

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

Departamento de Optometría y Visión



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo, seguridad y eficacia de una solución humectante
con *Aloe vera* e hidroxipropilmetilcelulosa.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Candela Rodríguez Pomar

Directores

Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez

Alba Martín Gil

Alejandro Martínez Águila

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ÓPTICA Y OPTOMETRÍA

Departamento de Optometría y Visión



**DESARROLLO, SEGURIDAD Y EFICACIA DE UNA SOLUCIÓN
HUMECTANTE CON *ALOE VERA* E
HIDROXIPROPILMETILCELULOSA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Candela Rodríguez Pomar

Madrid

*A loita nobre e leal das
ideas é o que asegura o progreso.*

Sempre en Galiza, Castelao.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar dándole las gracias al Dr Carracedo por meterme en esta movida. Si algo creo que hago bien, es rodearme de los mejores. Yo venía a hacer un máster a Madrid, para volverme al año siguiente a mi querida Galicia. Si el covid - 19 permite que mi madre venga a ver la tesis, vas a tener que darle explicaciones de por qué llevo ya casi 6 años aquí. Tienes mucha culpa.

Al Dr Jesús Pintor, el integrante principal del *lobby* gallego y mejor embajador de Vigo en Madrid, porque ver una sola clase suya me sirvió para cambiar todas las optativas del máster. No he vuelto a ver a nadie explicando cosas tan complicadas de una forma tan sencilla. Te echamos mucho de menos por aquí.

A mis compañeros del Máster, en especial a María y a Juanqui, aunque ahora os tengo un poco lejos me acuerdo mucho de vosotros y de la acogida que me distéis en Madrid como recién llegada. A todos los compañeros del laboratorio, en especial a Bego, María Pérez, Fer, Hanan, María Serramito, Cristina y Carlos.

A Alba, por las risas en el laboratorio y durante el trabajo fin de máster, por las excursiones improvisadas en los congresos. Cada vez que monto contigo en cualquier medio de transporte, no sé cómo lo hacemos, pero nos perdemos. A Alex, por las aventuras en Avizor. Me gustaría haber estado cuando lanzaste el Methocel al techo. Mira que lo intento rompiendo material fungible, pero no consigo superarte. Esta es vuestra segunda tesis, menuda chapa os he dado los últimos meses.

Al Dr Santiago Ríos, por todo lo que estoy aprendiendo con él en Avizor y todo lo que le queda por enseñarme.

Al resto de compañer@s de Avizor, en especial a María, la estrella del departamento de Regulatory. Gracias por todas las dudas resueltas del MDR en el 179 o teléfono de la esperanza. A Vero y a Cris, las jefazas de Garantía de calidad, de mayor quiero ser como vosotras en las auditorías.

A mi tío John, por las correcciones de las traducciones y la puesta en común de viajes y libros, siempre es un gusto charlar contigo eres toda una inspiración para mí.

A toda mi familia, en especial a mi madre y a mis abuelos, por mandarme provisiones a Madrid y encargarse de que nunca me falte producto Ourensano en la capital. A mis dos hermanos Olalla y Roi, porque sois lo más. Ojalá os tuviera más cerca. La verdad que nos hemos organizado un poco mal con eso de los sitios en los que vivimos. Me viene guay que uno viva en la playa y la otra en el altiplano.

A todos mis amigos de Madrid, mi pequeño comando Galicia en la capital. Os adoro, me haceis muy feliz, con vosotros siento que estoy todo el rato en casa y desaparece la morriña. A los dos adoptados del comando Galicia, Desi y Carlos, os concedo en este escrito oficial la doble nacionalidad, os la merecéis. Gracias Carlos, por hacerme la comida durante el confinamiento, por traerme las estrellas a la mesa de trabajo y por cambiarme mi bici por la bicimad de vuelta a casa tras las raves durante la desescalada en San Vicente Ferrer. Te prometí que lo ponía oficialmente por aquí y lo cumplo.

