 2,04	17,29 ± 0,36

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). HR: humedad relativa.

DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES

No hubo diferencias significativas en la temperatura entre la ciudad de Braga y la ciudad de Valladolid entre los días correspondientes a las visitas con RH media que fueron seleccionadas para su comparación (Tabla 28; Figura 25a). Sin embargo, sí existieron diferencias significativas en la RH entre ambas ciudades (Tabla 28, Figura 25b).

Tabla 28. Valores medios de temperatura y RH en Valladolid y Braga.

VARIABLE	CIUDAD	MEDIA \pm SEM	p valor
Temperatura (°C)	Valladolid	16,00 \pm 0,89	0,762
	Braga	16,50 \pm 0,71	
Humedad Relativa – RH (%)	Valladolid	52,60 \pm 3,69	0,003
	Braga	81,25 \pm 1,22	

Datos expresados como media \pm error estándar de la media (M \pm SEM). RH: humedad relativa.

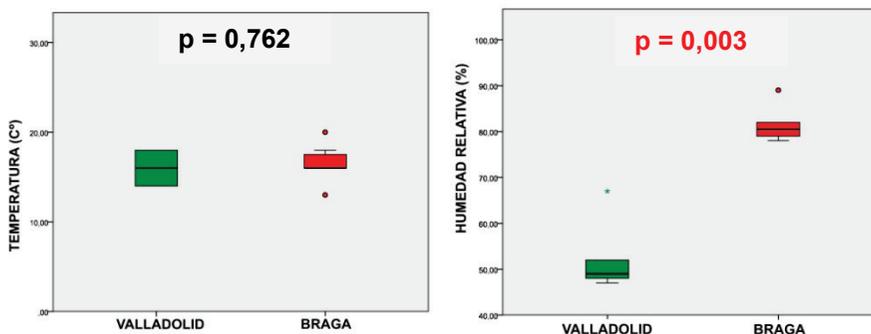


Figura 25. Gráfico de cajas del estudio comparativo entre Valladolid (España) y Braga (Portugal). A: temperatura; B: humedad relativa.

DE LOS TESTS CLÍNICOS

Los sujetos control de Braga presentaron valores menores de sintomatología que los sujetos control de Valladolid en el cuestionario SIDEQ modificado, siendo significativo tanto el valor del SIDEQ global (media de todas las preguntas de las que se compone el cuestionario), así como para todas las preguntas individualmente, exceptuando “dolor” y “otros”, en donde no hubo diferencias significativas entre los grupos (Tabla 29).

No hubo diferencias significativas en los tests de evaluación del volumen lagrimal (PRTT y test de Schirmer); sin embargo, los sujetos control de Braga presentaron valores de T-BUT significativamente más elevados que los sujetos control de Valladolid (Tabla 29).

La hiperemia conjuntival presentada por los sujetos control de Valladolid se encontraba ligeramente incrementada frente a la observada en los sujetos control de Braga; no obstante, estas diferencias no alcanzaron la significación estadística, aunque fue cercana a ella (Tabla 29). Sin embargo, sí existieron diferencias significativas en la tinción conjuntival media, siendo mayor la encontrada en los sujetos control de Valladolid.

Respecto a la tinción corneal, a pesar de que ambos grupos fueron incluidos bajo los mismos criterios de inclusión y exclusión que fueron empleados para los sujetos control de Valladolid, los sujetos control de Braga presentaron valores de tinción corneal significativamente menores que los sujetos control de Valladolid, independientemente de la escala de valoración utilizada (escala Oxford o escala Baylor modificada – global). La escala Baylor modificada mostró una tinción corneal en el área temporal significativamente mayor en el grupo control de Valladolid (Tabla 29).

Tabla 29. Resultados de los tests clínicos en Valladolid y Braga.

VARIABLE	CIUDAD	MEDIA ± SEM	p valor
SIDEQ global	Valladolid	2,87 ± 1,11	0,002
	Braga	0,14 ± 0,14	
Sequedad	Valladolid	0,48 ± 0,22	0,004
	Braga	0,14 ± 0,14	
Sensación de Cuerpo Extraño	Valladolid	1,43 ± 0,85	0,016
	Braga	0,00 ± 0,00	
Quemazón	Valladolid	0,44 ± 0,92	0,034
	Braga	0,00 ± 0,00	
Dolor	Valladolid	0,06 ± 0,03	0,072
	Braga	0,00 ± 0,00	
Picor	Valladolid	0,46 ± 0,22	0,007
	Braga	0,00 ± 0,00	
Sensibilidad a la luz	Valladolid	0,53 ± 0,24	0,019
	Braga	0,14 ± 0,14	
Visión borrosa	Valladolid	0,71 ± 0,39	0,007
	Braga	0,00 ± 0,00	
Otros	Valladolid	0,24 ± 0,16	0,072
	Braga	0,00 ± 0,00	
PRTT	Valladolid	19,21 ± 1,83	0,369
	Braga	21,43 ± 1,69	
Hiperemia Conjuntival (media)	Valladolid	0,89 ± 0,09	0,057
	Braga	0,61 ± 0,09	
T-BUT	Valladolid	2,76 ± 0,60	0,0006
	Braga	5,26 ± 0,64	
Tinción Corneal (escala Oxford)	Valladolid	0,64 ± 0,17	0,018
	Braga	0,14 ± 0,10	
Tinción Corneal (escala Baylor-Global)	Valladolid	2,14 ± 0,83	0,023
	Braga	0,43 ± 0,17	
Temporal	Valladolid	0,64 ± 0,20	0,012
	Braga	0,07 ± 0,07	
Tinción Conjuntival (media)	Valladolid	0,61 ± 0,17	0,029
	Braga	0,14 ± 0,08	
Test de Schirmer (sin anestesia)	Valladolid	11,93 ± 2,20	0,729
	Braga	14,29 ± 2,78	

Datos expresados como media ± error estándar de la media (M±SEM). SIDEQ: single item score dry eye questionnaire / Cuestionario de valoración de ojo seco; PRTT: test de rojo de fenol; T-BUT: tiempo de ruptura lagrimal.

DISCUSIÓN

CONDICIONES AMBIENTALES Y CÁMARAS DE AMBIENTE CONTROLADO

La superficie ocular está constantemente expuesta a ambientes exteriores e interiores, por lo tanto, se espera que la FLU pueda llegar a deteriorarse cuando se expone a condiciones adversas. Diversos estudios han demostrado que una temperatura elevada (Borchman y cols., 2009), la baja humedad (Yao y cols., 2011) y la altitud (Gupta y cols., 2008) son factores de riesgo que empeoran o incrementan los signos y síntomas del SOS.

En el estudio III de ésta tesis doctoral, se han comparado los datos obtenidos entre dos poblaciones procedentes de dos lugares geográficos diferentes. La principal razón de ésta comparación ha sido que no podemos controlar las condiciones ambientales en las que los pacientes han estado antes de ser evaluados en un estudio, de igual forma que desconocemos estas condiciones cuando un paciente entra en una consulta habitual. Sin embargo, las condiciones ambientales a las que hayan estado expuestos son mayoritariamente debidas al clima de la zona y como ya hemos descrito, estas condiciones ambientales, bien sean las altas temperaturas (Yao y cols., 2011), una baja RH (Yao y cols., 2011), los flujos de aire (Borchman y cols., 2009), una elevada velocidad del viento (DEWS, 2007a), o una elevada altitud (Gupta y cols., 2008), son factores de riesgo conocidos que afectan a la superficie ocular.

Debido a esta repercusión de las condiciones ambientales del ámbito geográfico en el estado de la superficie ocular, es justificable teorizar que las diferencias existentes en dos poblaciones control reclutadas y examinadas bajo los mismos criterios e incluso en la misma época del año, puedan ser debidas, al menos en parte, a las diferencias climáticas tan significativas

(especialmente en la RH) que hemos encontrado entre ambas ciudades, lo cual apoyaría la hipótesis de la presente tesis, en la que se plantea que las condiciones ambientales afectan a los datos de los tests clínicos que utilizamos en la clínica diaria para la evaluación, diagnóstico y seguimiento de los pacientes con SOS.

En el caso de nuestro estudio, y debido a que los resultados de las pruebas diagnósticas incluidas en el estudio III tuvieron una baja reproducibilidad, para comparar los resultados obtenidos entre ambas ciudades, se ordenaron cada una de las tres visitas realizadas por cada sujeto (pre-V1, pre-V2 y pre-V3 en el caso de los datos obtenidos en Valladolid, y V1, V2 y V3, en el caso de los datos obtenidos en Braga) por la RH ambiental externa que hubo el día que se realizó cada una de las visitas, separando los días en: RH baja, RH media y RH alta, y se seleccionaron y compararon únicamente los resultados de la visita que se correspondía con la RH media ambiental de entre las tres visitas de cada una de las ciudades, por considerar ésta la más representativa. La elección de la visita en base a la RH y no en base a la temperatura fue debida a que los estudios realizados previamente dentro de CERLab (estudio I y II) fueron realizados manteniendo una temperatura constante, siendo la RH una de las principales variables modificables en cada una de las exposiciones realizadas. Además, tanto los criterios de inclusión y de exclusión como las visitas realizadas se hicieron siguiendo el protocolo descrito para los estudios I y II con el fin de homogenizar al máximo la población control estudiado.

Las CAC que recrean condiciones ambientales adversas controladas, son también adecuadas para la realización de ensayos clínicos, donde factores ambientales como la temperatura, la RH y el flujo del aire pueden ser controlados (Dursun y cols., 2002; Ousler y cols., 2002; 2005). Además, otros autores ya han puesto previamente de manifiesto la necesidad de evaluar el

comportamiento, por ejemplo, de las lentes de contacto bajo condiciones controladas, demostrando un incremento de la incomodidad de los usuarios de lentes de contacto después de la exposición de los mismos a condiciones de baja RH (González-García y cols., 2007) y a un flujo de aire (Ousler y cols., 2008; Kojima y cols., 2011).

Un estudio reciente ha expuesto a los sujetos a unas condiciones ambientales adversas similares a dos de las recreadas en nuestro estudio, una condición que denominaron “normal”, con una RH del 40% y otra condición que denominaron “desecante”, con una RH del 5% (Abusharha y Pearce, 2012). En nuestros estudios, la condición ambiental que hemos denominado “estándar-ST” del estudio I, con una RH del 45% y sin flujo de aire, tiene unas características similares a la condición “normal” de este estudio, al igual que la condición LH del primer estudio, se asemeja a su condición ambiental denominada “desecante”. Sin embargo, la condición estándar no es necesariamente la que proporcione la humedad ambiental óptima a la superficie ocular, ya que la RH es relativamente baja. De hecho, algunos sujetos control han mostrado un aumento de la tinción corneal después de haber sido expuestos a nuestra condición ST del estudio I. Sin embargo, es difícil separar el efecto de la RH en la superficie ocular de la inducida por la realización de tareas de visión cerca, a lo largo de la totalidad de la exposición. No obstante, su denominación como ST o “normal” es debida a que sus características pueden asemejarse a un ambiente típico en ambientes cerrados o de interior (Arundel y cols., 1986), siendo también el ambiente con más RH de los tres recreados en este estudio.

Se eligió un tiempo de exposición de 2 horas a las condiciones ambientales basándonos principalmente en los tiempos de exposición previamente utilizados por otros autores (González-García y cols., 2007; Abelson y cols.,

2012). Sunwoo y cols, (Sunwoo y cols, 2006a) compararon 3 RH con una duración de exposición de 3 horas, mientras que Strom-Tejsen y cols, (Strom-Tejsen y cols, 2007) reprodujeron un vuelo de 7 horas de duración en una aeronave, pero detectaron cambios a las 3,5 horas de exposición. Además de esto, debido a la complejidad del protocolo de evaluación, los sujetos permanecían en las instalaciones un total de aproximadamente 4 horas, por lo que se ocupaba la mañana o la tarde del tiempo de los voluntarios en cada una de las visitas de exposición.

DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

En el estudio I se seleccionaron sujetos control, pacientes con SOS leve-moderado y pacientes con SOS severo con el objetivo de evaluar la influencia de los factores ambientales adversos en éstos grupos; mientras que en el estudio II no se han incluido pacientes con SOS severo. Esta decisión se tomó en base a los resultados obtenidos en el estudio I (y en consecuencia en este análisis comparativo entre ambos estudios), debido tanto a la gran alteración basal que presenta la FLU de estos pacientes y al endurecimiento de las condiciones ambientales del estudio II al incluir la presencia de un flujo de aire, como a la constatación en el estudio I de que pacientes con SOS leve-moderado presentaban síntomas de malestar suficientes como para que fuera probable que mostrasen cambios, tanto en las pruebas clínicas como en las moléculas en lágrima estudiadas cuando estos sujetos son sometidos a estrés ambiental. Además, es sabido que el SOS severo es menos frecuente y estos pacientes con frecuencia presentan alguna enfermedad extraocular, lo cual dificulta aún más su reclutamiento en ensayos clínicos.

Hemos utilizado el cuestionario OSDI[®], que es empleado con frecuencia como un criterio de evaluación “outcome endpoint” en los ensayos clínicos de la superficie ocular (Lemp, 2007), para clasificar a los individuos dentro del grupo control o dentro del grupo de SOS, debido a su validez y fiabilidad como prueba psicométrica para diferenciar la gravedad de los pacientes con SOS (Schiffman y cols., 2000). Debido a esto, en los estudios que constituyen esta tesis doctoral, los sujetos control fueron reclutados en base a la puntuación del cuestionario OSDI[®] (índice OSDI[®]) y a la ausencia de alteraciones epiteliales corneales, fundamentalmente. Como resultado de los criterios de exclusión seleccionados, no hemos encontrado diferencias significativas en los resultados de pruebas diagnósticas de SOS entre nuestros sujetos control y el

grupo de SOS leve-moderado ni en el primer ni en el segundo estudio (Tabla 9 y 14 respectivamente y la puntuación inicial que han presentado todos los grupos de estudio en ambos estudios en el cuestionario SIDEQ ha sido coherente con estos valores iniciales recogidos en el OSDI®; sin embargo, los pacientes con SOS severo del estudio I mostraron diferencias con los otros dos grupos de estudio (sujetos control y pacientes con SOS leve-moderado (Tabla 9). Esta ausencia de diferencias entre grupos control y SOS leve-moderado también ha sido reportada en estudios previos (Begley y cols., 2003). Una posible causa que haya influido en la ausencia de diferencias en las pruebas clínicas durante la inclusión en los estudios entre estos dos grupos puede haber sido el hecho de que los pacientes con SOS se encontraban bajo tratamiento que no fue suspendido, sino mantenido constante, a lo largo de los respectivos estudios, por lo que la probabilidad de encontrar diferencias entre estos grupos debería ser menor aún. Este resultado no es sorprendente, ya que estudios previos han demostrado la existencia de una pobre correlación entre los signos y síntomas en pacientes con SOS (Johnson, 2009), especialmente en los de tipo evaporativo (Baum, 2010), que han compuesto nuestros grupos de SOS leve-moderado.

Los resultados del estudio III en el que comparamos los valores “basales” de la muestra control de Valladolid con la muestra control obtenida en Braga nos muestran que, a pesar de que los valores de SIDEQ de ambas poblaciones son mínimos, hecho lógico al tratarse de sujetos control, los sujetos de Valladolid muestran niveles más alejados de 0 prácticamente en todas las variables del cuestionario, siendo este hecho suficiente como para haber hallado diferencias significativas entre ambos grupos. Esto demuestra que, a pesar de que es común y está aceptado encontrar sujetos control con cierto grado de sintomatología basal (DEWS, 2007a), sea cual sea el cuestionario

empleado para su evaluación (Simmons PA, y cols. IOVS 2003;44: ARVO E-Abstract 2448.; DEWS, 2007a; Schiffman y cols., 2000; Walt, 2004), es muy posible que esté relacionada con las condiciones ambientales existentes en la región geográfica a la que pertenezcan los sujetos.

En ambos estudios (estudio I y II), los grupos de sujetos control mostraron valores de osmolaridad por debajo del criterio de corte para el diagnóstico de SOS, 316 mOsm/l (Tomlinson y cols., 2006; DEWS, 2007a), mientras que los pacientes con SOS leve-moderado se encontraron generalmente por encima de ese valor. El aumento de la osmolaridad lagrimal ha sido descrito previamente en pacientes con SOS (DEWS, 2007a; Eperjesi y cols., 2012; Stevenson y cols., 2012). La osmolaridad lagrimal depende de la osmolaridad (o tonicidad) de la producción lagrimal primaria y del ratio entre la producción lagrimal y su eliminación bien por las vías lagrimales o por evaporación. Así, en pacientes con SOS, la reducción de la producción lagrimal y/o el aumento de la evaporación lagrimal resulta en la pérdida de líquido volviendo a la lágrima hipertónica (Gilbard y Farris, 1979). Como era de esperar, los valores de osmolaridad más elevados han correspondido con el grupo de SOS severo (Tomlinson y cols., 2006; DEWS, 2007a; Lemp y cols., 2011).

Con respecto a los resultados del T-BUT fueron bajos no únicamente en el grupo de SOS severo, tal y como cabía esperar, sino en los grupos control y SOS leve-moderado de ambos estudios (I y II). Así también, aunque los sujetos control de Braga tuvieron medias significativamente mayores en el T-BUT, también fueron valores bajos con respecto al criterio de corte establecido para este test (Lam y cols., 2009; Bourcier y cols., 2005). Sin embargo, se han repostado valores de T-BUT cercanos a los obtenidos en este estudio, tanto en una población mayor a la nuestra (Arita y cols., 2009), como en sujetos más jóvenes (Zhang y cols., 2011). Podríamos decir que el T-BUT puede no ser la

mejor prueba diagnóstica para diferenciar entre sujetos control y sujetos con SOS leve-moderado.

Basándonos en los valores de PRTT y del test de Schirmer, tanto los sujetos control como los pacientes con SOS leve-moderado de ambos estudios presentaron niveles de volumen y secreción lagrimal considerados normales (Patel y cols., 1998; DEWS, 2007a); El test de Schirmer fue realizado en todos los estudios sin la instilación de anestesia tópica debido a que esta forma de realización es uno de los "items" considerado en el esquema de graduación del ojo seco que propone el informe internacional del DEWS de 2007 (DEWS, 2007a). Los valores basales de todos los participantes de los estudios (exceptuando lógicamente al grupo de SOS severo) alcanzaron valores muy por encima de 5 mm a los 5 minutos, valor seleccionado en los criterios de clasificación internacional para las manifestaciones oculares del síndrome de Sjögren. Este hecho, entre otros, garantizaría que nuestros pacientes con SOS leve-moderado no padecían SOS severo.

Al igual que hemos encontrado diferencias significativas en la sintomatología entre la muestra de Valladolid y Braga en el estudio III, también se han detectado diferencias entre ambas muestras en todos los tests diagnósticos medidos en ambas poblaciones. A pesar de estar todos dentro de los rangos de normalidad en base a los criterios de inclusión y exclusión seguidos en esta tesis doctoral, se ha encontrado siempre un valor más cercano a la normalidad en los sujetos control de Braga que en los sujetos control reclutados en Valladolid. Así, ambos tests, tanto el PRTT como el test de Schirmer, presentan mejores valores en los sujetos control de Braga, que en los sujetos control de Valladolid, a pesar de no haber alcanzado una diferencia estadísticamente significativa.

Respecto a la tinción corneal con fluoresceína, los participantes de todos los estudios que componen esta tesis doctoral se encontraban dentro de los niveles correspondientes a su grupo, al haber sido este un criterio de inclusión y exclusión específico para la correcta clasificación de los participantes de todos los estudios. Además, debido a ello, los niveles basales tanto de hiperemia como de tinción conjuntival se encontraban dentro de los parámetros esperables para cada grupo (DEWS, 2007a). En los resultados concretos obtenidos del estudio III, ambas poblaciones (Braga y Valladolid) presentaron cierto grado tanto de tinción corneal (en ambas escalas), como de hiperemia y de tinción conjuntival. Sin embargo, a pesar de encontrarse todos en niveles aceptados de normalidad en sujetos control (DEWS, 2007a), de nuevo los valores para estos tests estaban más incrementados en la población control de Valladolid respecto a la población de Braga, siendo significativas las diferencias entre ambas poblaciones tanto para la tinción corneal como para la conjuntival. Estas diferencias en la tinción eran esperables debido a la relación ya mencionada anteriormente entre la estabilidad lagrimal y el daño corneal (Himebaugh y cols., 2009), por lo que es esperable que la población de Valladolid presentara valores de tinciones mayores al tener también niveles de T-BUT más disminuidos que la población control de Braga.

DE LOS RESULTADOS DE LOS TESTS CLÍNICOS

Sintomatología

Para poder evaluar la evolución de los síntomas de SOS antes, a la hora y al final de las exposiciones a los ambientes controlados, los participantes del estudio cumplieron una modificación del cuestionario SIDEQ. Se utilizaron los mismos elementos del cuestionario original, pero cada uno de los resultados fue anotado en una escala VAS que permitió ampliar el rango de 0 a 10. El objetivo de la modificación realizada al cuestionario SIDEQ mediante la aplicación de VAS, fue conseguir una herramienta más sensible a los pequeños cambios en los síntomas (van der Worp y cols., 2009). En el estudio I, únicamente el grupo SOS severo mostró una reducción significativa de los síntomas durante la exposición a la condición ST.