Y finalmente, quiero agradecer y dedicar esta tesis a la mayor inspiración para mí desde 2010. **A mis chicas terremoto.** Os quiero. Sois mi comando Galicia en el norte. Os echo mucho de menos y me gustaría estar más de lo que puedo con vosotras, pero siempre que nos vemos, parece que no ha pasado el tiempo y eso es muy buena señal. Creo que con esta dedicatoria supero la del TFG de Carlota...

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AEMPS = Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ARN = Ácido ribonucleico

ARNm = ARN mensajero

AV = Agudeza visual

BCVA = *Best Corrected Visual Acuity* (Mejor agudeza visual con corrección)

Ca²⁺ = Ión calcio

CEIC = Comité de Ética de Investigaciones Clínicas

Cl⁻ = Ión cloro

CLT = *Cell Layer Thickness* (Espesor celular)

CLDEQ = *Contact Lens Dry Eye Questionnaire*

CMC = Carboximetilcelulosa

DEQ = *Dry Eye Questionnaire*

DEQ – 5 = *Dry Eye Questionnaire - 5* (versión 5 preguntas)

DEQ – 8 = *Dry Eye Questionnaire - 8* (versión 8 preguntas)

DMSO = Dimetilsulfóxido

EDTA = *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilén-diamino tetraacético)

ELISA = *Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay* (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima)

EOS = Enfermedad de ojo seco

ETDRS = *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (Estudio de tratamiento precoz de la retinopatía diabética)

FBS = *Fetal Bovine Serum* (Suero Fetal Bovino)

ABREVIATURAS

Fe^{+2} = Ión hierro

H_2SO_4 = Ácido sulfúrico

HA = Hialuronato sódico

HaCaT = *Human Transformed Aneuploid Immortal Keratinocyte Cell Line*
(Queratinocitos aneuploides inmortales transformados humanos)

HCO_3^- = Anión bicarbonato

HP-Guar = Hidroxipropilguar

HPMC = Hidroxipropilmetilcelulosa

IgA = Inmunoglobulina A

IgG = Inmunoglobulina G

IgM = Inmunoglobulina M

IL-1 α = Interleuquina – 1 alfa

IL-1 β = Interleuquina – 1 beta

IL-2 = Interleuquina – 2

IL-6 = Interleuquina – 6

IL-8 = Interleuquina – 8

IL-10 = Interleuquina – 10

JNK = *Kinase Jun N – terminal* (Quinasa Jun N- Terminal)

K^+ = Ión potasio

KCl = Cloruro potásico

MAPK = *Mitogen Activated Protein Kinases* (Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos)

Marcado CE = Marcado de Conformidad Europea

MCH = *Mucin Cloud Height* (Altura de la nube de mucina)

MDD = *Medical Device Directive* (Directiva de Productos Sanitarios)

MEM = *Minimum Essential Medium* (Medio Esencial Mínimo)

Mg²⁺ = Ión magnesio

MMP-9 = *Matrix metalloproteinase – 9* (Metaloproteinasa de matriz – 9)

MMPs = *Matrix metalloproteinases* (Metaloproteinasas de matriz)

Mn²⁺ = Ión manganeso

MTT = 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difenil tetrazolio bromuro

MUC1 = Glicoproteína transmembrana Mucina - 1

MUC2 = Glicoproteína secretora Mucina - 2

MUC4 = Glicoproteína transmembrana Mucina - 4

MUC5AC = Glicoproteína secretora Mucina - 5AC

MUC5B = Glicoproteína secretora Mucina – 5B

MUC6 = Glicoproteína secretora Mucina – 6

MUC7 = Glicoproteína soluble Mucina – 7

MUC16 = Glicoproteína transmembrana Mucina -16

MUC19 = Glicoproteína secretora Mucina – 19

Na⁺ = Ión sodio

NaCl = Cloruro sódico

NADPH = *Nicotinamide - Adenine Dinucleotide Phosphate* (Nicotiamida – Adenina Dinucleótido Fosfato)

NaFL = Fluoresceína sódica

NFKB = *Nuclear Factor Kappa B* (Factor Nuclear Kappa B)

ABREVIATURAS

PES = Polietersulfona

PIO = Presión intraocular

PO_4^{3-} = Anión fosfato

PTFE = Politetrafluoroetileno

PVA = Alcohol polivinílico

PVP = Polivinilpirrolidona

SIgA = Inmunoglobulina A secretora

SIRC = *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (Línea celular inmortal de epitelio corneal de conejo)

Tinción PAS – hematoxilina = Tinción *Periodic Acid Schiff* – Hematoxilina

TFBUT = *Tear Film Break Up Time* (Tiempo de ruptura lagrimal)

TFSQ = *Tear Film Surface Quality* (Calidad de la superficie de película lagrimal)

TNF – α = *Tumor Necrosis Factor – alpha* (Factor de necrosis tumoral alfa)

UV = Ultravioleta

UVA = Ultravioleta A

UVB = Ultravioleta B

UVC = Ultravioleta C

VAS = *Visual Analogue Scale* (Escala Análoga Visual)

Zn^{2+} = Ión zinc

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	24
RESUMEN	29
SUMMARY	32
I. INTRODUCCIÓN	37
1. LA SUPERFICIE OCULAR	37
2. LA PELÍCULA LAGRIMAL	37
2.1 ESTRUCTURA DE LA PELÍCULA LAGRIMAL	38
2.2 COMPOSICIÓN DE LA PELÍCULA LAGRIMAL	39
2.3 HOMEOSTASIS DE LA PELÍCULA LAGRIMAL	47
3. LA CÓRNEA	48
4. LA CONJUNTIVA	50
4.1 CITOLOGÍAS DE IMPRESIÓN CONJUNTIVAL	52
5. IRRITACIÓN OCULAR Y ENFERMEDAD DE OJO SECO	55
5.1 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE OJO SECO	58
5.2 INFLAMACIÓN ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE OJO SECO	60
6. SUSTITUTOS LAGRIMALES	62
6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUSTITUTOS LAGRIMALES	62
6.1.1 PROPIEDADES FÍSICO – QUÍMICAS DE LA PELÍCULA LAGRIMAL Y DE LOS SUSTITUTOS LAGRIMALES	63
6.1.2 AGENTES CONSERVANTES	66
7. ALOE VERA	67
7.2 PROPIEDADES CICATRIZANTES	70
7.3 ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA E INMUNOMODULADORA	72
7.4 ACCIÓN ANTIOXIDANTE	73
7.5 EFECTO CONTRA LAS RADIACIONES GAMMA Y ULTRAVIOLETA	74
7.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	75
8. HIDROXIPROPILMETILCELULOSA	77
9. ELECTROLITOS ESENCIALES	78

10. REGULACIÓN APLICABLE A SUSTITUTOS LAGRIMALES COMO PRODUCTO SANITARIO.....	81
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	91
1. JUSTIFICACIÓN	91
2. HIPÓTESIS.....	94
3. OBJETIVOS.....	95
III. MATERIAL Y MÉTODOS	99
1. MATERIALES	99
1.1 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	99
1.1.1 REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS.....	99
1.1.2 INSTRUMENTACIÓN GENERAL.....	99
1.2 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	100
1.2.1 MATERIALES DEL ESTUDIO CLÍNICO.....	100
1.2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN GENERAL	101
1.2.3 PROGRAMAS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS.....	102
2. MÉTODOS.....	102
2.1 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	102
2.1.1 MODELO CELULAR	102
2.1.2 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DEL COMPUESTO MTT.....	103
2.1.2.1 EVALUACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON <i>ALOE VERA</i> E HIDROXIPROPILMETILCELULOSA SOBRE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL DE CONEJO MEDIANTE MTT	104
2.1.2.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON <i>ALOE VERA</i> E HIDROXIPROPILMETILCELULOSA VERSUS DIFERENTES SUSTITUTOS LAGRIMALES DISPONIBLES EN EL MERCADO	107
2.2 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	108
2.2.1 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA	108
2.2.1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	108
2.2.1.2 SELECCIÓN DE LOS SUJETOS.....	109
2.2.1.3 FASES DEL ESTUDIO	111
2.2.1.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA	113
2.2.1.5. VALORACIÓN DE LA SEGURIDAD	114
2.2.1.6. ENSAYOS	114
2.2.2 EVALUACIÓN DE LA HUMECTABILIDAD SOBRE LA SUPERFICIE DE LENTES DE CONTACTO DEL SUSTITUTO LAGRIMAL BASADO EN <i>ALOE VERA</i> E HPMC	128