Los sujetos control de los estudios I y II presentaron menos sintomatología que los sujetos con SOS, especialmente en el estudio II, donde se han podido observar diferencias significativas en la puntuación del cuestionario SIDEQ entre el grupo control y el grupo de SOS leve-moderado antes de la exposición a cualquiera de las tres condiciones ambientales. Sin embargo, no pudimos encontrar ninguna diferencia significativa ni a la hora ni después de la exposición a ninguna de las condiciones ambientales de ambos estudios. Este resultado no es sorprendente, ya que hay estudios previos que han demostrado la escasa correlación entre signos y síntomas en pacientes con SOS (Begley y cols., 2003; Johnson, 2009), especialmente en pacientes con SOS evaporativo, como el grupo de SOS leve-moderado de nuestro estudio (Baum, 2010), ya que en la mayor parte de los casos de nuestro estudio, existió un incremento de la tinción corneal post-exposición.

En el análisis comparativo entre las dos condiciones más extremas estudiadas (ST- Estudio I y LHP- Estudio II) podemos observar que comparado con el grupo de SOS leve-moderado, hubo una tendencia hacia la reducción de los síntomas en el grupo control durante la realización de tareas de visión cercana correspondientes a la condición ST- Estudio I. Por el contrario, ambos grupos mostraron una tendencia al aumento de los síntomas con la exposición a la condición adversa (LHP- Estudio II). Esta diferencia podría estar relacionada con la aceleración del adelgazamiento de la película lagrimal que se produce durante la condición adversa debido a la baja RH y el flujo de aire (Wolkoff y cols., 2005; Nichols y cols., 2004).

En el caso del estudio III, a pesar de que los valores de SIDEQ de ambas poblaciones (Braga y Valladolid) son mínimos al tratarse de sujetos control, los sujetos de Valladolid muestran niveles más alejados de 0 prácticamente en todas las variables del cuestionario, siendo este hecho suficiente como para haber hallado diferencias significativas entre ambos grupos. Esto demuestra que, a pesar de que es común y está aceptado encontrar sujetos control con cierto grado de sintomatología basal (DEWS, 2007a), sea cual sea el cuestionario empleado para su evaluación (Simmons PA, y cols. IOVS 2003;44: ARVO E-Abstract 2448.; DEWS, 2007a; Schiffman y cols., 2000; Walt, 2004), es muy posible que esté relacionada con las condiciones ambientales existentes en la región geográfica a la que pertenezcan los sujetos.

Osmolaridad

En cuanto a los valores de osmolaridad lagrimal, en la condición ST se observó una tendencia a la disminución de los valores para todos los grupos de estudio, siendo significativa en el grupo de SOS leve-moderado del estudio II. Esta disminución de la osmolaridad lagrimal podría indicar que un ambiente menos adverso puede mejorar las características de la película lagrimal en aquellos pacientes cuya FLU se encuentra previamente alterada, si este ambiente presentase unas variables ambientales menos adversas de las que procede el sujeto previamente, puesto que una baja RH provoca un aumento de la evaporación lagrimal, lo que puede conducir a la aparición de una hiperosmolaridad lagrimal (Mathers y cols., 1993), y la condición ST es la condición ambiental recreada que mayor RH presenta de las tres estudiadas.

Con respecto a las condiciones LH y LHP, se observó una tendencia al aumento de los valores de osmolaridad lagrimal en casi todos los grupos, alcanzando la significación estadística en el estudio I en los grupos control y SOS severo tras la condición LH y para el grupo control después de la exposición a la condición LHP. Abusharha y Pearce (Abusharha y Pearce, 2012) expusieron a sujetos control a una condición de baja RH similar a nuestra condición de LH del primer estudio; no encontrando diferencias significativas después de esta exposición. No obstante, a pesar de la tendencia al aumento de la osmolaridad encontrada en nuestro estudio, el hecho de no haber encontrado más cambios significativos en los valores de osmolaridad tras la exposición a las condiciones adversas (LH y LHP de ambos estudios), especialmente en los pacientes con SOS, podría ser debido en parte a la gran variabilidad de las mediciones con TearLab™ que han sido reportadas. Khanal y Millar (Khanal y Millar, 2012) informaron de la necesidad de realizar tres lecturas consecutivas con el TearLab™ para obtener una

medida fiable, debido a que encontraron que la variabilidad tras tres medidas consecutivas fue de 10 a 15 mOsm/l.

PRTT y Test de Schirmer

Las condiciones ambientales ST (ST- Estudio I, ST- Estudio II) no han afectado significativamente ni a los valores del PRTT ni del test de Schirmer en ninguno de los grupos de estudio, incluyendo a los pacientes con SOS severo.

En lo que respecta al PRTT en las condiciones LH y LHP encontramos una disminución de los valores del test en todos los casos, alcanzando la significación para el grupo control en la condición LH (pero sólo del estudio I) y en la condición LHP en el grupo SOS severo del estudio I y del grupo SOS leve-moderado del estudio II.

Para las condiciones LH y LHP con respecto al test de Schirmer, no se observó ningún cambio para ninguna de las condiciones estudiadas ni para ninguno de los grupos evaluados, ni siquiera una tendencia clara, excepto en el estudio II en la condición LH, en el que se encontró un aumento del valor de este test para los dos grupos, siendo significativo para el grupo de SOS leve-moderado.

Al realizar el análisis comparativo entre la condición ST- Estudio I y la condición LHP- Estudio II (las dos condiciones ambientales más diferentes entre sí) podemos observar que el PRTT no mostró cambios en ninguno de los grupos de estudio (controles y SOS leve-moderado) después de la exposición a la condición ST, sin embargo, se detectó una disminución de los valores promedio del PRTT en ambos grupos después de la exposición a la condición adversa. Esto puede haberse debido a la mayor tasa de evaporación de la película lagrimal que provocaba el entorno adverso. Además, en el estudio III,

se ha observado que tanto el PRTT como el test de Schirmer, presentan valores mejores en los sujetos control de Braga que en los sujetos control de Valladolid, a pesar de no haber alcanzado una diferencia estadísticamente significativa.

El PRTT es una prueba de volumen lagrimal que tiene una menor variabilidad entre sujetos que el test de Schirmer (Nichols y cols., 2004), por lo que es probable que pequeños cambios en el volumen lagrimal sólo puedan ser detectados por el PRTT, como ocurrió en nuestro estudio. Además, el PRTT es un test de duración de 15 seg., por lo que recoge la cantidad de lágrima presente en la superficie ocular, mientras que el test de Schirmer es una prueba con una duración de 5 minutos, por lo que no únicamente recoge la cantidad de lágrima presente en la superficie ocular, sino que también mide producción lagrimal. Es posible que una estancia de dos horas bajo cada una de las condiciones ambientales recreadas en la cámara sea insuficiente para alterar significativamente los niveles de producción lagrimal y sí lo sea para detectar variaciones en el volumen lagrimal presente en la superficie ocular.

Hiperemia conjuntival (escala Efron) y tinción conjuntival (escala Oxford)

En ambos estudios se puede observar un aumento de la hiperemia conjuntival después de la exposición a todas las condiciones ambientales y para todos los grupos de estudio, habiendo alcanzado la significación estadística para el grupo control y SOS leve-moderado después de la exposición a la condición ST del estudio I, y únicamente para el grupo de SOS leve-moderado para ésta misma condición del estudio II. La condición de LH del primer estudio ha aumentado significativamente la hiperemia conjuntival en ambos grupos de SOS (SOS leve-moderado y SOS severo), mientras que para la condición LH del estudio II, ninguno de los dos grupos evaluados bajo esta condición

alcanzó la significación estadística. Sin embargo, la condición LHP de los dos estudios (LHP- Estudio I y LHP- Estudio II) produjeron ambas un aumento significativo de la hiperemia conjuntival en todos los grupos (controles, SOS leve-moderado y SOS severo).

Asociado a este incremento en la hiperemia conjuntival, también encontramos una tendencia en la tinción conjuntival en ambos grupos del estudio II y tras todas las condiciones. La hiperemia conjuntival puede incrementarse fácilmente cuando se estresa la superficie ocular (como en el presente estudio); mientras que este estrés ha de ser más prolongado para llegar a afectar a la viabilidad de las células de la superficie ocular, produciendo defectos epiteliales.

T-BUT

La exposición a ambas condiciones ST (ST- Estudio I y ST- Estudio II) no han alterado significativamente los valores del T-BUT en ninguno de los grupos de estudio. Las dos condiciones más adversas (LH y LHP) de ambos estudios han provocado una tendencia a disminuir el T-BUT en todos los grupos de estudio. Estas diferencias han alcanzado la significación estadística para ambos grupos (controles y SOS leve-moderado) del estudio II y en ambas condiciones y en el caso del grupo de SOS severo del estudio I para la condición LHP coincidiendo con los resultados de otros autores (Abusharha y Pearce, 2012).

La reducción del T-BUT tras la exposición a las condiciones más adversas (LH y LHP del estudio II (Tabla 15), podría asociarse a la alteración en la película lagrimal provocada por la baja RH común a ambas condiciones ambientales (Wolkoff, 2008). Además, la reducción de la presión barométrica, como la asociada a grandes altitudes, aumenta la pérdida de agua por evaporación, al

igual que ocurre con el flujo de aire (Borchman y cols., 2009). Por lo tanto, la reducción encontrada de los valores de T-BUT en ambos grupos después de la exposición a la condición adversa (LHP) al analizar comparativamente la condición ST- Estudio I y la condición LHP- Estudio II fue un hecho esperado, al igual que la falta de cambios en el T-BUT después de la exposición a la condición ST, a pesar de que los participantes realizaban tareas de visión cercana bajo esta condición (Doughty, 2001).

Abelson y cols., (Abelson y cols., 2012b) encontraron en pacientes con SOS una mayor hiperemia y tinción corneal 90 minutos después de la exposición a una condición ambiental adversa, pero no en los valores de T-BUT, lo que les ha permitido identificar subpoblaciones de pacientes que se defienden de las condiciones ambientales mediante diferentes mecanismos, bien sea aumentando la frecuencia de parpadeo, disminuyendo la apertura palpebral o ambas simultáneamente.

En esta misma línea del efecto de la RH en los valores del T-BUT, en el estudio III observamos que la estabilidad de la película lagrimal presentada por los sujetos control de Braga fue significativamente mejor la de los sujetos control de Valladolid. Por lo tanto, parece que una mayor RH puede beneficiar los resultados del T-BUT al disminuir la evaporación, lo que redundaría en una mejora de la estabilidad de la PL (Wolkoff., 2008).

Tinción corneal (escala Oxford y escala de Baylor)

En el estudio I, la tinción corneal global (escala Oxford) aumentó de forma generalizada en todos los grupos de estudio después de la exposición a todas las condiciones ambientales de ambos estudios, alcanzando la significación estadística para todos los grupos (controles y SOS leve-moderado) y todas las

condiciones del estudio II, y en el estudio I únicamente en el grupo control bajo las condiciones ST y LH y el grupo de SOS severo bajo la condición de LHP.

Además de la evaluación de la tinción corneal de forma global, se utilizó una escala más detallada (escala de Baylor), para el análisis de la tinción corneal por sectores. Nuestros resultados muestran que en el estudio I, en la gran mayoría de los casos todos los individuos empeoraron después de la exposición a todas las condiciones ambientales aumentando el número de áreas afectadas significativamente.

Sorprendentemente, el grupo con SOS severo ha sido el que ha mostrado un menor número de áreas con aumento significativo de daño corneal. Este hecho se comprende mejor si se tiene en cuenta que la superficie ocular de estos pacientes se encontraba ya muy alterada y por lo tanto, las puntuaciones obtenidas en tinción corneal eran inicialmente mucho más altas y generalmente se encontraban en los límites superiores de las escalas utilizadas para su evaluación. Por ello, aunque existiera un empeoramiento de la tinción corneal después de la exposición a cualquiera de las condiciones ambientales, las escalas de valoración no permitieron valorar estos empeoramientos, situación que no ocurría al valorar cambios en la tinción corneal de los sujetos control o de los sujetos con SOS leve-moderado, que se encontraban inicialmente en valores mucho más bajos de las escalas de valoración antes de la exposición. Por ejemplo, en el caso del área inferior valorada con escala de Baylor en el estudio I, la mayoría de nuestros pacientes con SOS severo obtuvieron una puntuación de 4 antes de la exposición, no pudiendo obtener mayor puntuación tras la exposición debido a que el rango de la escala utilizado era de 0 a 4. Este hecho se ha valorado en la presente tesis como una limitación a la hora de reclutar pacientes con SOS graves en los ensayos clínicos.

Las regiones corneales más afectadas después de cada una de las exposiciones a las condiciones ambientales del estudio I fueron las áreas inferior, nasal y temporal (Tabla 10). En el estudio II observamos, con el análisis sectorial de Baylor, que fueron el área inferior y el área temporal los que obtuvieron un incremento significativo en todos los grupos y para todas las condiciones. Este hecho puede deberse a que la ruptura de la película lagrimal se produce en la mayor parte de las ocasiones en el área inferior (Himebaugh y cols., 2009). Estudios previos han reportado que la media de parpadeos completos (con cierre completo de los ojos) es sólo de alrededor de un 70% en visión lejana y cercana (Himebaugh y cols., 2009). Por lo tanto, no es sorprendente que el sector inferior mostrara el mayor daño epitelial ya que los sujetos se encontraban realizando una tarea cognitivamente exigente. Esto es consistente con los resultados del T-BUT, puesto que la observación de la ruptura de la película lagrimal por lo general se produce primero en la córnea inferior (Cho y cols., 1992; Himebaugh y cols., 2009), aumentando la probabilidad de encontrar tinción corneal en esta área. Las siguientes regiones más afectadas fueron la nasal y la temporal, por lo que la mayoría de los sujetos mostraron un patrón difuso de "tinción en sonrisa". Esto puede indicar que las áreas corneales expuestas durante un periodo de tiempo más largo a cualquier condición ambiental adversa, incluyendo nuestra condición ST, fueron las áreas que resultaron más perjudicadas.

En el análisis comparativo entre los dos estudios, podemos observar un aumento de la tinción corneal con fluoresceína en ambos grupos después de la exposición a la condición ST en algunas de las áreas valoradas con la escala Baylor modificada. El área más afectada en ambos grupos después de la exposición a la condición adversa fue el área corneal inferior. A pesar de que la tinción corneal aumentó en todas las áreas, el incremento significativo

de la confluencia de los puntos de tinción corneal sólo se encontró en el área inferior; lo que clínicamente refleja el grado de daño epitelial corneal (Tabery, 2003).

La tinción corneal en la región superior no sufrió variaciones en los individuos control y se incrementó ligeramente en los pacientes con SOS leve-moderado. Esto parece lógico, ya que las tareas visuales realizadas durante las exposiciones ambientales, especialmente durante la exposición a la condición adversa, están diseñadas para aumentar la exposición de la superficie ocular. Esto, unido al hecho de que el área corneal superior se encuentra más protegida por el párpado superior, parece indicar que las regiones corneales expuestas durante un mayor periodo de tiempo a las condiciones adversas fueron las que más negativamente se afectaron.

Otro hallazgo importante fue que el grupo control mostró un aumento significativo de la tinción corneal con fluoresceína, así como una disminución del T-BUT después de la exposición a la condición adversa, similar a los cambios que se produjeron en el grupo de SOS leve-moderado. Sin embargo, los sujetos control reportaron un mínimo malestar subjetivo en comparación con los pacientes con SOS. Este hecho evidencia aún más la débil relación existente entre los signos y los síntomas en esta patología (Begley y cols., 2003).

En el análisis comparativo entre las poblaciones de Braga y Valladolid, ambas presentaron cierto grado tanto de tinción corneal (en ambas escalas), así como de tinción conjuntival. Sin embargo, a pesar de encontrarse todos en niveles aceptados de normalidad en sujetos control (DEWS, 2007a), de nuevo los valores para estos tests estaban más incrementados en la población control de Valladolid respecto a la población de Braga, siendo significativas las

diferencias entre ambas poblaciones tanto para la tinción corneal como para la conjuntival. Estas diferencias en la tinción eran esperables debido a la relación ya mencionada anteriormente entre la estabilidad lagrimal y el daño corneal (Himebaugh y cols., 2009), por lo que es esperable que la población de Valladolid presentara valores de tinciones mayores al tener también niveles de T-BUT más disminuidos que la población control de Braga.

DE LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MOLÉCULAS EN LÁGRIMA

Hasta donde sabemos, no existen estudios publicados que reporten las variaciones en los tests de diagnóstico clínico y de las moléculas en lágrima ni en sujetos control ni en pacientes con SOS expuestos a un entorno adverso. Los valores basales de las moléculas analizadas en lágrima son constantes con los hallados previamente por nuestro grupo (Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010, Carreño y cols., 2010).

No se encontraron cambios en ninguno de los niveles de las moléculas analizadas en lágrima tras la exposición a la condición ST del estudio I, ni en el grupo control ni en los grupos de SOS. Sin embargo, sí los hubo para esta misma condición en el estudio II. En ambos estudios se produjeron cambios significativos en algunas moléculas para los distintos grupos de estudio después de someterse a las dos condiciones más adversas (LH y LHP).

Así, la concentración de EGF mostró una tendencia a disminuir después de la exposición a las condiciones LH y LHP en ambos grupos de SOS en el estudio I, alcanzando significación estadística para el grupo de SOS severo después de la condición LHP. En el estudio II, la concentración de EGF disminuye de forma generalizada en ambos grupos de estudio (controles y SOS leve-moderado), siendo significativa para el grupo control tras la exposición a todas las condiciones ambientales, y para el grupo de SOS leve-moderado después de la exposición a la condición LHP. El EGF es un factor de crecimiento secretado principalmente por las células epiteliales de las glándulas lagrimales (Imanishi y cols., 2000), por lo que estos descensos de EGF podrían estar relacionados con el incremento de la tinción corneal observada y que ha sido previamente descrita (Lam y cols., 2009; Enríquez-de-Salamanca y cols.,

2010; Pflugfelder y cols., 1999) y con una disminución del volumen lagrimal, como ya se ha indicado previamente (Lam y cols., 2009), observada en el descenso de los valores de PRTT después de la exposición de la superficie ocular a condiciones adversas (LH y LHP). En el primer estudio, la tinción corneal medida con la escala modificada de Baylor aumentó después de las condiciones más adversas (LH y LHP) en todos los individuos estudiados, mientras que EGF mostró una disminución, por lo que nuestros resultados concuerdan con estudios previos que reportaban la correlación negativa existente entre la concentración de EGF y la severidad del SOS (Lam y cols., 2009; Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010; Pflugfelder y cols., 1999).

En el análisis comparativo entre el estudio I y II, la concentración de EGF se redujo significativamente en ambos grupos cuando fueron expuestos a la condición adversa (LHP- estudio II). Lam y cols. (Lam y cols., 2009), propusieron que el EGF podía ser un indicador de la función de la glándula lagrimal, e incluso la disminución de los niveles de EGF en lágrima en pacientes con SOS ha sido reportada anteriormente (Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010; Lam y cols., 2009; Pflugfelder y cols., 1999). Así, la concentración de EGF se ha correlacionado positivamente con el test de Schirmer (Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010; Lam y cols., 2009) y el test de lisozima (Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010), para medir la producción lagrimal. De hecho, la medida de PRTT se redujo en ambos grupos después de la condición adversa (LHP- estudio II), aunque esta disminución fue significativa sólo para los pacientes con SOS leve-moderado. Por el contrario, la concentración de EGF se correlaciona negativamente con la severidad del SOS (Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010; Lam y cols., 2009; Pflugfelder y cols., 1999). Este hecho es similar al observado en los participantes de nuestro estudio bajo la condición adversa, ya que mostraron un empeoramiento tanto

general como localizado de la integridad de la córnea, que se correlaciona con la disminución de la concentración de EGF encontrada.

La IL-1Ra es una molécula que inhibe la actividad de las formas proinflamatorias de IL-1 por unión competitiva con los receptores tipo 1 de la IL-1 (Arend, 1993). Las concentraciones de IL-1Ra encontradas en ambos estudios fueron similares a las reportadas en estudios previos con pacientes con una media de edad comparable a la nuestra, obteniendo, en el caso concreto del estudio I, niveles más elevados los pacientes con SOS leve-moderado y con SOS severo (LaFrance y cols., 2008; Malvitte y cols., 2007; Solomon y cols., 2001). En el estudio I encontramos un aumento en los niveles de IL-1Ra en todos los grupos después de la exposición a todas las condiciones ambientales, siendo significativo para ambos grupos de SOS bajo la condición LH y para el grupo control después de la condición LHP. Este hecho podía ser esperable debido al aumento del daño corneal epitelial encontrado después de las exposiciones medido tanto con escala de Oxford como con la escala de Baylor modificada, y al papel antiinflamatorio con que se relaciona a IL-1Ra (Arend, 1993). Sin embargo, no observamos cambios significativos en la IL-1Ra en el estudio II para ninguno de los grupos estudiados ni bajo ninguna condición ambiental.