2.2.2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	128
2.2.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOLUCIÓN BASADA EN <i>ALOE VERA</i> E HPMC SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE MOLÉCULAS PRO-INFLAMATORIAS EN LA PELÍCULA LAGRIMAL	131
2.2.3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	131
2.2.3.2 ENSAYOS	134
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	137
IV. RESULTADOS	143
1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	143
1.1 EVALUACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON <i>ALOE VERA</i> E HPMC SOBRE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL MEDIANTE ENSAYOS MTT.....	143
1.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON <i>ALOE VERA</i> E HPMC FRENTE AL DE DIFERENTES SUSTITUTOS LAGRIMALES DISPONIBLES EN EL MERCADO	146
2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	151
2.1 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA.....	151
2.1.1 FASE I: ESTUDIO DE SEGURIDAD Y EFICACIA A CORTO PLAZO....	151
2.1.2 FASE II: ESTUDIO DE SEGURIDAD Y EFICACIA A MEDIO PLAZO....	157
2.1.2.1 VARIABLE PRINCIPAL DE EFICACIA	157
2.1.2.2 EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE SEGURIDAD.....	158
2.2 EVALUACIÓN DE LA HUMECTACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA SUPERFICIE DE LENTES DE CONTACTO	160
2.2.1 EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO TFSQ.....	160
2.2.1.1 MEDIA TFSQ.....	160
2.2.1.2 AREA TFSQ	162
2.2.1.3 CUESTIONARIO VAS	166
2.2.1.4 AGUDEZA VISUAL.....	168
2.3 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN LA PELÍCULA LAGRIMAL.....	173
V. DISCUSIÓN	181
1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	181
1.1 EVALUACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL BASADO EN <i>ALOE VERA</i> E HPMC SOBRE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL DE LA LÍNEA SIRC.....	181

1.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL BASADO EN ALOE VERA E HPMC FRENTE AL DE DIFERENTES SUSTITUTOS LAGRIMALES DISPONIBLES EN EL MERCADO	187
2. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	191
2.1 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA.....	191
2.2 EVALUACIÓN DE LA HUMECTACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA SUPERFICIE DE LENTES DE CONTACTO	201
2.3 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN LA PELÍCULA LAGRIMAL.....	207
VI. CONCLUSIONES	219
VII. BIBLIOGRAFÍA	222
I. ANEXO.....	245
II. ANEXO.....	246