La IL-6 es una citoquina proinflamatoria que ya se ha descrito previamente elevada en pacientes con SOS (Lam y cols., 2009; Enríquez-de-Salamanca y cols., 2010; Boehm y cols., 2011), por lo que podría ser un biomarcador de actividad potencialmente útil para el SOS (Lam y cols., 2009). En el primer estudio, observamos niveles basales más elevados de IL-6 para el grupo de SOS severo (Figura 16B) en comparación con los otros dos grupos, y una tendencia a incrementar los niveles después de la exposición a todas las condiciones, siendo este incremento significativo para la condición LH. En

general, en el estudio II, la IL-6 incrementó sus valores tras todas las exposiciones, siendo este incremento significativo para ambas condiciones adversas (LH y LHP) excepto para el grupo SOS leve-moderado después de la condición LH, posiblemente debido a la gran variabilidad en los niveles pre-exposición que presentó este grupo. Si analizamos la comparativa entre ambos estudios, observamos que IL-6 aumentó significativamente en todos los individuos después de la exposición a la condición adversa (LHP- Estudio II), y se produjo un aumento de la tasa de detección después de la condición ST- Estudio I. El incremento de la concentración de IL-6 se encuentra de acuerdo con resultados previos de nuestro grupo (Enriquez-de-Salamanca y cols., 2010), que indicaban que IL-6 era una citoquina pro-inflamatoria primaria inducida por desecación (Higuchi y cols., 2011) o por estímulos inflamatorios (Enriquez-de-Salamanca y cols., 2008). Por ello, es posible que este incremento de IL-6 esté asociado al deterioro de la superficie ocular y de la integridad corneal (aumento de la tinción corneal) al incrementar la desecación de la película lagrimal (Higuchi y cols., 2011). Estos resultados in vivo también coinciden con los reportados previamente en condiciones experimentales realizadas in vitro (Enriquez-de-Salamanca y cols., 2008). Por lo tanto, nuestros hallazgos apoyan la idea de la IL-6 como un posible biomarcador del SOS, a pesar de que la tasa de detección en nuestro estudio fue no alcanzó el 100%.

CCL5/RANTES es un agente quimiotáctico que recluta células T, eosinófilos y basófilos durante los procesos de inflamación (Dairaghi y cols., 1998; Yasui y cols., 2003). Si bien las concentraciones que encontramos en el análisis comparativo entre ambos estudios (ST- Estudio I y LHP- Estudio II) fueron inferiores a las reportadas por otros autores, tanto en sujetos control como en pacientes de SOS leve-moderado (Lam y cols., 2009; Choi y cols., 2012),

éstas aumentaron significativamente en el grupo control después de la exposición a la condición adversa, lo que es consistente con el incremento en la tinción corneal encontrado después de dos horas de exposición a la condición adversa. En contraste, los niveles de CCL5/RANTES en pacientes con SOS leve-moderado no aumentaron después de la exposición a esta condición; sin embargo, el nivel de CCL5/RANTES pre-exposición para este grupo ya se encontraba elevado en comparación con los niveles del grupo control. Los altos niveles de CCL5/RANTES en las lágrimas de los pacientes con SOS se han reportado inversamente correlacionados con los niveles de T-BUT y la producción de lágrima basal (Choi y cols., 2012). La ausencia de diferencias entre los grupos, como se mencionó anteriormente, podría estar relacionada con los criterios de inclusión utilizados para la selección del grupo de SOS leve-moderado, así como por el hecho de que la gran mayoría de los pacientes estaban bajo tratamiento.

La MMP-9 promueve la degradación de la matriz extracelular corneal y la pérdida de células epiteliales y se encuentra incrementada en las lágrimas de pacientes con SOS (Acera y cols., 2008) y presentó una detección del 100% en ambos estudios. En el estudio I, la concentración en lágrima de MMP-9 aumentó, aunque no significativamente en ambos grupos de SOS después de la exposición a la condición LH. Además, los pacientes con SOS severo eran los que tenían niveles iniciales más elevados de MMP-9, por lo que nuestros resultados coinciden con los encontrados por Chotikavanich y cols., (Chotikavanich y cols., 2009), que reportaron no sólo un aumento de la actividad de MMP-9 en pacientes con SOS, sino también una correlación significativa entre esta molécula inflamatoria y una reducción del T-BUT, y la presencia de tinción corneal y conjuntival, de manera similar a los signos y síntomas que hemos encontrado en nuestros pacientes con SOS grave. En el

estudio II ambos grupos mostraron un incremento significativo global de la tinción corneal (escala Oxford) tras la exposición a todas las condiciones ambientales del estudio, al igual que lo fue el incremento de MMP-9 post-exposición, excepto en el grupo control para la condición LHP, por lo que podemos considerar la MMP-9 como la molécula más fiable para evaluar bioquímicamente el comportamiento de los sujetos incluidos. Estos resultados coinciden con estudios previos que han valorado la MMP-9 como un posible marcador inflamatorio en pacientes con SOS (Acera y cols., 2008; Chotikavanich y cols., 2009).

En resumen, en el estudio I, hemos demostrado que tanto los pacientes con SOS leve-moderado o severo, como las personas sanas de la misma edad, cuando se someten a diversas condiciones ambientales adversas, pueden mostrar signos de deterioro de la FLU relacionados con el SOS (aumento de la tinción corneal con fluoresceína, de la osmolaridad lagrimal, de la hiperemia conjuntival y disminución de la estabilidad y del volumen lagrimal). Además, hemos comprobado que estos signos van acompañados de una variación significativa en los niveles de algunas moléculas en lágrima (reducción de EGF e incremento de IL-1Ra y de IL-6). Hemos evidenciado que los pacientes con SOS severo no son buenos candidatos para este tipo de estudios, debido a que los valores basales que presentan se encuentran excesivamente alterados y muy cercanos a los valores extremos de las escalas de medida que se emplean en los tests diagnósticos de SOS. Este hecho provoca que no se puedan evaluar en ellos ni mejorías ni empeoramientos, a pesar de observarlo subjetivamente, al no tener escala suficiente para evaluarlo.

En el estudio II, se ha demostrado que tanto los pacientes con SOS leve-moderado, así como las personas sanas de la misma edad, cuando se someten a diversas condiciones ambientales en las que se encuentra presente flujo de aire, aumentan los signos de deterioro de la FLU relacionados con el SOS. Además, se ha demostrado que estos signos van acompañados de una mayor variación en los niveles de algunas moléculas en lágrima.

En el estudio III se ha demostrado que las condiciones ambientales a las que se encuentra expuesta habitualmente la superficie ocular se deben mayoritariamente al clima de la zona (Yao y cols., 2011; Yao y cols., 2011; Borchman y cols., 2009; DEWS, 2007a; Gupta y cols., 2008). Condiciones ambientales como la RH, la presión, el viento., etc. son factores ambientales conocidos que afectan a la superficie ocular expuesta a ellos y por lo tanto van a afectar en gran medida tanto los valores de los tests que empleamos en nuestras consultas para el diagnóstico de patologías como el SOS, como la sintomatología que los sujetos presenten.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han conseguido recrear seis condiciones ambientales en la cámara de ambiente controlado del IOBA-CERLab que han provocado, en un tiempo de 2 hr, cambios LFU de, no solo pacientes con SOS, sino también en sujetos normales. Estos ambientes simularon el clima mediterráneo templado de la ciudad donde se encuentra dicha instalación (Valladolid), un ambiente en un clima similar al anterior pero más seco, como el que podría existir en un edificio moderno y el existente en una cabina de avión en vuelo a 2500 m de altitud.
2. Según las características de los seis ambientes analizados, podrán seleccionarse uno de ellos o diversas combinaciones, según el tipo de hipótesis que se pretenda demostrar en futuros estudios o ensayos clínicos terapéuticos. Podrán, por ejemplo, recrearse los siguientes ambientes:
 - 2.1. El ambiente habitual de una determinada área geográfica, pudiendo alcanzar RH bajas y/o altitudes elevadas (presiones atmosféricas bajas).
 - 2.2. Un ambiente que recree las condiciones de trabajo en un edificio moderno, donde la temperatura adecuada se logra mediante flujo de aire y que, por lo tanto, exponen al individuo a, no sólo bajas

RH, sino a flujos de aire cercanos a la cara. Este estudio ha demostrado que una RH baja empeora el estado de la FLU y que la introducción de flujo de aire cercano a la cara amplía considerablemente dichos cambios.

- 2.3. Un cambio de ambiente repentino, pasando a unas condiciones de baja RH y flujo de aire, simula las condiciones repentinas a las que se enfrenta un individuo que, por ejemplo, entra en un centro comercial o en un vehículo con aire acondicionado, pudiendo recrearse así los empeoramientos repentinos que muchos pacientes reportan en estas condiciones y su posible neutralización con el uso de determinadas medidas preventivas.
- 2.4. Un ambiente que simule las condiciones que inevitablemente deben existir en las cabinas de los aviones comerciales en vuelo, y que han provocado cambios interesantes en la LFU en solo 2 hr. Estos hallazgos abren una vía interesante para ensayar de las medidas terapéuticas dirigidas a la protección de la superficie ocular de los sujetos que han de viajar frecuentemente.
- 2.5. Podrá simularse también la tarea visual a realizar, sabiendo que la visualización de un monitor por encima del nivel ocular es la que parece provocar cambios mayores.

3. Sometiendo a pacientes con SOS leve-moderado a diversas condiciones ambientales, principalmente baja RH y flujo de aire, puede lograrse que aumente la intensidad de sus signos clínicos al nivel requerido para catalogar a un paciente de severo. Este hecho evitaría tener que reclutar a pacientes con SOS grave para ensayos clínicos, ya que estos pacientes son más escasos y el daño que presentan es más difícilmente reversible en el tiempo con el que se cuenta en un ensayo clínico.
4. El estudio realizado con individuos sanos en dos ciudades con niveles medios de humedad significativamente diferentes, ha demostrado que los valores de los tests diagnósticos usados en el SOS ofrecen valores basales diferentes. Este hallazgo subraya la importancia de estandarizar el ambiente en el que se realicen ensayos clínicos multicéntricos, lo que presumiblemente minimizaría las diferencias inter-centro que suelen observarse y que, en definitiva, dificulta la demostración de significación estadística y contribuyen al fracaso de ensayos clínicos terapéuticos en SOS que se anticipaban como exitosos en estudios pilotos unicéntricos.
5. Se ha conseguido definir y testar un protocolo de evaluación diagnóstico encaminado a detectar cambios en la LFU de los pacientes con SOS y en los sujetos normales tras haber permanecido durante 2 hr en diversas condiciones ambientales. Este protocolo, de 40 minutos de duración, incluye un cuestionario de sintomatología, ocho tests clínicos y recogida

- de lágrima para una ulterior medición de moléculas inflamatorias y, contando con dos examinadores, permite evaluar a la vez a cuatro sujetos de forma consecutiva. A partir de este protocolo general, se pondrán seleccionar en el futuro los tests diagnósticos que han proporcionado un mayor rendimiento, según se desee evaluar individuos sanos o pacientes con SOS y, además, según la gravedad de estos últimos.
6. Finalmente, se ha demostrado la importancia de la determinación de diversas moléculas en la lágrima como potenciales biomarcadores de activación inflamatoria, ya que sus niveles han variado tras la exposición a determinados ambientes. Entre estas moléculas, destaca la MMP-9, corroborando así los hallazgos de otros autores.

FUTURAS LÍNEAS

de investigación

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

El SOS es uno de los problemas oculares más comunes en la población (Schaumberg y cols., 2003), pero existe una falta de consenso a nivel internacional en los criterios de corte de los test diagnósticos (DEWS, 2007a). Además, la falta de correlación existente entre los síntomas y signos de la superficie ocular debida a las condiciones ambientales y su interferencia con la validez y reproducibilidad de los ensayos clínicos es un problema bien conocido en la patología de SOS (Hay y cols., 1998; Schein y cols., 1997; Bjerrum., 1996; Moore y cols., 2009).

El propósito de este estudio ha sido evaluar los efectos inducidos por diversas condiciones ambientales recreadas en la cámara de ambiente controlado IOBA-CERLab en los tests diagnósticos de SOS en tres poblaciones de estudio; sujetos control, pacientes con SOS leve-moderado y pacientes con SOS severo. Se ha demostrado que las diferentes condiciones ambientales adversas recreadas durante 2 horas dentro de la cámara ambiental del IOBA-CERLab han sido capaces de desencadenar cambios funcionales de la LFU, no sólo en pacientes con SOS leve-moderado y/o severo, sino también en sujetos control. Además, la introducción de un flujo de aire localizado simulando los modelos de estudios llevados a cabo por otros grupos produjo un empeoramiento de la superficie ocular de forma independiente a la baja RH y la presión atmosférica en todos los grupos de estudio. Complementariamente a estos estudios, el análisis comparativo realizado entre los sujetos control de dos poblaciones diferentes (Valladolid, España y Braga, Portugal), ha permitido evidenciar que los valores de los tests diagnósticos de SOS pueden variar y alterarse dependiendo de las condiciones ambientales de cada

localización geográfica, lo que aumenta la importancia de la utilización de cámaras ambientales para el control de la influencia de estos parámetros.

Por ello, las cámaras de ambiente controlado como IOBA-CERLab nos permitirán:

- Estandarizar los tests diagnósticos así como definir los criterios de corte de los mismos.
- Evaluar y desarrollar nuevas tecnologías y/o terapias diagnósticas sin que los factores ambientales influyan en los resultados.
- Validar, en condiciones ambientales controladas, biomarcadores ya definidos.
- Desenmascarar enfermedades de base inflamatoria de la superficie ocular o en el límite de inflamación.
- Mejorar el diseño de los ensayos clínicos (outcome endpoints).
- Evaluar de manera más correcta la correlación entre síntomas y signos.
- Evaluar el efecto del ambiente en superficies oculares con tratamientos crónicos (ej. SOS, glaucoma...), usuarios de lentes de contacto, pacientes candidatos y/o sometidos a cirugía refractiva,...
- Evaluar y desarrollar nuevos tratamientos y terapias para patologías como el SOS.
- Determinar si una intervención terapéutica rápida, podría prevenir o revertir la progresión de la enfermedad de SOS.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abelson R, Lane KJ, Angjeli E, et al. Measurement of ocular surface protection under natural blink conditions. *Clin Ophthalmol*. 2011;5:1349-1357.
- Abelson R, Lane KJ, Rodriguez J, et al. A single-center study evaluating the effect of the controlled adverse environment (CAE(SM)) model on tear film stability. *Clin Ophthalmol* 2012b;6:1865-1872.
- Abelson R, Lane KJ, Rodriguez J, et al. Validation and verification of the OPI 2.0 System. *Clin Ophthalmol* 2012a;6:613-622.
- Abusharha AA, Pearce EI. The Effect of Low Humidity on the Human Tear Film. *Cornea* 2012 Sep 27. [Epub ahead of print]
- Acera A, Rocha G, Vecino E, et al. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res* 2008;40:315-321.
- Acosta CM, Gallar J, Belmonte C. The influence of eye solutions on blinking and ocular comfort at rest and during work at video display terminals. *Exp Eye Res* 1999;68:663–669.
- Adatia FA, Michaeli-Cohen A, Naor J, et al. Correlation between corneal sensitivity, subjective dry eye symptoms and corneal staining in Sjogren's syndrome. *Can J Ophthalmol* 2004;39:767-771.

-
- Afonso AA, Monroy D, Stern ME, et al. Correlation of tear fluorescein clearance and Schirmer test scores with ocular irritation symptoms. *Ophthalmology* 1999;106:803-810.
 - Aitken RC. Measurement of feelings using visual analogue scales. *Proc R Soc Med* 1969;62:989-993.
 - Andersen I, Lundqvist GR, Jensen PL, et al. Human response to 78-hour exposure to dry air. *Arch Environ Health* 1974;29:319-324.
 - Andersen I, Lundqvist GR, Molhave L, et al. Human response to controlled levels of toluene in six-hour exposures. *Scand J Work Environ Health* 1983;9:405-418.
 - Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54:167–223.
 - Arita R, Itoh K, Maeda S, et al. Proposed diagnostic criteria for obstructive meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology* 2009;116:2058-2063.
 - Arundel AV, Sterling EM, Biggin JH, et al. Indirect health effects of relative humidity in indoor environments. *Environ Health Perspect* 1986;65:351-361.
 - Backman H, Haghighat F. Indoor-air quality and ocular discomfort. *J Am Optom Assoc* 1999;70:309–316.
 - Bacman S, Berra A, Sterin-Borda L, et al. Muscarinic acetylcholine receptor antibodies as a new marker of dry eye Sjögren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:321-327.

-
- Badorrek P, Dick M, Emmert L, et al. Pollen starch granules in bronchial inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2012;109:208-214.
 - Badorrek P, Dick M, Hecker H, et al. Anti-allergic drug testing in an environmental challenge chamber is suitable both in and out of the relevant pollen season. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011;106:336-341.
 - Badorrek P, Dick M, Schauerte A, et al. A combination of cetirizine and pseudoephedrine has therapeutic benefits when compared to single drug treatment in allergic rhinitis. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47:71-77. Erratum in: *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009;47:222.
 - Baird JC, Berglund B, Esfandabad HS. Longitudinal assessment of sensory reactions in eyes and upper airways of staff in a sick building. *Environ Int* 1994;20:141–160.
 - Barber LD, Pflugfelder SC, Tauber J, et al. Phase III safety evaluation of cyclosporine 0.1% ophthalmic emulsion administered twice daily to dry eye disease patients for up to 3 years. *Ophthalmol* 2005;112:1790-1794.
 - Battat L, Macri A, Dursun D, et al. Effects of laser in situ keratomileusis on tear production, clearance, and the ocular surface. *Ophthalmology* 2001;108:1230-1235.
 - Baudouin C, Bourcier T, Brignole F, et al. Correlation between tear IgE levels and HLA-DR expression by conjunctival cells in allergic and nonallergic chronic conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:900-4.

- Baum JL. Evaporative dry eye--signs and symptoms don't mesh--and other thoughts. *Ophthalmology* 2010;117:1285-1286.
- Begley CG, Caffery B, Chalmers RL, et al. Use of dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye. *Cornea* 2002;21:664-670.
- Begley CG, Chalmers RL, Abetz L, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4753-4761.
- Begley CG, Chalmers RL, Mitchell GL, et al. Characterization of ocular surface symptoms from optometric practices in North America. *Cornea* 2001;20:610-618.
- Behrens A, Doyle JJ, Stern L, et al. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea* 2006;25:900-907.
- Belmonte C, Gallar J. Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3888-3892.
- Berkowitz RB, Braker S, Lutz C, et al. Efficacy of fexofenadine in the prophylactic control of cat allergen-induced allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006a;96:327-333.
- Berkowitz RB, McCafferty F, Lutz C, et al. Fexofenadine HCl 60 mg/pseudoephedrine HCl 120 mg has a 60-minute onset of action in the

treatment of seasonal allergic rhinitis symptoms, as assessed in an allergen exposure unit. *Allergy Asthma Proc* 2004;25:335-343.

- Berkowitz RB, McCafferty F, Lutz C, et al. Onset of action of fexofenadine hydrochloride 60 mg/pseudoephedrine hydrochloride 120 mg in subjects aged 12 years with moderate to severe seasonal allergic rhinitis: a pooled analysis of two single-dose, randomized, double-blind, placebo-controlled allergen exposure unit studies. *Clin Ther* 2006b;28:1658-1669.
- Berkowitz RB, Woodworth GG, Lutz C, et al. Onset of action, efficacy, and safety of fexofenadine 60 mg/pseudoephedrine 120 mg versus placebo in the Atlanta allergen exposure unit. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;89:38-45.
- Biller H, Holz O, Windt H, et al. Breath profiles by electronic nose correlate with systemic markers but not ozone response. *Respir Med* 2011;105:1352-1363.
- Bjerrum KB. Test and symptoms in keratoconjunctivitis sicca and their correlation. *Acta Ophthalmol Scand* 1996;74:436-441.
- Blehm C, Vishnu S, Khattak A, et al. Computer vision syndrome: a review. *Surv Ophthalmol* 2005;50:253-262.
- Bluysen PM, De Oliveira Fernandes E, Groes L, et al. European indoor air quality audit project in 56 office buildings. *Indoor Air* 1996;6:221-238.

-
- Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, et al. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7725-7730.
 - Borchman D, Foulks GN, Yappert MC, et al. Factors affecting evaporation rates of tear film components measured in vitro. *Eye Contact Lens* 2009;35:32-37.
 - Borchman D, Foulks GN, Yappert MC, et al. Temperature-induced conformation changes in human tear lipids hydrocarbon chains. *Biopolymers* 2007;87:124–133.
 - Bourbeau J, Brisson C, Allaire S. Prevalence of the sick building syndrome symptoms in office workers before and six months and three years after being exposed to a building with an improved ventilation system. *Occup Environ Med* 1997;54:49-53.
 - Bourcier T, Acosta MC, Borderie V, et al. Decreased Corneal Sensitivity in Patients with Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2341-2345.
 - Brewitt H, Sistani F. Dry eye disease: the scale of the problem. *Surv Ophthalmol* 2001;45:S199-S202.
 - Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 2004;78:347–360.
 - Bron AJ. Diagnosis of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;S221-S226.
 - Bron AJ. The Doyne Lecture. Reflections on the tears. *Eye (Lond)* 1997;11 (Pt 5):583-602.

-
- Bukhari A, Ajlan R, Alsaggaf H. Prevalence of dry eye in the normal population in Jeddah, Saudi Arabia. *Orbit* 2009;28:392-397.
 - Calonge Cano, G. “Las condiciones climáticas de Castilla y León. Un clima Mediterráneo-Frío”. En: Geografía de Castilla y León. Capítulo 2º, Tomo III. Manero Miguel F, Cabo Alonso A. 1988;45-75. Ed. Ámbito. Valladolid.
 - Calonge M. The treatment of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45:S227-S239.
 - Carreno E, Enriquez-de-Salamanca A, Teson M, et al. Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmol* 2010;88:e250-e258.
 - Chalmers RL, Begley CG, Edrington T, et al. The agreement between self-assessment and clinician assessment of dry eye severity. *Cornea* 2005;24:804–810.
 - Cho P, Brown B, Chan I, et al. Reliability of the tear break-up time technique of assessing tear stability and the locations of the tear break-up in Hong Kong Chinese. *Optom Vis Sci* 1992;69:879-885.
 - Cho YK, Huang W, Kim GY, et al. Comparison of Autologous Serum Eye Drops With Different Diluents. *Curr Eye Res* 2013;38:9-17.
 - Choi W, Li Z, Oh HJ, et al. Expression of CCR5 and its ligands CCL3, -4, and -5 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye disease. *Curr Eye Res* 2012;37:12-17.
 - Chotikavanich S, de Paiva CS, Li de Q, et al. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in

dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3203-3209.

- Collins M, Seeto R, Campbell L, Ross M. Blinking and corneal sensitivity. *Acta Ophthalmol* 1989;67:525–531.
- Comitee on Airliner Cabin Air Quality NRC. The airliner cabin environment: *Air Quality and Safety*. In: Washington DC: National Academy Press; 1986.
- Craig JP, Tomlinson A. Importance if the lipid layer in human tear film stability and evaporation. *Optom Vis Sci* 1997;74:8–13.
- Craig JP. Structure and function of thepreocular tear film. *The Tear Film: Structure, Function and Clinical Examination*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2002. p.18–50.
- Cross WD, Lay LF Jr, Walt JG, et al. Clinical and economic implications of topical cyclosporin A for the treatment of dry eye. *Manag Care Interface* 2002;15:44-49.
- Cuevas M, González-García MJ, Castellanos E, Quispaya R, Parra Pde L, Fernández I, Calonge M. Correlations among symptoms, signs, and clinical tests in evaporative-type dry eye disease caused by Meibomian gland dysfunction (MGD). *Curr Eye Res* 2012;37:855-863.
- Dairaghi DJ, Soo KS, Oldham ER, et al. RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression. *J Immunol* 1998;160:426-433.
- Day JH, Briscoe M, Rafeiro E, et al. Comparative onset of action and symptom relief with cetirizine, loratadine, or placebo in an

environmental exposure unit in subjects with seasonal allergic rhinitis: confirmation of a test system. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;87:474-481.

- Day JH, Briscoe M, Widlitz MD. Cetirizine, loratadine, or placebo in subjects with seasonal allergic rhinitis: effects after controlled ragweed pollen challenge in an environmental exposure unit. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:638-645.
- Day JH, Briscoe MP, Clark RH, et al. Onset of action and efficacy of terfenadine, astemizole, cetirizine, and loratadine for the relief of symptoms of allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997b;79:163-172.
- Day JH, Briscoe MP, Rafeiro E, et al. Comparative clinical efficacy, onset and duration of action of levocetirizine and desloratadine for symptoms of seasonal allergic rhinitis in subjects evaluated in the Environmental Exposure Unit (EEU). *Int J Clin Pract* 2004a;58:109-118.
- Day JH, Briscoe MP, Rafeiro E, et al. Comparative efficacy of cetirizine and fexofenadine for seasonal allergic rhinitis, 5-12 hours postdose, in the environmental exposure unit. *Allergy Asthma Proc* 2005;26:275-282.
- Day JH, Briscoe MP, Rafeiro E, et al. Onset of action of intranasal budesonide (Rhinocort aqua) in seasonal allergic rhinitis studied in a controlled exposure model. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:489-494.
- Day JH, Briscoe MP, Rafeiro E, et al. Randomized double-blind comparison of cetirizine and fexofenadine after pollen challenge in the

Environmental Exposure Unit: duration of effect in subjects with seasonal allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 2004b;25:59-68.

- Day JH, Briscoe MP, Ratz JD, et al. Efficacy of loratadine-montelukast on nasal congestion in patients with seasonal allergic rhinitis in an environmental exposure unit. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009a;102:328-338.
- Day JH, Briscoe MP, Ratz JD, et al. Onset of action of loratadine/montelukast in seasonal allergic rhinitis subjects exposed to ragweed pollen in the Environmental Exposure Unit. *Allergy Asthma Proc* 2009b;30:270-276.
- Day JH, Briscoe MP, Welsh A, et al. Onset of action, efficacy, and safety of a single dose of fexofenadine hydrochloride for ragweed allergy using an environmental exposure unit. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997a;79:533-540.
- Day JH, Briscoe MP. Environmental exposure unit: a system to test anti-allergic treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:83-89.
- Day JH, Buckeridge DL, Clark RH, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, controlled antigen delivery study of the onset of action of aerosolized triamcinolone acetonide nasal spray in subjects with ragweed-induced allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:1050-1057.
- Day JH, Horak F, Briscoe M, et al. The role of allergen challenge chambers in the evaluation of anti-allergic medication: an international consensus paper. *Clinical and Experimental Allergy Reviews* 2006;6:31-59.

- de Campos AM, Sánchez A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int J Pharm* 2001;224:159-168.
- de Paiva CS, Lindsey JL, Pflugfelder SC. Assessing the severity of keratitis sicca with videokeratographic indices. *Ophthalmology* 2003;110:1102-1109.
- Devillier P, Le Gall M, Horak F. The allergen challenge chamber: a valuable tool for optimizing the clinical development of pollen immunotherapy. *Allergy* 2011;66:163-169.
- DEWS. Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007c). *Ocul Surf* 2007;5:108-152.
- DEWS. Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007d) *Ocul Surf* 2007;5:179–193.
- DEWS. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye WorkShop (2007a). *Ocul Surf* 2007;5:75–92.
- DEWS. The epidemiology of dry eye disease: Report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye Workshop (2007b). *Ocul Surface*. 2007;5:93–107.
- Dilly PN. Structure and function of the tear film. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:239-247.

- Dinslage S, Stoffel W, Diestelhorst M, et al. Tolerability and safety of two new preservative-free tear film substitutes. *Cornea* 2002;21:352-355.
- Dogru M, Stern ME, Smith JA, et al. Changing trends in the definition and diagnosis of dry eyes. *Am J Ophthalmol* 2005;140:507-508.
- Donovan JP, Buckeridge DL, Briscoe MP, et al. Efficacy of immunotherapy to ragweed antigen tested by controlled antigen exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:74-80.
- Dougherty JM, McCulley JP, Silvany RE, et al. The role of tetracycline in chronic blepharitis. Inhibition of lipase production in staphylococci. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2970-2975.
- Doughty MJ, Fonn D, Richter D, et al. A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients presenting to optometric practices across Canada. *Optom Vis Sci* 1997;74:624-631.
- Doughty MJ. Consideration of three types of spontaneous eyeblink activity in normal humans: during reading and video display terminal use, in primary gaze, and while in conversation. *Optom Vis Sci* 2001;78:712-725.
- Driver PJ, Lemp ML. Meibomian gland dysfunction. *Surv Ophthalmol* 1996;40:343-367.
- Drosos AA, Skopouli FN, Costopoulos JS, et al. Cyclosporin A (CyA) in primary Sjögren's syndrome: a double-blind study. *Ann Rheum Dis* 1986;45:732-735.

- Dursun D, Wang M, Monroy D, et al. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:632-638.
- Efron N. Grading scales for contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998;18:182-186.
- Ellis AK, Day JH, Lundie MJ. Impact on quality of life during an allergen challenge research trial. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:33-39.
- Ellis AK, Rafeiro E, Day JH. Quality of life indices may be predictive of placebo and medication response to treatment for allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:393-396.
- Ellis AK, Ratz JD, Day AG, et al. Factors that affect the allergic rhinitis response to ragweed allergen exposure. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104:293-298.
- Enomoto T, Ide T, Ogino S. Construction of an environmental exposure unit and investigation of the effects of cetirizine hydrochloride on symptoms of cedar pollinosis in Japan. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2007;17:173-181.
- Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, et al. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine* 2008;44:160-167.
- Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862-873.

-
- Eperjesi F, Aujla M, Bartlett H. Reproducibility and repeatability of the OcuSense TearLab osmometer. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012.
 - Erdem U, Ozdegirmenci O, Sobaci E, et al. Dry eye in post – menopausal women using hormone replacement therapy. *Maturitas* 2007;56:257-262.
 - Erpenbeck VJ, Hagenberg A, Krentel H, et al. Regulation of GATA-3, c-maf and T-bet mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells and bronchial biopsies after segmental allergen challenge. *Int Arch Allergy Immunol* 2006b;139:306-316.
 - Erpenbeck VJ, Schmidt R, Günther A, et al. Surfactant protein levels in bronchoalveolar lavage after segmental allergen challenge in patients with asthma. *Allergy* 2006a;61:598-604.
 - Farris RL, Stuchell RN, Mandel ID. Tear osmolarity variation in the dry eye. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1986;84:250-268.
 - Federal Aviation Administration. Aeronautics and Space. In: U.S Government printing office, ed. Code of Federal Aviation Regulations. Washington D.C: 1996:1-59.
 - Fleiss JL. The design and analysis of clinical experiments. New York: Wiley; 1986.
 - Foulks GN. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2007;52:369–374.

- Fox RI, Chan R, Michelson JB, et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum* 1984;27:459-461.
- Fox RI, Michelson P. Approaches to the treatment of Sjögren's syndrome. *J Rheumatol Suppl* 2000;61:15-21.
- Franck C, Bach E, Skov P. Prevalence of objective eye manifestations in people working in office buildings with different prevalences of the sick building syndrome compared with the general population. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;65:65-69.
- Franck C, Skov P. Foam at inner eye canthus in office workers, compared with an average Danish population as control group. *Acta Ophthalmol* 1989;67:61-68.
- Franck C. Eye symptoms and signs in buildings with indoor climate problems ('office eye syndrome'). *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1986;64:306-311.
- Franck C. Fatty layer of the precorneal film in the 'office eye syndrome'. *Acta Ophthalmol* 1991;69:737-743.
- Fujihara T, et al. INS365 suppresses loss of corneal epithelial integrity by secretion of mucin-like glycoprotein in a rabbit short-term dry eye model. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002;18:363-370.
- Gao J, Schwalb TA, Addeo JV, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical cyclosporin A therapy. *Cornea* 1998;17:654-663.

- Gilbard JP, Farris RL. Tear osmolarity and ocular surface disease in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1979;97:1642-1646.
- Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Ophthalmic solutions, the ocular surface, and a unique therapeutic artificial tear formulation. *Am J Ophthalmol* 1989;107:348-355.
- Gilbard JP. Human tear film electrolyte concentrations in health and dry-eye disease. *Int Ophthalmol Clin* 1994;34:27-36.
- Golding TR, Bruce AS, Mainstone JC. Relationship between tear-meniscus parameters and tear-film breakup. *Cornea* 1997;16:649-661.
- Gonzalez-Garcia MJ, Gonzalez-Saiz A, de la Fuente B, et al. Exposure to a controlled adverse environment impairs the ocular surface of subjects with minimally symptomatic dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4026-4032.
- Goto E, Shimazaki J, Monden Y, et al. Low-concentration homogenized castor oil eye drops for noninflamed obstructive meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology*, 2002b;109:2030-2035.
- Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y, et al. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol* 2002a;133:181-186.
- Goto T, Zheng X, Klyce SD, et al. A new method for tear film stability using videokeratography. *Am J Ophthalmol* 2003;135:607-612.
- Gowrisankaran S, Sheedy JE, Hayes JR. Eyelid squint response to asthenopia-inducing conditions. *Optom Vis Sci* 2007;84:611-619.

-
- Gunduz K, Ozdemir O. Topical cyclosporin treatment of keratoconjunctivitis sicca in secondary Sjögren's syndrome. *Acta Ophthalmol* 1994;72:438-442.
 - Gupta N, Prasad I, Himashree G, et al. Prevalence of dry eye at high altitude: a case controlled comparative study. *High Alt Med Biol* 2008;9:327-334.
 - Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, et al. Bepotastine besilate OD tablets suppress nasal symptoms caused by Japanese cedar pollen exposure in an artificial exposure chamber (OHIO Chamber). *Expert Opin Pharmacother* 2009a;10:523-529.
 - Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, et al. Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (OHIO Chamber). *Allergol Int* 2007;56:125-130.
 - Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, et al. Validation study of the OHIO Chamber in patients with Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2009b;149:141-149.
 - Hay EM, Thomas E, Pal B, et al. Weak association between subjective symptoms or and objective testing for dry eyes and dry mouth: results from a population based study. *Ann Rheum Dis* 1998;57:20-24.
 - He Y, Li X, Bao Y, et al. The correlation of polymorphism of estrogen receptor gene to dry eye syndrome in postmenopausal women. *Yan Ke Xue Bao* 2006;22:233-236.
 - Hedge A, Erickson A, Rubin G. Predicting sick building syndrome at the individual and aggregate levels. *Environ Int* 1996;22:3-19.

- Heigle TJ, Pflugfelder SC. Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis. *Cornea* 1996;15:135-138.
- Herreras JM, Perez S, Perez H, et al. Influence of topical anesthesia on tests diagnostic of blepharitis-associated dry eye syndrome. *Oc Immunol Inflamm* 1997;5:33-41.
- Higuchi A, Kawakita T, Tsubota K. IL-6 induction in desiccated corneal epithelium in vitro and in vivo. *Mol Vis* 2011;17:2400-2406.
- Himebaugh NL, Begley CG, Bradley A, et al. Blinking and tear break-up during four visual tasks. *Optom Vis Sci* 2009;86:106-114.
- Hinninghofen H, Enck P. Passenger well-being in airplanes. *Auton Neurosci* 2006;129: 80–85.
- Hodgson M. Indoor environmental exposure and symptoms. *Environ Health Perspec* 2002;110:663–667.
- Hodgson M. The sick-building syndrome. *Occup Med* 1995;10:167-175.
- Hohlfeld JM, Holland-Letz T, Larbig M, et al. Diagnostic value of outcome measures following allergen exposure in an environmental challenge chamber compared with natural conditions. *Clin Exp Allergy* 2010;40:998-1006.
- Holly F, Lemp MA. Formation and rupture of the tear film. *Exp Eye Res* 1973;15:515-525.
- Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol* 1977;22:69-87.

- Horak F, Berger U, Menapace R, et al. Quantification of conjunctival vascular reaction by digital imaging. *J Allergy Clin Immunol* 1996a;98:495-500.
- Horak F, Berger UE, Menapace R, et al. Dose-dependent protection by azelastine eye drops against pollen-induced allergic conjunctivitis. A double-blind, placebo-controlled study. *Arzneimittelforschung* 1998c;48:379-384.
- Horak F, Jaeger S, Worm M, et al. Implementation of pre-seasonal sublingual immunotherapy with a five-grass pollen tablet during optimal dosage assessment. *Clin Exp Allergy* 2009a;39:394-400.
- Horak F, Jager S, Berger U, et al. Controlled exposure to mite allergen for a dose-finding of dimethindene maleate (DMM). *Agents Actions* 1994b;41:C124-C126.
- Horak F, Jager S, Berger U. Onset and duration of the effects of three antihistamines in current use--astemizole, loratadine and terfenadine forte--studied during prolonged, controlled allergen challenges in volunteers. *J Int Med Res* 1992;20:422-434.
- Horak F, Jager S, Nimberger G, et al. Pharmacodynamic dose finding of dimetindene in a sustained release formulation. *Arzneimittelforschung* 1993a;43:1193-1195.
- Horak F, Jager S, Toth J, et al. Efficacy and tolerability of astemizole-D and Loratadine-D during prolonged, controlled allergen challenge in the Vienna Challenge Chamber. *Arzneimittelforschung* 1996b;46:1077-1081.

-
- Horak F, Jager S. Astemizole, terfenadine and loratadine during long-term allergen challenge in the Vienna Challenge Chamber. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1991;87:152.
 - Horak F, Jager S. The Vienna challenge chamber - a new method of allergy exposure tests. *Wien Klin Wochenschr* 1987;99:509-510.
 - Horak F, Jager S. VCC- Vienna Challenge Chamber- the protective effects of Astemizole. *Allergy* 1988;43:110.
 - Horak F, Stubner P, Berger UE, et al. Immunotherapy with sublingual birch pollen extract. A short-term double-blind placebo study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1998b;8:165-171.
 - Horak F, Stubner P, Zieglmayer R, et al. Controlled comparison of the efficacy and safety of cetirizine 10 mg o.d. and fexofenadine 120 mg o.d. in reducing symptoms of seasonal allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;125:73-79.
 - Horak F, Stubner P, Zieglmayer R, et al. Onset and duration of action of ketotifen 0.025% and emedastine 0.05% in seasonal allergic conjunctivitis: efficacy after repeated pollen challenges in the vienna challenge chamber. *Clin Drug Investig* 2003b;23:329-337.
 - Horak F, Stubner P. Descongestant activity of desloratadine in controlled-allergen exposure trials. *Clin Drug Investig* 2002:13-20.
 - Horak F, Stubner PU, Zieglmayer PU, et al. Comparison of the effects of desloratadine 5-mg daily and placebo on nasal airflow and seasonal allergic rhinitis symptoms induced by grass pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 2003c:956-961.

-
- Horak F, Stubner UP, Zieglmayer R, et al. Effect of desloratadine versus placebo on nasal airflow and subjective measures of nasal obstruction in subjects with grass pollen-induced allergic rhinitis in an allergen-exposure unit. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:956-961.
 - Horak F, Stuebner P, Zieglmayer R, et al. Efficacy and safety of ketotifen eye drops as adjunctive therapy to mometasone nasal spray in subjects with seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *Clin Drug Investig* 2003a;23:597-604.
 - Horak F, Toth J, Hirschwehr R, et al. Effect of continuous allergen challenge on clinical symptoms and mediator release in dust-mite-allergic patients. *Allergy* 1998d;53:68-72.
 - Horak F, Toth J, Jager S, et al. Effects of H1-receptor antagonists on nasal obstruction in atopic patients. *Allergy* 1993b;48:226-229.
 - Horak F, Toth J, Marks B, et al. Efficacy and safety relative to placebo of an oral formulation of cetirizine and sustained-release pseudoephedrine in the management of nasal congestion. *Allergy* 1998a;53:849-856.
 - Horak F, Unkauf M, Beckers C, et al. Efficacy and tolerability of intranasally applied dimetindene maleate solution versus placebo in the treatment of seasonal allergic rhinitis. *Arzneimittelforschung* 2000;50:1099-1105.
 - Horak F, Zieglmayer P, Zieglmayer R, et al. A placebo-controlled study of the nasal decongestant effect of phenylephrine and pseudoephedrine in the Vienna Challenge Chamber. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2009b;102:116-120.

- Horak F, Zieglmayer P, Zieglmayer R, et al. Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol* 2009c;124:471-477.
- Horak F, Zieglmayer P, Zieglmayer R, et al. Onset of action of loratadine/montelukast in seasonal allergic rhinitis patients exposed to grass pollen. *Arzneimittelforschung*. 2010b;60:249-255.
- Horak F, Zieglmayer P, Zieglmayer R, et al. The CRTH2 antagonist OC000459 reduces nasal and ocular symptoms in allergic subjects exposed to grass pollen, a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Allergy* 2012 [Epub ahead of print]
- Horak F, Zieglmayer P, Zieglmayer R, et al. The effects of bilastine compared with cetirizine, fexofenadine, and placebo on allergen-induced nasal and ocular symptoms in patients exposed to aeroallergen in the Vienna Challenge Chamber. *Inflamm Res* 2010a;59:391-398.
- Horak F, Zieglmayer PU, Zieglmayer R, et al. Levocetirizine has a longer duration of action on improving total nasal symptoms score than fexofenadine after single administration. *Br J Clin Pharmacol* 2005;60:24-31.
- Horak F, Zieglmayer UP, Zieglmayer R, et al. Azelastine nasal spray and desloratadine tablets in pollen-induced seasonal allergic rhinitis: a pharmacodynamic study of onset of action and efficacy. *Curr Med Res Opin* 2006;22:151-157.

- Horak F. VTX-1463, a novel TLR8 agonist for the treatment of allergic rhinitis. *Expert Opin Investig Drugs* 2011;20:981-986.
- Horak FF, Jager S, Nirnberger G, et al. Dose-related control of allergic rhinitis symptoms by a H1-receptor antagonist. Finding the proper doses [correction of dosis] of dimethindene maleate in patients with allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1994a;103:298-302.
- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:113-129.
- Indoor air pollutants: exposure and health effects. In: Copenhagen, Denmark: World Health Organization; 1983.
- Jain AK, Sukhija J, Dwedi S, et al. Effect of topical cyclosporine on tear functions in tear-deficient dry eyes. *Ann Ophthalmol (Skokie)* 2007;39:19-25.
- Johnson ME. The association between symptoms of discomfort and signs in dry eye. *Ocul Surf* 2009;7:199-211.
- Julio G, Lluch S, Pujol P, et al. Effects of tear hyperosmolarity on conjunctival cells in mild to moderate dry eye. *Ophthalmic Physiol Opt* 2012;32:317-323.
- Kaswan RL, Salisbury MA, Ward DA. Spontaneous canine keratoconjunctivitis sicca. A useful model for human keratoconjunctivitis sicca: treatment with cyclosporine eye drops. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1210-1216.

-
- Kaur IP, Smitha R. Penetration enhancers and ocular bioadhesives: two new avenues for ophthalmic drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm* 2002;28:353-369.
 - Khanal S, Millar TJ. Barriers to clinical uptake of tear osmolarity measurements. *Br J Ophthalmol* 2012;96:341-344.
 - Kjaergaard S, Molhave L, Pedersen OF. Human reactions to indoor air pollutants: n- Decane. *Environ Int* 1989;15:473-482.
 - Kjærgaard SK, Brandt J. Objective Human Conjunctival Reactions to Dust Exposure, VDT work and Temperature in Sick Buildings, vol. 1. Proceedings of 6th International Conference on Indoor Air Quality and Climate Conference '93; 1993. p.41–6.
 - Kjærgaard SK. The irritated eye in indoor environment. In: Spengler JD, Samet JM, McCarthy JF, editors. *Indoor Air Quality Handbook*. New York: McGraw-Hill; 2000. p.17.1–17.15.
 - Koh S, Maeda N, Hori Y, et al. Effects of suppression of blinking on quality of vision in borderline cases of evaporative dry eye. *Cornea* 2008;27:275–278.
 - Kojima T, Ibrahim OM, Wakamatsu T, et al. The impact of contact lens wear and visual display terminal work on ocular surface and tear functions in office workers. *Am J Ophthalmol* 2011a;152:933-940.
 - Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case – control study. *Am J Ophthalmol* 2005;139:242-246.

-
- Kojima T, Matsumoto Y, Ibrahim OM, et al. Effect of controlled adverse chamber environment exposure on tear functions in silicon hydrogel and hydrogel soft contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011b;52:8811-8817.
 - Korb DR. The tear film—its role today and in the future. *The Tear Film—Structure, Function and Clinical Examination*. Oxford: Butterworth Heinemann; 2002. p.126–192.
 - Krenzer KL, Dana MR, Ullman MD, et al. Effect of androgen deficiency on the human meibomian gland and ocular surface. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4874-4882.
 - Krug N, Hohlfeld JM, Geldmacher H, et al. Effect of loteprednol etabonate nasal spray suspension on seasonal allergic rhinitis assessed by allergen challenge in an environmental exposure unit. *Allergy* 2005;60:354-359.
 - Krug N, Hohlfeld JM, Larbig M, et al. Validation of an environmental exposure unit for controlled human inhalation studies with grass pollen in patients with seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1667-1674.
 - Kunert KS, Tisdale AS, Stern ME, et al. Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1489-1496.
 - Kyrein HJ, Horak F, Nirnberger G, et al. Efficacy of intranasally applied dimethindene maleate solution as spray in adult volunteers with symptoms of seasonal allergic rhinitis in the Vienna challenge chamber. *Arzneimittelforschung* 1996;46:794-799.

-
- LaFrance MW, Kehinde LE, Fullard RJ. Multiple cytokine analysis in human tears: an optimized procedure for cytometric bead-based assay. *Curr Eye Res* 2008;33:525-544.
 - Laibovitz RA, Solch S, Andriano K, et al. Pilot trial of cyclosporine 1% ophthalmic ointment in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. *Cornea* 1993;12:315-323.
 - Laine M, et al. Low salivary dehydroepiandrosterone and androgen – regulated cysteine – rich secretory protein 3 levels in Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56:2575-2584.
 - Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, et al. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol* 2009;147:198-205.
 - Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-174.
 - Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C, et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol* 2011;151:792-798.
 - Lemp MA. Epidemiology and classification of dry eye. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:791-803.
 - Lemp MA. New strategies in the treatment of dry-eye states. *Cornea* 1999;18:625-632.
 - Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995;21:221-232.

- Leung DYM, Bloom JW. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:3-22.
- Li DQ, Chen Z, Song XJ, et al. Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4302–4311.
- Lindgren T, Norbäck D. Health and perception of cabin air quality among Swedish commercial airline crew. *Indoor Air* 2005;15:65–72.
- Liu Z, Pflugfelder SC. Corneal surface irregularity and the effect of artificial tears in aqueous tear deficiency. *Ophthalmology* 1999;106:936-943.
- López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, et al. Use autologous serum in ophthalmic practice. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007;82:9-20.
- Lozato PA, Pisella PJ, Baudoin C. The lipid layer of the lacrimal tear film: physiology and pathology. *J Fr Ophthalmol* 2001;24:643–658.
- Lu P, Chen X, Liu X, et al. Dry eye syndrome in elderly Tibetans at high altitude: a population-based study in China. *Cornea* 2008;27:545-551.
- Macri A, Pflugfelder S. Correlation of the Schirmer 1 and fluorescein clearance tests with the severity of corneal epithelial and eyelid disease. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1632-1638.
- Macri A, Rolando M, Pflugfelder S. A standardized visual scale for evaluation of tear fluorescein clearance. *Ophthalmology* 2000;107:1338-1343.

-
- Maïssa C, Guillon M, Simmons P, et al. Effect of castor oil emulsion eyedrops on tear film composition and stability. *Cont Lens Anterior Eye* 2010;33:76-82.
 - Malvitte L, Montange T, Vejux A, et al. Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol* 2007;91:29–32.
 - Mansour K, Leonhardt CJ, Kalk WW, et al. Lacrimal punctum occlusion in the treatment of severe keratoconjunctivitis Sicca caused by Sjögren syndrome: a unioocular evaluation. *Cornea* 2007;26:147-150.
 - Mantelli F, Moretti C, Micera A, et al. Conjunctival mucin deficiency in complete androgen insensitivity syndrome (CAIS). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:899-902.
 - Mantelli F, Tranchina L, Lambiase A, et al. Ocular surface damage by ophthalmic compounds. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:464-470.
 - Martín Vide J, Olcina Cantos J. Climas y tiempos de España. Ed. Alianza. Madrid. 2001;258.
 - Mathers WD, Binarao G, Petroll M. Ocular water evaporation and the dry eye: a new measuring device. *Cornea* 1993;12:335–340.
 - Mathers WD, Stovall D, Lane JA, et al. Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production. *Cornea* 1998;17(4):353-358.
 - McCarty CA, Bansal AK, Livingston PM, et al. The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia. *Ophthalmology* 1998;105:1114-1119.

-
- McCarty DJ, McCarty CA. Survey of dry eye symptoms in Australian pilots. *Clin Exp Ophthalmol* 2000;28:169–171.
 - McCulley JP, Uchiyama E, Aronowicz JD, et al. Impact of evaporation on aqueous tear loss. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104:121–128.
 - Mendell MJ. Non-specific symptoms in office workers: a review and summary of the epidemiologic literature. *Indoor Air* 1993;3:227-236.
 - Menzies R, Tamblyn R, Farant JP, et al. The effect of varying levels of outdoor-air supply on the symptoms of sick building syndrome. *N Engl J Med* 1993;328:821-827.
 - Menzres D, Tamblyn RM, Nunes F, et al. Exposure to varying levels of contaminants and symptoms among workers in two office buildings. *Am J Public Health* 1996;86:1629-1633.
 - Messner K, Leibowitz HM. Acetylcysteine treatment of keratitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1971;86:357-359.
 - Miljanovic B, Dana R, Sullivan DA, et al. Impact of dry eye syndrome on vision-related quality of life. *Am J Ophthalmol* 2007;143:409–415.
 - Miller KL, Polse KA, Radke CJ. Black-line formation and the “perched” human tear film. *Curr Eye Res* 2002;25:155–162.
 - Miller KL, Walt JG, Mink DR, et al. Minimal clinically important difference for the ocular surface disease index. *Arch Ophthalmol* 2010;128:94-101.

-
- Molhave L, Bach B, Pedersen OF. Human reactions to low concentrations of volatile organic compounds. *Environ Int* 1986;12:167-175.
 - Molhave L, Kjaergaard SK, Attermann J. Effects in the eyes caused by exposure to office dust. *Indoor Air* 2002;12:165-174.
 - Molhave L, Moller J. The atmospheric environment in modern Danish dwellings- Measurements in 39 flats. In: Fanger PO, Valbjorn O (eds), *Indoor Climate Horsholm*, Denmark: SBI; 1979:171-186.
 - Molhave L. Indoor air pollution due to organic gases and vapors of solvents in building materials. *Environ Int* 1982;8:117-127.
 - Moon JW, Lee HJ, Shin KC, et al. Short term effects of topical cyclosporine and viscoelastic on the ocular surfaces in patients with dry eye. *Korean J Ophthalmol* 2007;21:189-194.
 - Moore JE, Graham JE, Goodall EA, et al. Concordance between common dry eye diagnostic tests. *Br J Ophthalmol* 2009;93:66-72.
 - Mori A, Oguchi Y, Okusawa Y, et al. Use of high-speed, highresolution thermography to evaluate the tear film layer. *AmJ Ophthalmol* 1997;124:729-735.
 - Murakami S. Analysis and design of micro-climate around the human body with respiration by CFD. *Indoor Air* 2004;14:156-164.
 - Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, et al. P2Y2 receptor stimulation increases tear fluid secretion in rabbits. *Curr Eye Res* 2000;21:782-787.

-
- Murube J, Murube E. Treatment of dry eye by blocking the lacrimal canaliculi. *Surv Ophthalmol* 1996;40:463-480.
 - Murube J. Tear osmolarity. *Ocul Surf* 2006;1:62-73.
 - Muzi G, Abbritti G, Accattoli MP, et al. Prevalence of irritative symptoms in a nonproblem air-conditioned office building. *Int Arch Occup Environ Health* 1998;71:372-378.
 - Nagda NL, Hodgson M. Low relative humidity and aircraft cabin air quality. *Indoor Air* 2001;11:200-214.
 - Nagda NL, Koontz MD. Review of studies on flight attendant health and comfort in airliner cabins. *Aviat Space Environ Med* 2003;74:101–109.
 - Nakamori K, Odawara M, Nakajima K, et al. Blinking is controlled primarily by ocular surface conditions. *Am J Ophthalmol* 1997;124:24–30.
 - Nakamura M, Endo K, Nakata K, et al. Gerfanate stimulates secretion of mucin-like glycoproteins by corneal epithelium in vitro and protects corneal epithelium from desiccation in vivo. *Exp Eye Res* 1997;65:569-574.
 - Nakazawa T, Okubo Y, Suwazono E, et al. Association between duration of daily VDT use and subjective symptoms. *Am J Ind Med* 2002;42:421–426.
 - Nava-Castaneda A, Tovilla-Canales JL, Rodriguez L, et al. Effects of lacrimal occlusion with collagen and silicone plugs on patients with conjunctivitis associated with dry eye. *Cornea* 2003;22:10-14.

-
- Nelson JD, Helms H, Fiscella R et al. A new look at dry eye disease and its treatment. *Adv Ther* 2000;17:84-93.
 - Newton R, Seybold J, Kuitert LM, et al. Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J Biol Chem* 1998;273:32312-32321.
 - Nichols KK, Begley CG, Caffery B, et al. Symptoms of ocular irritation in patients diagnosed with dry eye. *Optom Vis Sci* 1999;76:838–844.
 - Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea* 2004;23:272-285.
 - Nichols KK, Nichols JJ, Zadnik K. Frequency of dry eye diagnostic test procedures used in various modes of ophthalmic practice. *Cornea* 2000;19:477-482.
 - Niederberger V, Ring J, Rakoski J, et al. Antigens drive memory IgE responses in human allergy via the nasal mucosa. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;142:133-144.
 - Nielsen PK, Søgaard K, Skotte J, et al. Ocular surface area and human eye blink frequency during VDU work—the effect of monitor position and task. *Eur J Appl Physiol* 2008;103:1–7.
 - Noda-Tsuruya T, Asano-Kato N, Toda I, et al. Autologous serum eye drops for dry eye after LASIK. *J Refract Surg* 2006;22:61-66.
 - Norn MS. Desiccation of the precorneal film. I. Corneal wetting-time. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1969;47:865-880.

-
- Norn MS. Pollution keratoconjunctivitis. *Acta Ophthalmol* 1992;70:269–273.
 - Novak MJ, Johns LP, Miller RC et al. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73:762-769.
 - Oechsner M, Keipert S. Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome. *Eur J Pharm Biopharm* 1999;47:113-118.
 - Olivero DK, Davidson MG, English RV, et al. Clinical evaluation of 1% cyclosporine for topical treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1039-1042.
 - Ousler GW 3rd, Abelson MB, Nally LA, et al. Evaluation of the time to "natural compensation" in normal and dry eye subject populations during exposure to a controlled adverse environment. *Adv Exp Med Biol* 2002;506:1057-1063.
 - Ousler GW 3rd, Anderson RT, Osborn KE. The effect of senofilcon A contact lenses compared to habitual contact lenses on ocular discomfort during exposure to a controlled adverse environment. *Curr Med Res Opin* 2008;24:335-341.
 - Ousler GW, Gomes PJ, Welch D, et al. Methodologies for the study of ocular surface disease. *Ocul Surf* 2005;3:143-154.
 - Paiva CS, Pflugfelder SC. Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71:89-95.

-
- Palakuru JR, Wang J, Aquavella JV. Effects of blinking on tear dynamics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3032–3037.
 - Pan Z, Molhave L, Kjaergaard SK. Effects on eyes and nose in humans after experimental exposure to airborne office dust. *Indoor Air* 2000;10:237-245.
 - Pansell T, Porsblad M, Abdi S. The effect of vertical gaze position on ocular tear film stability. *Clin Exp Ophthalmol* 2007;90:176–181.
 - Paschides CA, Stefaniotou M, Papageorgiou J, et al. Ocular surface and environmental changes. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76:74-77.
 - Patel S, Farrell J, Blades KJ, et al. The value of a phenol red impregnated thread for differentiating between the aqueous and non-aqueous deficient dry eye. *Ophthalmic Physiol Opt*. 1998;18:471-476.
 - Peral A, Domínguez-Godínez CO, Carracedo G, et al. Therapeutic targets in dry eye syndrome. *Drug News Perspect* 2008;21:166-176.
 - Peters K, Dennis GR, Anderton PJ, et al. The effects of novel amphipathic block copolymers on stabilization of the rat tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:5089-5094.
 - Pflugfelder SC, Beuerman RW, Stern ME. *Dry Eye and Ocular Surface Disorders*. New York: Marcel Decker; 2004a.
 - Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999;19:201-211.

-
- Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, et al. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 1999;19:201-211.
 - Pflugfelder SC, Maskin SL, Anderson B, et al. A randomized, double-masked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5%, and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance. *Am J Ophthalmol* 2004b;138:444-457.
 - Pflugfelder SC, Tseng SC, Sanabria O, et al. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea* 1998;17:38-56.
 - Pflugfelder SC. Antiinflammatory therapy for dry eye. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:337-342. Review.
 - Pflugfelder SC. Anti-inflammatory therapy of dry eye. *Ocul Surf* 2003;1:31-36.
 - Piccoli B. A critical appraisal of current knowledge and future directions of ergophthalmology. *Ergonomics* 2003;46:384–406.
 - Prabhasawat P, Tseng SC. Frequent association of delayed tear clearance in ocular irritation. *Br J Ophthalmol* 1998;82:666-675.
 - Prause JU, Norn MS. Relation between blink frequency and break-up time. *Acta Ophthalmol* 1987;65:19–22.
 - Purslow C, Wolffsohn J. The relation between physical properties of the anterior eye and ocular surface temperature. *Optom Vis Sci* 2007;84:197–201.

-
- R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
 - RDC Team (R Development Core Team). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria.: R Foundation for Statistical Computing.; 2010.
 - Reinhard T, Reis A, Mayweg S, et al. Topical FK506 in inflammatory corneal and conjunctival diseases. A pilot study. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2002;219:125-131.
 - Reinikainen LM, Jaakkola JJ. Effects of temperature and humidification in the office environment. *Arch Environ Health* 2001;56:365–368.
 - Rieger G. Lipid-containing eye drops: a step closer to natural tears. *Ophthalmologica* 1990;201:206-212.
 - Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *Br J Ophthalmol* 1992;76:157-158.
 - Rocher P, Fatt I. Hydrogel contact lenses. *Optometry Today* 1995;35:18–22.
 - Rolando M, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2001;45:S203-S210.
 - Ronborg SM, Mosbech H, Johnsen CR, et al. Exposure chamber for allergen challenge. The development and validation of a new concept. *Allergy* 1996;51:82-88.

-
- Ronborg SM, Mosbech H, Poulsen LK. Exposure chamber for allergen challenge. A placebo-controlled, double-blind trial in house-dust-mite asthma. *Allergy* 1997;52:821- 828.
 - Sainz de la Maza Serra M, Simón Castellvi C, Kabbani O. Nonpreserved topical steroids and lacrimal punctal occlusion for severe keratoconjunctivitis sicca. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2000;75:751-756.
 - Sakamoto R, Bennett ES, Henry VA, et al. The phenol red thread tear test: a crosscultural study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3510-3514.
 - Saleh TA, McDermott B, Bates AK, et al. Phenol red thread test vs Schirmer's test: a comparative study. *Eye* 2006;20:913-915.
 - Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, et al. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. CsA Phase 3 Study Group. *Ophthalmology* 2000;107:631-639. Erratum in: *Ophthalmology* 2000;107:1220.
 - Sato M, Fukayo S, Yano E. Adverse environmental health effects of ultra-low relative humidity indoor air. *J Occup Health* 2003;45:133–136.
 - Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, et al. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81:491–494.
 - Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, et al. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol.* 2003b;136:318-326.

-
- Schaumberg DA, Sullivan DA, Dana MR. Epidemiology of dry eye syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2003a;506:989-998.
 - Schein OD, Tielsch JM, Munoz B, et al. Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective. *Ophthalmology* 1997;104:1395-1401.
 - Schiffman R, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol* 2000;118:615-621.
 - Shimazaki J, Goto E, Ono M, et al. Meibomian gland dysfunction in patients with Sjögren syndrome. *Ophthalmology* 1998;105:1485-1488.
 - Shine WE, McCulley JP, Pandya AG. Minocycline effect on meibomian gland lipids in meibomianitis patients. *Exp Eye Res* 2003;76:417-420.
 - Shusterman D. Trigeminally-mediated health effects of air pollutants: sources of interindividual variability. *Hum Exp Toxicol* 2007;26:149–157.
 - Sjögren H, Bloch KJ. Keratoconjunctivitis sicca and the Sjögren syndrome. *Surv Ophthalmol* 1971;16:145-159.
 - Skov P, Valbjørn O, Pedersen BV. Influence of indoor air quality on the sick building syndrome in an office environment. *Scand J Work Environ Health* 1990;16:363–371.
 - Smedbold HT, Ahlen C, Norbäck D, et al. Sign of eye irritation in female hospital workers and the indoor environment. *Indoor Air* 2001;11:223–231.

- Solomon A, Dursun D, Liu Z, et al. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2283-2292.
- Space DR, Johnson RA, Rankin WL, et al. The airplane cabin environment: Past, present and future research. In: Nagda NL (ed), *Air quality and comfort in airliner cabins* West Conshohocken, PA: *American Society for Testing Materials* 2000:189-214.
- Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. A unified theory of the role of the ocular surface in dry eye. *Adv Exp Med Biol* 1998b; 438:643-651.
- Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: The interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998;17:584-589.
- Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, et al. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* 1998a;17:584-589.
- Stern ME, Gao J, Schwalb TA, et al. Conjunctival T-cell subpopulations in Sjögren's and non-Sjögren's patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2609-2614.
- Stern ME, Pflugfelder SC. Inflammation in dry eyes. *Ocul Surf* 2004;2:124–130.
- Steven E, Perry HD. Long – term resolution of chronic dry eye symptoms and signs after topical cyclosporine treatment. *Ophthalmology* 2007;114:76-79.

-
- Stevenson W, Chauhan SK, Dana R. Dry eye disease: an immune-mediated ocular surface disorder. *Arch Ophthalmol* 2012;130:90-100.
 - Stonecipher K, Perry HD, Gross RH, et al. The impact of topical cyclosporine A emulsion 0.05% on the outcomes for patients with keratoconjunctivitis sicca. *Curr Med Res Opin* 2005;21:1057-1063.
 - Strom-Tejsten P, Wyon DP, Lagercrantz L, et al. Passenger evaluation of the optimum balance between fresh air supply and humidity from 7-h exposures in a simulated aircraft cabin. *Indoor Air*. 2007;17:92-108.
 - Stubner UP, Toth J, Marks B, et al. Efficacy and safety of an oral formulation of cetirizine and prolonged-release pseudoephedrine versus xylometazoline nasal spray in nasal congestion. *Arzneimittelforschung*. 2001;51:904-910.
 - Stuebner P, Horak F, Ziegelmayer R, et al. Effects of rupatadine vs placebo on allergeninduced symptoms in patients exposed to aeroallergens in the Vienna Challenge Chamber. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96:37-44.
 - Stuebner P, Ziegelmayer R, Horak F. A direct comparison of the efficacy of antihistamines in SAR and PAR: randomised, placebo-controlled studies with levocetirizine and loratadine using an environmental exposure unit - the Vienna Challenge Chamber (VCC). *Curr Med Res Opin*. 2004;20:891-902.
 - Sullivan DA, Krenzer KL, Sullivan BD, et al. Does androgen insufficiency cause lacrimal gland inflammation and aqueous tear deficiency? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1261-1265.

-
- Sunwoo Y, Chou C, Takeshita J, et al. Physiological and subjective responses to low relative humidity in young and elderly men. *J Physiol Anthropol* 2006b;25:229–238.
 - Sunwoo Y, Chou C, Takeshita J, et al. Physiological and subjective responses to low relative humidity. *J Physiol Anthropol* 2006a;25:7–14.
 - Suzuki M, Massingale ML, Ye F, et al. Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4557-4561.
 - Tabery HM. Corneal surface changes in keratoconjunctivitis sicca. Part II: The mucus component. A non-contact photomicrographic in vivo study in the human cornea. *Eye (Lond)* 2003;17:488-491.
 - Tank J, Biller H, Heusser K, et al. Effect of acute ozone induced airway inflammation on human sympathetic nerve traffic: a randomized, placebo controlled, crossover study. *PLoS One*. 2011;6:e18737.
 - Temmel AF, Toth J, Marks B, et al. Rhinoresistometry versus rhinomanometry--an evaluation. *Wien Klin Wochenschr*. 1998;110:612-615.
 - Thoft RA. Current concepts in ophthalmology: Corneal disease. *N Engl J Med*. 1978;298:1239-1241.
 - Tiffany JM. Lipid-containing eye drops. *Ophthalmologica* 1991;203:47-49.
 - Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, et al. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4309-4315.

- Toshida H, Nakata K, Hamano T, et al. Effect of gefarnate on the ocular surface in squirrel monkeys. *Cornea* 2002;21:292-299.
- Toth J, Schultze-Werninghaus C, Marks B, et al. Environmental priming influences allergen-specific nasal reactivity. *Allergy*. 1998;53:1172-1177.
- Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997;124:825-835.
- Tsubota K, Fujihara T, Saito K, et al. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in dry eye patients. *Ophthalmologica* 1999;213:16-19.
- Tsubota K, Hata S, Mori A, et al. Decreased blinking in dry saunas. *Cornea* 1997;16:242-244.
- Tsubota K, Nakamori K. Dry eyes and video display terminals. *N Engl J Med*. 1993;328:584.
- Tsubota K. Tear dynamics and dry eye. *Prog Retin Eye Res* 1998;17:565-596.
- Turner K, Pflugfelder SC, Ji Z, et al. Interleukin-6 levels in the conjunctival epithelium of patients with dry eye disease treated with cyclosporine ophthalmic emulsion. *Cornea* 2000;19:492-496.
- Uchiyama E, Aronowicz JD, Butovich IA, et al. Increased evaporative rates in laboratory testing conditions simulating airplane cabin relative humidity: An important factor for dry eye syndrome. *Eye Contact Lens* 2007;33:174-176.

-
- Uchiyama E, Aronowicz JD, Butovich IA, et al. Increased evaporative rates in laboratory testing conditions simulating airplane cabin relative humidity: an important factor for dry eye syndrome. *Eye Contact Lens* 2007;33:174–176.
 - van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1969;82:10-14.
 - van der Worp E, de BJ, Swarbrick HA, et al. Evaluation of signs and symptoms in 3- and 9-o'clock staining. *Optom Vis Sci* 2009;86:260-265.
 - Van Overtvelt L, Baron-Bodo V, Horiot S, et al. Changes in basophil activation during grass-pollen sublingual immunotherapy do not correlate with clinical efficacy. *Allergy*. 2011;66:1530-1537.
 - Vearrier D, Greenberg MI. Occupational health of miners at altitude: adverse health effects, toxic exposures, pre-placement screening, acclimatization, and worker surveillance. *Clin Toxicol (Phila)*. 2011;49:629-640.
 - Versura P, Fresina M, Campos EC. Ocular surface changes over the menstrual cycle in women with and without dry eye. *Gynecol Endocrinol* 2007;23:385-390.
 - Versura P, Profazio v, Cellini M, et al. Eye discomfort and air pollution. *Ophthalmologica* 1999;213:103–9.
 - Vishnubhatla S, Borchman D, Foulks GN. Contact lenses and the rate of evaporation measured in vitro; the influence of wear, squalene and wax. *Cont Lens Anterior Eye*. 2012;35:277-281.

- Vitale S, Goodman LA, Reed GF, et al. Comparison of the NEI-VFQ and OSDI questionnaires in patients with Sjogren's syndrome-related dry eye. *Health Qual Outcomes* 2004;1;2:44.
- Vivino FB, Al-Hashimi I, Khan Z, et al. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjögren syndrome. A randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. *Arch Intern Med* 1999;159:174-181.
- Wakabayashi K, Hashiguchi K, Kanzaki S, et al. Pranlukast dry syrup inhibits symptoms of Japanese cedar pollinosis in children using OHIO Chamber. *Allergy Asthma Proc.* 2012;33:102-109.
- Walsh NP, Fortes MB, Raymond-Barker P, et al. Is whole-body hydration an important consideration in dry eye? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:6622-6627.
- Walt J. Ocular Surface Disease Index (OSDI) Administration and Scoring Manual. Irvine, CA: Allergan, Inc; 2004.
- West JB. Concise Clinical Review: High Altitude Medicine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012. [Epub ahead of print]
- Whelan EA, Lawson CC, Grajewski B, et al. Prevalence of respiratory symptoms among female flight attendants and teachers. *Occup Environ Med* 2003;62:929–934.
- Wilken JA, Berkowitz R, Kane R. Decrements in vigilance and cognitive functioning associated with ragweed-induced allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002;89:372-380.

-
- Wilken JA, Kane RL, Ellis AK, et al. A comparison of the effect of diphenhydramine and desloratadine on vigilance and cognitive function during treatment of ragweed-induced allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;91:375-385.
 - Williamson J, Gibson AA, Wilson T, et al. Histology of the lacrimal gland in keratoconjunctivitis sicca. *Br J Ophthalmol* 1973;57:852-858.
 - Wolkoff P, Kärcher T, Mayer H. Problems of the "outer eyes" in the office environment: an ergophthalmologic approach. *J Occup Environ Med.* 2012;54:621-631.
 - Wolkoff P, Nøjgaard JK, Franck C, et al. The modern office environment desiccates the eyes? *Indoor Air* 2006a;16:258–265.
 - Wolkoff P, Nøjgaard JK, Troiano P, et al. Eye complaints in the office environment: Precorneal tear film integrity influenced by eye blinking efficiency. *Occup Environ Med* 2005;62:4–12.
 - Wolkoff P, Skov P, Franck C, et al. Eye irritation and environmental factors in the office environment. Hypotheses, causes, and a physiological model. *Scand J Work Environ Health* 2003;29:411–430.
 - Wolkoff P, Wilkins CK, Clausen PA, et al. Organic compounds in office environments—sensory irritation, odor, measurements, and the role of reactive chemistry. *Indoor Air* 2006b;16:7–19.
 - Wolkoff P. "Healthy" eye in office-like environments. *Environ Int* 2008;34:1204-14.

- Wolkoff P. Indoor air pollutants in office environments: Assessment of comfort, health, and performance. *Int J Hyg Environ Health*. 2012. [Epub ahead of print]
- World Health Organization (WHO). Chapter two: Mode of travel: health considerations. In: *International Travel and Health*. Geneva, Switzerland: Pomerol G and Wilder-Smith, A, Inc.; 2010. ISBN: 978 92 4 1 58045 8.
- Xiao JZ, Kondo S, Yanagisawa N, et al. Clinical efficacy of probiotic *Bifidobacterium longum* for the treatment of symptoms of Japanese cedar pollen allergy in subjects evaluated in an environmental exposure unit. *Allergol Int*. 2007;56:67-75.
- Yamada F. Frontal midline theta rhythm and eyeblinking activity during a VDT task and a video game: useful tools for psychophysiology in ergonomics. *Ergonomics* 1998;41:678–688.
- Yao W, Davidson RS, Durairaj VD, et al. Dry eye syndrome: an update in office management. *Am J Med* 2011;124:1016-1018.
- Yap M. Tear break-up is related to blink frequency. *Acta Ophthalmol* 1991;69:92–94.
- Yasui K, Kanda H, Iwanami T, et al. Increased serum concentration of urinary trypsin inhibitor with asthma exacerbation. *Eur Respir J* 2003;22:739-742.
- Ye Z, Abe Y, Kusano Y, et al. The influence of visual display terminal use on the physical and mental conditions of administrative staff in Japan. *J Physiol Anthropol* 2007;26:69–73.

- Yee RW, Sperling HG, Kattak A, et al. Isolation of the ocular surface to treat dysfunctional tear syndrome associated with computer use. *Ocul Surf* 2007;5:308–315.
- Yeh S, Song XJ, Farley W, et al. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:124-129.
- Yen MT, Pflugfelder SC, Feuer WJ. The effect of punctal occlusion on tear production, tear clearance, and ocular surface sensation in normal subjects. *Am. J. Ophthalmol* 2001;131:314-323.
- Zhang X, Chen Q, Chen W, et al. Tear dynamics and corneal confocal microscopy of subjects with mild self-reported office dry eye. *Ophthalmology* 2011;118:902-907.
- Zieglmayer P, Zieglmayer R, Bareille P, et al. Fluticasone furoate versus placebo in symptoms of grass-pollen allergic rhinitis induced by exposure in the Vienna Challenge Chamber. *Curr Med Res Opin.* 2008;24:1833-1840.
- Zieglmayer UP, Horak F, Toth J, et al. Efficacy and safety of an oral formulation of cetirizine and prolonged-release pseudoephedrine versus budesonide nasal spray in the management of nasal congestion in allergic rhinitis. *Treat Respir Med.* 2005;4:283-287.
- Zimmer A, Bouley J, Le Mignon M, et al. A regulatory dendritic cell signature correlates with the clinical efficacy of allergen-specific sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;129:1020-1030.

ANEXOS

ANEXO I

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

- Título del Estudio:** Estudio clínico. “Influencia de los factores ambientales en los test diagnósticos de la superficie ocular” Estudio prospectivo, protocolizado, unicéntrico, randomizado y enmascarado.
- Nº de estudio:** IOBA-CERLab 001-2010
- Coordinador:** IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada)

1. INTRODUCCIÓN

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación clínica coordinado por el IOBA para el estudio de la influencia de los factores ambientales en los test empleados en clínica para el diagnóstico del Síndrome de Ojo Seco (SOS), enfermedad objeto de este estudio. El SOS es un trastorno multifactorial inflamatorio que afecta a la superficie ocular. Se trata de una enfermedad muy prevalente que afecta a millones de personas en todo el mundo y que implica un descenso significativo en la calidad de vida en estos pacientes debido a que causa molestias, mala calidad visual, inestabilidad de la película lagrimal y un daño potencial e irreversible de la superficie ocular debido al estado de inflamación en el que se encuentra la superficie ocular.

El SOS es una enfermedad que presenta muy baja correlación entre signos y síntomas, es decir, entre los hallazgos clínicos y las sensaciones de malestar que presenta el paciente, lo que dificulta tanto la clasificación y el diagnóstico de la enfermedad, como la búsqueda de tratamientos más adecuados.

Este formulario de consentimiento describe el estudio y su papel en dicho estudio. El investigador responderá todas las preguntas que tenga sobre este estudio o consentimiento informado. Por favor lea atentamente este formulario y realice todas las preguntas que tenga sobre la información que contiene.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio clínico es determinar las condiciones ambientales (Temperatura, Humedad y Presión Atmosférica) que pueden afectar la superficie ocular en tres poblaciones distintas (sujetos sanos, pacientes con la enfermedad de SOS y pacientes usuarios de lentes de contacto no diagnosticados de SOS pero que presentan sintomatología durante el uso de sus lentes de contacto) mediante el desarrollo de un “test de provocación” en una Cámara de Ambiente

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Controlado (CERLab), que nos permita inducir o aumentar la correlación entre signos y síntomas de la superficie ocular, evaluando los cambios que se producen tanto en la sintomatología como en la superficie ocular.

El fin del estudio es mejorar la capacidad diagnóstica de los test de que evalúan la superficie ocular, especialmente en la patología de SOS y que nos ayude a entender cuáles son las condiciones ambientales que más afectan al estado de la superficie ocular.

Serán necesarias TRES exposiciones dentro de la CERLab. La primera permitirá evaluar el estado de la superficie ocular en condiciones ambientales normales controladas. La segunda permitirá evaluar los cambios tanto en la sintomatología como en los signos clínicos debidos a la exposición a un ambiente con baja humedad relativa (similar a la que encontramos en zonas áridas) y la tercera permitirá evaluar los cambios en los signos y síntomas debidos a condiciones de baja presión atmosférica (similar a la presión atmosférica durante un vuelo).

Se le está pidiendo que participe en un estudio clínico que está diseñado como prospectivo, protocolizado, unicéntrico, randomizado y enmascarado.

Se plantea la realización de exposiciones controladas a diferentes condiciones ambientales. No se prueba la eficacia de ningún medicamento o se experimenta con ninguna nueva técnica quirúrgica.

3. DURACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL SUJETO

El estudio finalizará cuando el último paciente incluido finalice las exposiciones a las condiciones ambientales de estudio, lo que supondrán un total de 4 visitas de estudio (incluyendo la visita de inclusión). Los datos obtenidos serán recogidos para realizar el estudio estadístico y la posterior divulgación científica. No se realizará seguimiento de los pacientes en el tiempo.

4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para que se considere su inclusión en el estudio, deberá cumplir por lo menos los siguientes requisitos:

Grupo 1 (G1.Control)

- Varón o mujer mayor de edad y con capacidad legal para entender y firmar el consentimiento informado.
- NO usuarios de lentes de contacto o con un uso esporádico de las mismas (2 días a la semana o menos), y que acepten el compromiso de suspender el uso de las mismas 2 días antes de entrar a participar en el estudio, así como durante el tiempo que dure el mismo.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- Haber obtenido una puntuación en la versión en español del cuestionario para ojo seco “Ocular Surface Disease Index – OSDI[®]” menor o igual a 12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína ≤ 1 (escala Oxford).
- No tener alterados dos o más de los siguientes test:
 - Test de Rojo de Fenol “Phenol Red Thread Test – PRTT” > 20 milímetros a los 15 segundos.
 - Tiempo de ruptura lagrimal “Tear Break-up Time – TBUT” > 7 segundos.
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina ≤ 1 (escala Oxford).
 - Test de Schirmer sin anestesia tópica ≥ 5 milímetros a los 5 minutos.
- Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de las técnicas diagnósticas que se precisen.
- Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.

Grupo 2 (G2.SOS leve - moderado)

- Varón o mujer mayor de edad y con capacidad legal para entender y firmar el consentimiento informado.
- Diagnóstico de SOS leve-moderado mediante los criterios clínicos establecidos en el protocolo.
- NO usuarios de lentes de contacto o con un uso esporádico de las mismas (2 días a la semana o menos), y que acepten el compromiso de suspender el uso de las mismas 2 días antes de entrar a participar en el estudio, así como durante el tiempo que dure el mismo.
- Haber obtenido una puntuación en la versión en español del cuestionario para ojo seco “Ocular Surface Disease Index – OSDI[®]” mayor de 12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína < 3 (escala Oxford).
- No tener alterados dos o más de los siguientes test:
 - Test de Rojo de Fenol “Phenol Red Thread Test – PRTT” > 20 milímetros a los 15 segundos.
 - Tiempo de ruptura lagrimal “Tear Break-up Time – TBUT” > 7 segundos.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- Tinción conjuntival con verde de lisamina ≤ 1 (escala Oxford).
- Test de Schirmer sin anestesia tópica > 3 milímetros a los 5 minutos.
- Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de las técnicas diagnósticas y que se precisen.
- Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.

Grupo 3 (G3.SOS severo)

- Varón o mujer mayor de edad y con capacidad legal para entender y firmar el consentimiento informado.
- Diagnóstico de SOS severo mediante los criterios clínicos establecidos en el protocolo.
- Usuarios de lentes de contacto que presenten sintomatología ocular únicamente durante el uso de las mismas y que acepten el compromiso de suspender su uso 2 días antes de entrar a participar en el estudio, así como durante el tiempo que dure el mismo.
- Haber obtenido una puntuación en la versión en español del cuestionario para ojo seco “Ocular Surface Disease Index – OSDI[®]” mayor de 12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína ≥ 3 (escala Oxford y Baylor).
- Tener alterados dos o más de los siguientes test:
 - Test de Rojo de Fenol “Phenol Red Thread Test – PRTT” ≤ 20 milímetros a los 15 segundos.
 - Tiempo de ruptura lagrimal “Tear Break-up Time – TBUT” ≤ 7 segundos.
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina > 1 (escala Oxford).
 - Test de Schirmer sin anestesia tópica ≤ 3 milímetros a los 5 minutos.
- Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de las técnicas diagnósticas que se precisen.
- Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Usted NO podrá participar en el estudio si:

Grupo 1 (G1.Control)

- Presenta cualquier patología de superficie ocular.
- Ha sido sometido a cualquier cirugía de superficie ocular.
- Utiliza medicación tópica o sistémica que se considere que pueda influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantenga estable (tanto en tipo de medicación como en dosis) a lo largo del estudio.
- Falta de compromiso de suspender el uso de la medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos 4 horas antes de cada una de las visitas del estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Cualquier enfermedad (ej. Claustrofobia) que, a juicio del equipo médico del IOBA, no le permita someterse a cualquiera de las condiciones ambientales creadas en la CER-Lab o que pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados. (ej. Claustrofobia).
- Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.

Grupo 2 (G2.SOS leve - moderado)

- Presenta una patología de la superficie ocular diferente al SOS.
- Ha sido sometido a cirugía ocular en los tres meses previos al estudio.
- Utiliza medicación tópica o sistémica que se considere que pueda influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantenga estable (tanto en tipo de medicación como en dosis) a lo largo del estudio.
- Falta de compromiso de suspender el uso de la medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos 4 horas antes de cada una de las visitas del estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Cualquier enfermedad (ej. Claustrofobia) que, a juicio del equipo médico del IOBA, no le permita someterse a cualquiera de las condiciones ambientales creadas en la CER-Lab o que pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados.
- Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.

Grupo 3 (G3.SOS severo)

- Presenta cualquier patología de la superficie ocular diferente al SOS.
- Ha sido sometido a cirugía ocular en los tres meses previos al estudio.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- Utiliza medicación tópica o sistémica que se considere que pueda influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantenga estable (tanto en tipo de medicación como en dosis) a lo largo del estudio.
- Falta de compromiso de suspender el uso de la medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos 4 horas antes de cada una de las visitas del estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Cualquier enfermedad (ej. Claustrofobia) que, a juicio del equipo médico del IOBA, no le permita someterse a cualquiera de las condiciones ambientales creadas en la CER-Lab o que pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados.
- Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.

Usted podrá retirarse del estudio siempre que lo desee.

6. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

A – Visita de inclusión

En su primera visita de estudio se le examinará para garantizar que usted es elegible para participar en el estudio y se recogerá información sobre usted:

- Se hablará con usted sobre el estudio, el investigador responderá todas las preguntas que tenga sobre este estudio o sobre el consentimiento informado y se le pedirá que firme este formulario de consentimiento antes de iniciar su participación en este estudio.
- Se le preguntará sobre su actual estado de salud, sus antecedentes médicos e historia ocular (incluyendo antecedentes de lesiones, enfermedades y cirugía). También se le harán algunas preguntas sobre los medicamentos que pueda estar tomando (tanto prescritos como sin prescripción médica).
- Se le pedirá que cumplimente 1 cuestionario sobre sus síntomas oculares.
- Si usted es susceptible de ser candidato a formar parte del grupo 1 de estudio, se le someterá además a los siguientes exámenes oculares en ambos ojos a menos que se indique de otra manera:
 - ★ Medición del tiempo de ruptura lagrimal (T-BUT) para la evaluación de la estabilidad lagrimal.
 - ★ Tinciones corneales y conjuntivales con 2 tipos de colorantes (fluoresceína sódica y verde de lisamina).
 - ★ Medición de la producción de lágrima, mediante la inserción en los fondos de saco inferiores de hilos estandarizados del test de rojo de fenol.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- ★ Medición de la producción de lágrima, mediante la inserción en los fondos de saco inferiores de tiras estandarizadas del test de la lágrima de Schirmer.

Visitas de Exposición (V1-V3)

- El procedimiento será llevado a cabo en la CERLab.
- Se le realizarán una serie de test de evaluación de la superficie ocular en la sala de exploración de la CER-LAB (pre-visita X) antes de la entrada a la CERLab y a la exposición a las condiciones ambientales de estudio.
- Posteriormente, entrará dentro de la CERLab en donde deberá permanecer expuesto a las condiciones ambientales de estudio que correspondan a su visita y que serán previamente programadas (ver condiciones ambientales). El tiempo de permanencia en la CERLab oscilará entre las 2 ½ y las 3 horas, periodo que engloba el tiempo necesario para alcanzar la estabilización y el estado óptimo de las variables de exposición, el tiempo de exposición a las variables ambientales establecidas (2 horas), y el tiempo de retorno al estado inicial. La actividad visual a realizar durante la permanencia en la CERLab será la realización de tareas visuales de cerca (lectura, jugar a las cartas, crucigramas...)
- Tras la exposición, la misma batería de test de evaluación de la superficie ocular realizada antes de entrar en la cámara será realizada de nuevo en la sala de exploración de la CERLab (post- visita X).
- El orden de las visitas será asignado al azar para reducir la subjetividad del paciente a las diferentes condiciones ambientales y garantizar un estudio enmascarado.
- El ojo seleccionado para realizar las medidas en el grupo control será aquel de los dos que supere los criterios de inclusión y exclusión del estudio para ese grupo. En caso de que ambos ojos puedan ser candidatos, éste se elegirá aleatoriamente.
- El ojo seleccionado para realizar las medidas en los grupos de ojo seco leve-moderado y severo será aquel que presente mayor grado de tinción corneal. En caso de que ambos ojos presenten el mismo grado de tinción corneal, el ojo de estudio será el más sintomático (seleccionado por el paciente). El ojo de estudio será seleccionado aleatoriamente en caso de que el paciente no presente uno de los dos ojos como más sintomático.
- La temperatura será constante durante las diferentes condiciones ambientales ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).
- La CERLab se mantendrá con una iluminación suave predeterminada y sin corriente de aire durante todas las exposiciones.
- Todos los test de evaluación de la superficie ocular serán realizados únicamente en el ojo seleccionado. Los test de evaluación de la superficie

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

ocular que se realizarán durante las visitas pre- y post- serán los siguientes y en el orden que se indica a continuación:

1. Cuestionario SIDEQ con escalas de valoración visual (VAS) de 0 a 10.
 2. Medida de la osmolaridad lagrimal.
 3. PRTT.
 4. Evaluación de la hiperemia bulbar en las áreas de exposición (nasal y temporal).
 5. Fotografía de la conjuntiva nasal y temporal.
 6. Recogida de lágrima para análisis de citoquinas (2 μ l).
 7. Tiempo de espera de diez minutos.
 8. Instilación de fluoresceína (5 μ l).
 9. T-BUT.
 10. Evaluación de la tinción corneal con fluoresceína con filtro azul cobalto.
 11. Tinción con tira de verde de lisamina humectada con 15 μ l de suero fisiológico.
 12. Tiempo de espera de un minuto.
 13. Evaluación de la tinción conjuntival con verde de lisamina.
 14. Test de Schirmer sin anestesia.
 15. Aclarado de ambos ojos con 20 ml de suero fisiológico (10 ml/ojo).
- 2 minutos** {

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Condiciones Ambientales

Condición Ambiental A: Condiciones estándar.

Humedad Relativa: 45% (moderada).

Presión: Presión atmosférica de Valladolid (930 mbar – 690 m sobre el nivel del mar).

Condición Ambiental B: Baja Humedad Relativa

Humedad Relativa: 5% (baja).

Presión: Presión atmosférica de Valladolid (930 mbar – 690 m sobre el nivel del mar).

Condición Ambiental C: Baja Humedad Relativa + Baja Presión Atmosférica.

Humedad Relativa: 5% (baja).

Presión: Presión atmosférica de una cabina de avión (750 mbar – 2500 m sobre el nivel del mar). La presión del externa del aire es alrededor de 1/3 menos de la presión a nivel del mar.

F- Visitas sin programar

Si usted, o su médico del estudio cree necesario realizar otra visita, entre visitas programadas, se programará otra cita con usted. Si su médico lo estima necesario podrá precisar pruebas adicionales.

G- Sus Responsabilidades

Usted deberá acudir todas las visitas del estudio y avisar al centro, tan pronto como pueda, si por cualquier motivo no pudiera acudir a alguna de estas visitas. Se le pedirá que comunique cualquier cambio en su medicación (con o sin prescripción médica) y comunicar a su médico cualquier cambio que usted experimente. Deberá responder a todas las preguntas de los cuestionarios sinceramente.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

7. RIESGOS Y MOLESTIAS RAZONABLEMENTE PREVISIBLES PARA PARTICIPANTE

Riesgos del Estudio

Los pacientes del presente estudio serán expuestos durante un breve periodo de tiempo a las variables ambientales de exposición seleccionadas, siendo éstas, condiciones ambientales a las que cualquier persona puede estar expuesto en su vida cotidiana, por ejemplo, durante la permanencia en una estancia con calefacción o aire acondicionado, viajes a países con humedades relativas bajas (ej. Egipto, Libia,...), o las condiciones ambientales que se encuentran en la cabina de un avión durante un vuelo. La realización de este estudio puede suponer un empeoramiento TEMPORAL Y REVERSIBLE de la sintomatología y los signos clínicos del paciente como pueden ser incomodidad o sequedad ocular, que disminuirán a medida que pase el tiempo desde la exposición a las variables ambientales y que podrán paliarse con el uso de lágrimas artificiales.

Si usted tiene alguna pregunta o preocupación sobre cualquiera de estos riesgos, por favor consulte a su médico. Si experimenta alguna enfermedad o molestia durante el estudio, debe notificárselo a su médico del estudio.

10. CONFIDENCIALIDAD

Puede publicarse un informe de los resultados de este estudio o enviarse a las autoridades sanitarias pertinentes, pero su nombre no aparecerá en estos documentos. De acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, su confidencialidad será debidamente respetada si la información es transferida a otros países. Su nombre puede ser revelado a las autoridades sanitarias gubernamentales como la AGEMED (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) o a los Comités Éticos Independientes (CEICs) en caso de que necesiten inspeccionar sus archivos médicos. Se tomarán las medidas oportunas para mantener la confidencialidad de los archivos médicos y de la información personal.

11. FOTOGRAFÍAS

Durante el estudio pueden realizarse fotografías de sus ojos. Si usted no quiere que se le hagan estas fotografías, no podrá participar en el estudio.

El IOBA puede utilizar las fotografías que se han tomado para evaluar los resultados del estudio y/o para investigación general, enseñanza u objetivos informativos. Como las fotografías forman parte de los datos del estudio, también estarán disponibles para su revisión por parte de las agencias sanitarias reguladoras en todo el mundo (como la AGEMED). El IOBA será el propietario de los derechos de autor de las fotografías.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Por favor, señale **una** casilla:

- Si, autorizo que me fotografíen los ojos. El IOBA también tiene mi permiso para utilizar estas fotografías en publicaciones científicas y en congresos nacionales e internacionales.
- Si, autorizo que me fotografíen los ojos. Sin embargo NO autorizo a que se utilicen estas fotografías en publicaciones científicas y en congresos nacionales e internacionales.
- No autorizo a que me fotografíen los ojos. He decidido no participar en el estudio.

12. COMPENSACIÓN AL TRATAMIENTO MÉDICO

Si Usted experimenta una reacción adversa y/o complicación como resultado directo de los procedimientos realizados en este estudio, el IOBA será responsable económico de los costes de los tratamientos médico y quirúrgico habituales proporcionados como resultado de dicho daño. El tratamiento apropiado estará disponible si se requiere. El promotor no dará ninguna otra compensación.

13. COMPENSACIÓN

El paciente no tendrá que pagar nada por cualquiera de las visitas realizadas durante el estudio. Usted no recibirá ninguna compensación económica por participar en este estudio.

14. PERSONA DE CONTACTO

Se le anima a que consulte con su medico del estudio cualquier duda sobre este estudio o este formulario de consentimiento, y debe recibir respuestas satisfactorias a todas sus preguntas. Si durante el estudio experimenta alguna lesión relacionada con la investigación o si tiene alguna pregunta adicional, deberá ponerse en contacto con:

Equipo Investigador:

Dra. Margarita Calonge Cano	Número de Teléfono: 983184750
Dr. José María Herreras Cantalapiedra	Número de Teléfono: 983184750
M ^a Jesús González García, PhD, OD	Número de Teléfono: 983184756
Marisa Tesón Yudego, OD.	Número de Teléfono: 983184761
Vicente Martín Montañez, OD.	Número de Teléfono: 983184761
Antonio Abengózar, OD	Número de Teléfono: 983184761

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

15. PARTICIPACIÓN

Usted dispondrá del tiempo suficiente para decidir sobre su participación en el estudio.

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede rechazar participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento, por cualquier motivo, sin que pierda ninguno de los derechos o beneficios a los que por otro lado tiene derecho. Si usted decide no participar en el estudio, o si decide abandonar el estudio antes de su finalización, su atención médica habitual en este centro no se verá perjudicada en modo alguno. El médico del estudio puede retirarle del estudio en cualquier momento. El IOBA puede suspender este estudio en cualquier momento si tiene razones para determinar que es lo adecuado.

16. INFORMACIÓN NUEVA

El personal del estudio le informará a usted o a su representante legalmente autorizado sobre cualquier información nueva acerca de la enfermedad de SOS o de la CERLab que pudiera conocerse durante el transcurso de esta investigación y que pudiera influenciar su voluntad de participar en el estudio. Se le entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para sus propios archivos antes de su participación en el estudio.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Título del Estudio: “Influencia de los factores ambientales en los test diagnósticos de la superficie ocular”

Número de estudio: IOBA-CERLab 001-2010

Al firmar abajo, yo declaro que:

- 1) He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.
- 2) He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas
- 3) Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento
- 4) Personal del equipo investigador principal: _____, Dirección: Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada, Valladolid; Número de Teléfono : 983 184 750; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación
- 5) He comprendido completamente que los representantes del patrocinador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros médicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
- 6) Acepto que mi médico de cabecera sea informado de mi participación en este estudio para obtener mis registros médicos.
- 7) Acepto comunicar a mi médico todos los efectos secundarios u otros cambios en mi salud y todos los cambios de mi tratamiento médico
- 8) Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

Nombre del Paciente

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por el paciente)

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Nombre del representante legalmente autorizado

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por el representante legalmente autorizado -si aplica-)

Nombre del Investigador Principal

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por el investigador Principal)

Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por la persona que explicó el consentimiento informado)

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

ANEXO II

- Título del Estudio:** Estudio clínico. “Influencia de los factores ambientales en los test diagnósticos de la superficie ocular” Estudio prospectivo, protocolizado, unicéntrico, randomizado y enmascarado.
- Nº de estudio:** IOBA-CERLab 001-2010
- Coordinador:** IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada)

1. INTRODUCCIÓN

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación clínica coordinado por el IOBA para el estudio de la influencia de los factores ambientales en los test empleados en clínica para el diagnóstico del Síndrome de Ojo Seco (SOS), enfermedad objeto de este estudio. El SOS es un trastorno multifactorial inflamatorio que afecta a la superficie ocular. Se trata de una enfermedad muy prevalente que afecta a millones de personas en todo el mundo y que implica un descenso significativo en la calidad de vida en estos pacientes debido a que causa molestias, mala calidad visual, inestabilidad de la película lagrimal y un daño potencial e irreversible de la superficie ocular debido al estado de inflamación en el que se encuentra la superficie ocular.

El SOS es una enfermedad que presenta muy baja correlación entre signos y síntomas, es decir, entre los hallazgos clínicos y las sensaciones de malestar que presenta el paciente, lo que dificulta tanto la clasificación y el diagnóstico de la enfermedad, como la búsqueda de tratamientos más adecuados.

Este formulario de consentimiento describe el estudio y su papel en dicho estudio. El investigador responderá todas las preguntas que tenga sobre este estudio o consentimiento informado. Por favor lea atentamente este formulario y realice todas las preguntas que tenga sobre la información que contiene.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio clínico es determinar las condiciones ambientales (Temperatura, Humedad y Presión Atmosférica) que pueden afectar la superficie ocular en tres poblaciones distintas (sujetos sanos, pacientes con la enfermedad de SOS y pacientes usuarios de lentes de contacto no diagnosticados de SOS pero que presentan sintomatología durante el uso de sus lentes de contacto) mediante el desarrollo de un “test de provocación” en una Cámara de Ambiente

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Controlado (CERLab), que nos permita inducir o aumentar la correlación entre signos y síntomas de la superficie ocular, evaluando los cambios que se producen tanto en la sintomatología como en la superficie ocular.

El fin del estudio es mejorar la capacidad diagnóstica de los test de que evalúan la superficie ocular, especialmente en la patología de SOS y que nos ayude a entender cuáles son las condiciones ambientales que más afectan al estado de la superficie ocular.

Serán necesarias TRES exposiciones dentro de la CERLab. La primera permitirá evaluar el estado de la superficie ocular en condiciones ambientales normales controladas. La segunda permitirá evaluar los cambios tanto en la sintomatología como en los signos clínicos debidos a la exposición a un ambiente con baja humedad relativa (similar a la que encontramos en zonas áridas) y la tercera permitirá evaluar los cambios en los signos y síntomas debidos a condiciones de baja presión atmosférica (similar a la presión atmosférica durante un vuelo).

Se le está pidiendo que participe en un estudio clínico que está diseñado como prospectivo, protocolizado, unicéntrico, randomizado y enmascarado.

Se plantea la realización de exposiciones controladas a diferentes condiciones ambientales. No se prueba la eficacia de ningún medicamento o se experimenta con ninguna nueva técnica quirúrgica.

3. DURACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL SUJETO

El estudio finalizará cuando el último paciente incluido finalice las exposiciones a las condiciones ambientales de estudio, lo que supondrán un total de 4 visitas de estudio (incluyendo la visita de inclusión). Los datos obtenidos serán recogidos para realizar el estudio estadístico y la posterior divulgación científica. No se realizará seguimiento de los pacientes en el tiempo.

4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para que se considere su inclusión en el estudio, deberá cumplir por lo menos los siguientes requisitos:

Grupo 1 (G1.Control)

- Varón o mujer mayor de edad y con capacidad legal para entender y firmar el consentimiento informado.
- NO usuarios de lentes de contacto o con un uso esporádico de las mismas (2 días a la semana o menos), y que acepten el compromiso de suspender el uso de las mismas 2 días antes de entrar a participar en el estudio, así como durante el tiempo que dure el mismo.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- Haber obtenido una puntuación en la versión en español del cuestionario para ojo seco “Ocular Surface Disease Index – OSDI[®]” menor o igual a 12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína ≤ 1 (escala Oxford).
- No tener alterados dos o más de los siguientes test:
 - Test de Rojo de Fenol “Phenol Red Thread Test – PRTT” > 20 milímetros a los 15 segundos.
 - Tiempo de ruptura lagrimal “Tear Break-up Time – TBUT” > 7 segundos.
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina ≤ 1 (escala Oxford).
 - Test de Schirmer sin anestesia tópica ≥ 5 milímetros a los 5 minutos.
- Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de las técnicas diagnósticas que se precisen.
- Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.

Grupo 2 (G2.SOS leve - moderado)

- Varón o mujer mayor de edad y con capacidad legal para entender y firmar el consentimiento informado.
- Diagnóstico de SOS leve-moderado mediante los criterios clínicos establecidos en el protocolo.
- NO usuarios de lentes de contacto o con un uso esporádico de las mismas (2 días a la semana o menos), y que acepten el compromiso de suspender el uso de las mismas 2 días antes de entrar a participar en el estudio, así como durante el tiempo que dure el mismo.
- Haber obtenido una puntuación en la versión en español del cuestionario para ojo seco “Ocular Surface Disease Index – OSDI[®]” mayor de 12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína < 3 (escala Oxford).
- No tener alterados dos o más de los siguientes test:
 - Test de Rojo de Fenol “Phenol Red Thread Test – PRTT” > 20 milímetros a los 15 segundos.
 - Tiempo de ruptura lagrimal “Tear Break-up Time – TBUT” > 7 segundos.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- Tinción conjuntival con verde de lisamina ≤ 1 (escala Oxford).
- Test de Schirmer sin anestesia tópica > 3 milímetros a los 5 minutos.
- Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de las técnicas diagnósticas y que se precisen.
- Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.

Grupo 3 (G3.SOS severo)

- Varón o mujer mayor de edad y con capacidad legal para entender y firmar el consentimiento informado.
- Diagnóstico de SOS severo mediante los criterios clínicos establecidos en el protocolo.
- Usuarios de lentes de contacto que presenten sintomatología ocular únicamente durante el uso de las mismas y que acepten el compromiso de suspender su uso 2 días antes de entrar a participar en el estudio, así como durante el tiempo que dure el mismo.
- Haber obtenido una puntuación en la versión en español del cuestionario para ojo seco “Ocular Surface Disease Index – OSDI[®]” mayor de 12 puntos.
- Tinción corneal con fluoresceína ≥ 3 (escala Oxford y Baylor).
- Tener alterados dos o más de los siguientes test:
 - Test de Rojo de Fenol “Phenol Red Thread Test – PRTT” ≤ 20 milímetros a los 15 segundos.
 - Tiempo de ruptura lagrimal “Tear Break-up Time – TBUT” ≤ 7 segundos.
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina > 1 (escala Oxford).
 - Test de Schirmer sin anestesia tópica ≤ 3 milímetros a los 5 minutos.
- Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de las técnicas diagnósticas que se precisen.
- Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Usted NO podrá participar en el estudio si:

Grupo 1 (G1.Control)

- Presenta cualquier patología de superficie ocular.
- Ha sido sometido a cualquier cirugía de superficie ocular.
- Utiliza medicación tópica o sistémica que se considere que pueda influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantenga estable (tanto en tipo de medicación como en dosis) a lo largo del estudio.
- Falta de compromiso de suspender el uso de la medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos 4 horas antes de cada una de las visitas del estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Cualquier enfermedad (ej. Claustrofobia) que, a juicio del equipo médico del IOBA, no le permita someterse a cualquiera de las condiciones ambientales creadas en la CER-Lab o que pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados. (ej. Claustrofobia).
- Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.

Grupo 2 (G2.SOS leve - moderado)

- Presenta una patología de la superficie ocular diferente al SOS.
- Ha sido sometido a cirugía ocular en los tres meses previos al estudio.
- Utiliza medicación tópica o sistémica que se considere que pueda influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantenga estable (tanto en tipo de medicación como en dosis) a lo largo del estudio.
- Falta de compromiso de suspender el uso de la medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos 4 horas antes de cada una de las visitas del estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Cualquier enfermedad (ej. Claustrofobia) que, a juicio del equipo médico del IOBA, no le permita someterse a cualquiera de las condiciones ambientales creadas en la CER-Lab o que pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados.
- Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.

Grupo 3 (G3.SOS severo)

- Presenta cualquier patología de la superficie ocular diferente al SOS.
- Ha sido sometido a cirugía ocular en los tres meses previos al estudio.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- Utiliza medicación tópica o sistémica que se considere que pueda influir en el estado de la superficie ocular y que no se mantenga estable (tanto en tipo de medicación como en dosis) a lo largo del estudio.
- Falta de compromiso de suspender el uso de la medicación tópica (incluidas las lágrimas artificiales) al menos 4 horas antes de cada una de las visitas del estudio.
- Imposibilidad de realizar cualquiera de los procedimientos del estudio.
- Cualquier enfermedad (ej. Claustrofobia) que, a juicio del equipo médico del IOBA, no le permita someterse a cualquiera de las condiciones ambientales creadas en la CER-Lab o que pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados.
- Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.

Usted podrá retirarse del estudio siempre que lo desee.

6. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

A – Visita de inclusión

En su primera visita de estudio se le examinará para garantizar que usted es elegible para participar en el estudio y se recogerá información sobre usted:

- Se hablará con usted sobre el estudio, el investigador responderá todas las preguntas que tenga sobre este estudio o sobre el consentimiento informado y se le pedirá que firme este formulario de consentimiento antes de iniciar su participación en este estudio.
- Se le preguntará sobre su actual estado de salud, sus antecedentes médicos e historia ocular (incluyendo antecedentes de lesiones, enfermedades y cirugía). También se le harán algunas preguntas sobre los medicamentos que pueda estar tomando (tanto prescritos como sin prescripción médica).
- Se le pedirá que cumplimente 1 cuestionario sobre sus síntomas oculares.
- Si usted es susceptible de ser candidato a formar parte del grupo 1 de estudio, se le someterá además a los siguientes exámenes oculares en ambos ojos a menos que se indique de otra manera:
 - ★ Medición del tiempo de ruptura lagrimal (T-BUT) para la evaluación de la estabilidad lagrimal.
 - ★ Tinciones corneales y conjuntivales con 2 tipos de colorantes (fluoresceína sódica y verde de lisamina).
 - ★ Medición de la producción de lágrima, mediante la inserción en los fondos de saco inferiores de hilos estandarizados del test de rojo de fenol.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

- ★ Medición de la producción de lágrima, mediante la inserción en los fondos de saco inferiores de tiras estandarizadas del test de la lágrima de Schirmer.

Visitas de Exposición (V1-V3)

- El procedimiento será llevado a cabo en la CERLab.
- Se le realizarán una serie de test de evaluación de la superficie ocular en la sala de exploración de la CER-LAB (pre-visita X) antes de la entrada a la CERLab y a la exposición a las condiciones ambientales de estudio.
- Posteriormente, entrará dentro de la CERLab en donde deberá permanecer expuesto a las condiciones ambientales de estudio que correspondan a su visita y que serán previamente programadas (ver condiciones ambientales). El tiempo de permanencia en la CERLab oscilará entre las 2 ½ y las 3 horas, periodo que engloba el tiempo necesario para alcanzar la estabilización y el estado óptimo de las variables de exposición, el tiempo de exposición a las variables ambientales establecidas (2 horas), y el tiempo de retorno al estado inicial. La actividad visual a realizar durante la permanencia en la CERLab será la visualización de un documental/película en una televisión convencional LED.
- Tras la exposición, la misma batería de test de evaluación de la superficie ocular realizada antes de entrar en la cámara será realizada de nuevo en la sala de exploración de la CERLab (post- visita X).
- El orden de las visitas será asignado al azar para reducir la subjetividad del paciente a las diferentes condiciones ambientales y garantizar un estudio enmascarado.
- El ojo seleccionado para realizar las medidas en el grupo control será aquel de los dos que supere los criterios de inclusión y exclusión del estudio para ese grupo. En caso de que ambos ojos puedan ser candidatos, éste se elegirá aleatoriamente.
- El ojo seleccionado para realizar las medidas en los grupos de ojo seco leve-moderado y severo será aquel que presente mayor grado de tinción corneal. En caso de que ambos ojos presenten el mismo grado de tinción corneal, el ojo de estudio será el más sintomático (seleccionado por el paciente). El ojo de estudio será seleccionado aleatoriamente en caso de que el paciente no presente uno de los dos ojos como más sintomático.
- La temperatura será constante durante las diferentes condiciones ambientales ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).
- La CERLab se mantendrá con una iluminación suave predeterminada y una corriente de aire circulará sobre la zona de sus ojos durante todas las exposiciones.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

➤ Todos los test de evaluación de la superficie ocular serán realizados únicamente en el ojo seleccionado. Los test de evaluación de la superficie ocular que se realizarán durante las visitas pre- y post- serán los siguientes y en el orden que se indica a continuación:

1. Cuestionario SIDEQ con escalas de valoración visual (VAS) de 0 a 10.
2. Medida de la osmolaridad lagrimal.
3. PRTT.
4. Evaluación de la hiperemia bulbar en las áreas de exposición (nasal y temporal).
5. Fotografía de la conjuntiva nasal y temporal.
6. Recogida de lágrima para análisis de citoquinas (2µl).
7. Tiempo de espera de diez minutos.
8. Instilación de fluoresceína (5µl).
9. T-BUT.
10. Evaluación de la tinción corneal con fluoresceína con filtro azul cobalto.
11. Tinción con tira de verde de lisamina humectada con 15 µl de suero fisiológico.
12. Tiempo de espera de un minuto.
13. Evaluación de la tinción conjuntival con verde de lisamina.
14. Test de Schirmer sin anestesia.
15. Aclarado de ambos ojos con 20 ml de suero fisiológico (10 ml/ojo).

2 minutos



Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Condiciones Ambientales

Condición Ambiental A: Condiciones estándar.

Humedad Relativa: 45% (moderada).

Presión: Presión atmosférica de Valladolid (930 mbar – 690 m sobre el nivel del mar).

Condición Ambiental B: Baja Humedad Relativa

Humedad Relativa: 5% (baja).

Presión: Presión atmosférica de Valladolid (930 mbar – 690 m sobre el nivel del mar).

Condición Ambiental C: Baja Humedad Relativa + Baja Presión Atmosférica.

Humedad Relativa: 5% (baja).

Presión: Presión atmosférica de una cabina de avión (750 mbar – 2500 m sobre el nivel del mar). La presión del externa del aire es alrededor de 1/3 menos de la presión a nivel del mar.

F- Visitas sin programar

Si usted, o su médico del estudio cree necesario realizar otra visita, entre visitas programadas, se programará otra cita con usted. Si su médico lo estima necesario podrá precisar pruebas adicionales.

G- Sus Responsabilidades

Usted deberá acudir todas las visitas del estudio y avisar al centro, tan pronto como pueda, si por cualquier motivo no pudiera acudir a alguna de estas visitas. Se le pedirá que comunique cualquier cambio en su medicación (con o sin prescripción médica) y comunicar a su médico cualquier cambio que usted experimente. Deberá responder a todas las preguntas de los cuestionarios sinceramente.

7. RIESGOS Y MOLESTIAS RAZONABLEMENTE PREVISIBLES PARA PARTICIPANTE

Riesgos del Estudio

Los pacientes del presente estudio serán expuestos durante un breve periodo de tiempo a las variables ambientales de exposición seleccionadas, siendo éstas, condiciones ambientales a las que cualquier persona puede estar expuesto en su vida cotidiana, por ejemplo, durante la permanencia en una estancia con

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

calefacción o aire acondicionado, viajes a países con humedades relativas bajas (ej. Egipto, Libia,...), o las condiciones ambientales que se encuentran en la cabina de un avión durante un vuelo. La realización de este estudio puede suponer un empeoramiento TEMPORAL Y REVERSIBLE de la sintomatología y los signos clínicos del paciente como pueden ser incomodidad o sequedad ocular, que disminuirán a medida que pase el tiempo desde la exposición a las variables ambientales y que podrán paliarse con el uso de lágrimas artificiales.

Si usted tiene alguna pregunta o preocupación sobre cualquiera de estos riesgos, por favor consulte a su médico. Si experimenta alguna enfermedad o molestia durante el estudio, debe notificárselo a su médico del estudio.

10. CONFIDENCIALIDAD

Puede publicarse un informe de los resultados de este estudio o enviarse a las autoridades sanitarias pertinentes, pero su nombre no aparecerá en estos documentos. De acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, su confidencialidad será debidamente respetada si la información es transferida a otros países. Su nombre puede ser revelado a las autoridades sanitarias gubernamentales como la AGEMED (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) o a los Comités Éticos Independientes (CEICs) en caso de que necesiten inspeccionar sus archivos médicos. Se tomarán las medidas oportunas para mantener la confidencialidad de los archivos médicos y de la información personal.

11. FOTOGRAFÍAS

Durante el estudio pueden realizarse fotografías de sus ojos. Si usted no quiere que se le hagan estas fotografías, no podrá participar en el estudio.

El IOBA puede utilizar las fotografías que se han tomado para evaluar los resultados del estudio y/o para investigación general, enseñanza u objetivos informativos. Como las fotografías forman parte de los datos del estudio, también estarán disponibles para su revisión por parte de las agencias sanitarias reguladoras en todo el mundo (como la AGEMED). El IOBA será el propietario de los derechos de autor de las fotografías.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Por favor, señale **una** casilla:

- Si, autorizo que me fotografíen los ojos. El IOBA también tiene mi permiso para utilizar estas fotografías en publicaciones científicas y en congresos nacionales e internacionales.
- Si, autorizo que me fotografíen los ojos. Sin embargo NO autorizo a que se utilicen estas fotografías en publicaciones científicas y en congresos nacionales e internacionales.
- No autorizo a que me fotografíen los ojos. He decidido no participar en el estudio.

13. COMPENSACIÓN AL TRATAMIENTO MÉDICO

Si Usted experimenta una reacción adversa y/o complicación como resultado directo de los procedimientos realizados en este estudio, el IOBA será responsable económico de los costes de los tratamientos médico y quirúrgico habituales proporcionados como resultado de dicho daño. El tratamiento apropiado estará disponible si se requiere. El promotor no dará ninguna otra compensación.

13. COMPENSACIÓN

El paciente no tendrá que pagar nada por cualquiera de las visitas realizadas durante el estudio. Usted no recibirá ninguna compensación económica por participar en este estudio.

14. PERSONA DE CONTACTO

Se le anima a que consulte con su medico del estudio cualquier duda sobre este estudio o este formulario de consentimiento, y debe recibir respuestas satisfactorias a todas sus preguntas. Si durante el estudio experimenta alguna lesión relacionada con la investigación o si tiene alguna pregunta adicional, deberá ponerse en contacto con:

Equipo Investigador:

Dra. Margarita Calonge Cano	Número de Teléfono: 983184750
Dr. José María Herreras Cantalapiedra	Número de Teléfono: 983184750
M ^a Jesús González García, PhD, OD	Número de Teléfono: 983184756
Marisa Tesón Yudego, OD.	Número de Teléfono: 983184761
Vicente Martín Montañez, OD.	Número de Teléfono: 983184761
Antonio Abengózar, OD	Número de Teléfono: 983184761

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

15. PARTICIPACIÓN

Usted dispondrá del tiempo suficiente para decidir sobre su participación en el estudio.

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede rechazar participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento, por cualquier motivo, sin que pierda ninguno de los derechos o beneficios a los que por otro lado tiene derecho. Si usted decide no participar en el estudio, o si decide abandonar el estudio antes de su finalización, su atención médica habitual en este centro no se verá perjudicada en modo alguno. El médico del estudio puede retirarle del estudio en cualquier momento. El IOBA puede suspender este estudio en cualquier momento si tiene razones para determinar que es lo adecuado.

16. INFORMACIÓN NUEVA

El personal del estudio le informará a usted o a su representante legalmente autorizado sobre cualquier información nueva acerca de la enfermedad de SOS o de la CERLab que pudiera conocerse durante el transcurso de esta investigación y que pudiera influenciar su voluntad de participar en el estudio. Se le entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para sus propios archivos antes de su participación en el estudio.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Título del Estudio: “Influencia de los factores ambientales en los test diagnósticos de la superficie ocular”

Número de estudio: IOBA-CERLab 001-2010

Al firmar abajo, yo declaro que:

- 9) He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto, Versión 1.4 de 10 Octubre 2010.
- 10) He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas
- 11) Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento
- 12) Personal del equipo investigador principal: _____, Dirección: Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada, Valladolid; Número de Teléfono : 983 184 750; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación
- 13) He comprendido completamente que los representantes del patrocinador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros médicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
- 14) Acepto que mi médico de cabecera sea informado de mi participación en este estudio para obtener mis registros médicos.
- 15) Acepto comunicar a mi médico todos los efectos secundarios u otros cambios en mi salud y todos los cambios de mi tratamiento médico
- 16) Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

Nombre del Paciente

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por el paciente)

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

Nombre del representante legalmente autorizado

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por el representante legalmente autorizado -si aplica-)

Nombre del Investigador Principal

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por el investigador Principal)

Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

Firma _____

Fecha _____

(Debe ser firmado y fechado por la persona que explicó el consentimiento informado)

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Estudio IOBA-CERLab 001-2010, Versión 1.3 de 04 Junio 2010.

ANEXO III

Influência de fatores ambientais sobre os testes de diagnóstico da superfície ocular

Clinical & Experimental Optometry Research Lab - Universidade do Minho e o Instituto de Oftalmobiologia Aplicada – IOBA

CONSENTIMENTO INFORMADO

O presente documento visa informá-lo acerca dos objectivos, métodos, benefícios previstos e riscos potenciais inerentes ao estudo para o qual se está a voluntariar, intitulado “Influência de fatores ambientais sobre os testes de diagnóstico da superfície ocular”.

O estudo é realizado em parceria entre o Instituto de Oftalmobiologia Aplicada (IOBA) da Universidad de Valladolid (UVa, Espanha) e o Centro de Física da Universidade do Minho (Uminho), no âmbito de um Doutoramento Europeu da UVa. O IOBA é uma das estruturas mais bem reputadas no estudo da patologia da superfície ocular, e é atualmente um dos únicos centros no Mundo com capacidade para recriar condições ambientais alteradas artificialmente em “câmara de ambiente controlado”.

Este estudo pretende aferir o impacto que possam ter as diferenças ambientais entre a cidade de Valladolid (Norte de Espanha) e Braga nas características das lágrimas de voluntários saudáveis. Para isso serão recrutados aproximadamente 25 voluntários que cumpram os critérios de inclusão que se seguem: ter entre 55 a 70 anos, não padecer doenças oculares conhecidas, não ter sido submetido a cirurgia ocular e não estar a realizar nenhum tratamento médico.

Os métodos de exame que se irão realizar são de utilização comum na rotina clínica pelo que não se espera que exista qualquer risco acrescido aquele em que o voluntário poderá incorrer no âmbito de uma normal consulta de optometria ou de oftalmologia. Não será utilizado qualquer medicamento, nem será alterada a visão temporariamente em resultado da avaliação. O exame irá demorar perto de 30 minutos.

A declaração de consentimento encontra-se de acordo com a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000).

Deverá de comparecer à consulta até 3 vezes durante um tempo máximo de 15 dias com uma separação mínima entre as visitas de 48 horas. Em cada consulta deverá demorar aproximadamente 30 minutos. A primeira visita pode demorar 45 minutos/1 hora. As três avaliações deverão de ser realizadas no mesmo período do dia. A realização destas consultas é de vital importância para a boa realização do projecto pelo que estas serão marcadas de conformidade com a sua disponibilidade.

Declaração de conformidade e compromisso:

O _____ voluntário considera que lhe foram explicados todos os aspectos relevantes sobre aos testes e procedimentos do estudo mesmo por períodos limitados de tempo e teve oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que surgiram em relação aos testes e procedimentos a que irá ser sujeito. Compromete-se igualmente a seguir as instruções dadas pelo investigador *María Luisa Tesón Yudego*, cumprir os procedimentos de estudo e assistir dentro do horário previsto para a realização das consultas de acompanhamento conforme combinado. O paciente declara que lhe foi prestada informação adequada, e foi igualmente dada oportunidade de colocar qualquer questão, tendo sido respondida de modo satisfatório. Compreende também que pode recusar a qualquer momento a sua participação ou continuidade no estudo e autoriza ainda a que os dados sejam publicados de forma anónima com os fins científicos ou académicos que a equipa investigadora considerar apropriado.

Braga, _____ de _____ de 2012

O voluntário: _____
Assinatura: _____

O investigador: *María Luisa Tesón Yudego* (mteson@joba.med.uva.es) Assinatura: _____

Contactos Investigador Principal: José Manuel González-Méijome
jgmejome@fisica.uminho.pt Telm:934794751

A declaração de consentimento encontra-se de acordo com a “Declaração de Helsínquia” da Associação Médica Mundial (Helsínquia 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996 e Edimburgo 2000).

ANEXO IV



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Evaluación del paciente

Anamnesis

Nombre:

Fecha:

Historia de lentes de contacto (tache lo que proceda)

1. ¿Ha usado alguna vez lentes de contacto? SI NO
(Si ha respondido no, pase a la pregunta número 6)
2. ¿Las usa actualmente? SI NO
¿Cuánto tiempo lleva sin usarlas? _____
3. ¿Cuánto tiempo las ha usado?
4. ¿Cuánto tiempo tiene la pareja que está usando?
Horas diarias de uso: _____
5. Tipo: Blandas Tóricas Desechables Semirrígidas
 Duras
6. ¿Es fumador? SI NO Número de cigarrillos al día:

Salud general (tache lo que proceda)

7. Tiene o ha padecido: anemia, diabetes, infecciones frecuentes de oído o garganta, sinusitis, artritis, reumatismo, trastorno de la tiroides, hipertensión arterial, enfermedades de la piel, Enfermedades del colágeno, asma, bronquitis, enfisema
8. ¿Practica submarinismo? SI NO Última vez _____
9. ¿Padece alguna alergia? SI NO
¿Cuál? _____
10. ¿Toma normalmente o está tomando alguna medicación? (aunque no sea para los ojos)
 SI NO ¿Cuál? _____ ¿Para qué? _____ ¿Desde cuándo? _____
11. ¿Usa lágrimas artificiales? SI NO ¿Cuántas veces al día? _____
¿A qué hora se ha puesto la última gota? _____
12. Si es mujer, ¿está tomando anticonceptivos orales? SI NO
¿Desde cuándo? _____
13. ¿Está embarazada? SI NO

Historial Visual

14. ¿A que edad empezó a usar gafas? Última
revisión: _____
15. ¿Ultimo cambio de la graduación de los cristales?
¿Ve bien con ellas? _____

16. ¿Ha tenido o tiene alguno de los siguientes procesos oculares? (tache lo que proceda)

	OD	OI	¿Hace cuánto tiempo?
Ojo vago	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Estrabismo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enfermedad de retina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Úlcera corneal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Conjuntivitis frecuentes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Defecto epitelial recurrente	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Queratocono	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ojo seco severo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Enfermedad superficie ocular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glaucoma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cataratas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cirugía ocular (especificar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Otros (especificar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

17. ¿Alguien de su familia ha tenido alguno de los procesos oculares anteriormente descritos? (especificar)

18. Si es mujer, ¿se encuentra en la pre menopausia? SI

NO

Medicación: _____

19. ¿Se encuentra en la menopausia? SI NO

20. Fecha de su último periodo: _____

ANEXO V

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)

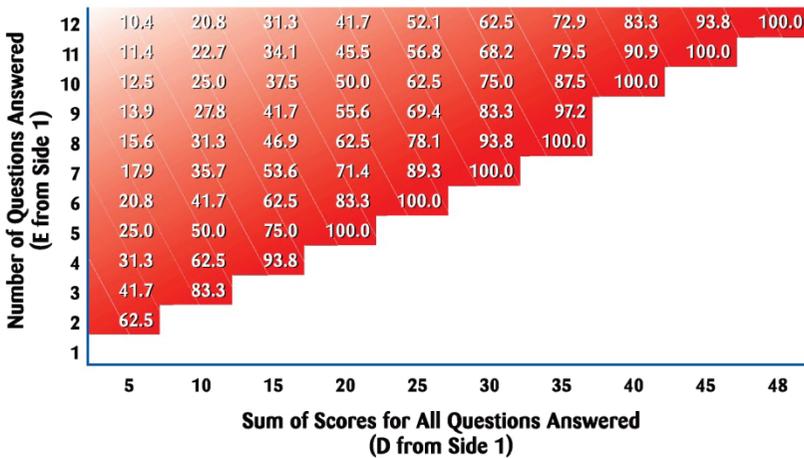
Please turn over the questionnaire to calculate the patient's final OSDI[®] score.

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.



Normal Mild Moderate Severe

*Values to determine dry eye disease severity calculated using the OSDI® formula:
 $OSDI^{\circ} = \frac{(\text{sum of scores}) \times 25}{(\# \text{ of questions answered})}$

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.



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

ANEXO VI



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 hacia 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 OJO

ANEXO VII

CUESTIONARIO SIDEQ MODIFICADO VISITA

OJO DE ESTUDIO

NUMERO DE
SUJETO

**ESPACIO RESERVADO PARA LA ETIQUETA
DE DATOS
(PEGAR AQUÍ)**

Fecha _____
Hora de inicio del Cuestionario _____

Por favor, indique con una raya vertical en las siguientes escalas el grado en el que siente cada uno de los siguientes síntomas en este momento, siendo 0 no sentir nada el síntoma y 10 la máxima sensación de ese síntoma.

Sequedad



Sensación de cuerpo extraño en el ojo



Quemazón / Escozor



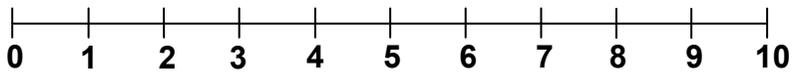
Dolor



Picor



Sensibilidad a la luz



Visión borrosa



Otros (especificar)



ANEXO VIII



Nome e apelidos: _____ N° Historia _____

Inquérito sobre deficiência da superfície ocular

(versão aprovada em castelhano do “Ocular Surface Disease Index” –OSDI®- traduzida para Português)

Por favor, responda às seguintes perguntas, assinalando com uma cruz (X) a opção que melhor descreve a sua resposta

Você já experimentou algum dos seguintes sintomas durante a última semana?

	Sempre (4)	Quase sempre (3)	Metade do tempo (2)	Às vezes (1)	Nunca (0)
1. Olhos sensíveis à luz					
2. Sensação de areia nos olhos					
3. Dor nos olhos (dor / ardência)					
4. Visão desfocada					
5. Má visão					

Os problemas oculares têm limitado a sua capacidade para realizar qualquer uma das seguintes atividades durante a semana passada?

	Sempre (4)	Quase sempre (3)	Metade do tempo (2)	Às vezes (1)	Nunca (0)	Não aplicável
6. Leitura.						
7. Conduzir à noite						
8. Utilizar um computador ou uma caixa automática						
9. Ver televisão						

Você já sentiu desconforto nos olhos, em qualquer das seguintes situações durante a última semana?

	Sempre (4)	Quase sempre (3)	Metade do tempo (2)	Às vezes (1)	Nunca (0)	Não aplicável
10. Quando está vento						
11. Em locais com baixa humidade (muito seco)						
12. Com ar condicionado						

MARQUE COM UM X O OLHO QUE TEM MAIS SINTOMAS:

OLHO DIREITO OLHO ESQUERDO AMBOS OS OLHOS

ANEXO IX

INQUÉRITO SIDEQ MODIFICADO VISITA

OJO DE ESTUDIO

NUMERO DE SUJETO

Nome _____

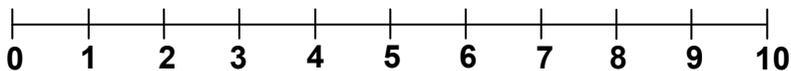
Apelidos _____

Data _____

Hora de início do Inquérito _____

Por favor, indique com uma linha vertical nas escalas seguintes, o grau em que sentir cada um dos seguintes sintomas neste momento, sendo que 0 representa que não sente nada esse sintoma e 10 o incómodo mais elevado.

Secura Ocular



Sensação de corpo estranho no olho



Ardência /Picadelas



Dor



Comichao



Sensibilidade à luz



Visão desfocada



Outros (especifique)