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1.- Estructura y componentes de la película lagrimal.	39
Figura I.2.- Representación de la función de barrera protectora de las mucinas en la superficie ocular.	40
Figura I.3.- Representación de la distribución de las células Goblet en la superficie ocular humana	51
Figura I.4.- Citología de impresión conjuntival con tinción PAS - hematoxilina.	53
Figura I.5.- Imagen de citología de impresión obtenida por microscopía láser confocal	54
Figura I.6.- Detalle de la secreción de la célula Goblet.....	54
Figura I.7.- Clasificación de ojo seco del informe TFOS DEWS 2007	58
Figura I.8.- Clasificación de la enfermedad de ojo seco del informe TFOS DEWS II 2017	59
Figura I.9.- Clasificación de productos sanitarios de acuerdo al Reglamento Europeo (UE) 2017/745.....	83
Figura I.10.- Regla 5 de clasificación de productos sanitarios invasivos de acuerdo al Reglamento Europeo (UE) 2017/745	85
Figura I.11.- Investigaciones clínicas pre- y post-comercialización para productos sanitarios; UNE - EN ISO.14155: 2011 Investigaciones clínicas de productos sanitarios para humanos – Buenas Prácticas Clínicas.....	88
Figura III.1.- Esquema de distribución del ensayo MTT.....	105
Figura III.2.- División corneal en diferentes áreas.....	119
Figura III.3.- División en áreas de la conjuntiva bulbar	120
Figura III.4.- Dispositivo Eyeprim™.	121
Figura III.5.- Toma de muestra de citología de impresión en conjuntiva bulbar superior con dispositivo Eyeprim™.....	122
Figura III.6.- Procedimiento de tinción PAS – hematoxilina para citologías de impresión conjuntival.....	125
Figura III.7.- Montaje de citologías de impresión conjuntival tras tinción PAS – hematoxilina..	126
Figura III.8.- Microscopio confocal Zeiss LSM Pascal.....	127
Figura III.9.- Topógrafo corneal Medmont E300.	130
Figura III.10.- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	137

Figura IV.1.- Valores de viabilidad celular de distintas concentraciones de Aloe vera tras 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO	144
Figura IV.2.- Valores de viabilidad celular celular de distintas concentraciones de Aloe vera tras 60 minutos de expresión al agente irritante DMSO	145
Figura IV.3.-. Valores de viabilidad celular tras 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO para cada una de las soluciones comerciales	148
Figura IV.4.-. Valores de viabilidad celular tras 60 minutos de exposición al agente irritante DMSO para cada una de las soluciones comerciales	149
Figura IV.5.- Puntuación de la valoración de la comodidad subjetiva con el test VAS.	152
Figura IV.6 - Densidad de células Goblet obtenida con microscopía láser confocal	153
Figura IV.7.- Valores de la altura de la nube de mucina	154
Figura IV.8.- Grado de tinciones corneales.	155
Figura IV.9.- Representación del porcentaje de la media TFSQ para la lente de contacto de hidrogel	161
Figura IV.10.- Representación del porcentaje de la media TFSQ para la lente de contacto de hidrogel silicona	162
Figura IV.11.- Representación del porcentaje del área TFSQ para la lente de contacto de hidrogel	163
Figura IV.12.- Representación del porcentaje del área TFSQ para la lente de contacto de hidrogel silicona.....	164
Figura IV.13.- Mapas de color índice TFSQ tomados en cada uno de los tiempos de análisis con la lente de hidrogel e hidrogel silicona	165
Figura IV.14.- Representación de la puntuación del test VAS para la lente de contacto de hidrogel	167
Figura IV.15.- Representación de la puntuación del test VAS para la lente de contacto de hidrogel silicona	168
Figura IV.16.- Representación de los valores de agudeza visual de alto contraste para la lente de contacto de hidrogel	169
Figura IV.17.- Representación de los valores de agudeza visual de alto contraste para la lente de contacto de hidrogel silicona.....	170

Figura IV.18.- Representación de los valores de agudeza visual de bajo contraste para la lente de contacto de hidrogel 171

Figura IV.19.- Representación de los valores de agudeza visual de bajo contraste para la lente de contacto de hidrogel silicona 172

Figura IV.20.- Niveles de metaloproteinasa de matriz -9 175

Figura IV.21.- Niveles de interleuquina - 1 β 176

Figura IV.22.- Niveles de interleuquina - 6 177

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1.- Distribución de mucinas en el epitelio de la superficie ocular	43
Tabla I.2.- Componentes mayoritarios del <i>Aloe vera</i>	70
Tabla I.3.- Resumen de los efectos terapéuticos de los principales compuestos del gel de <i>Aloe vera</i>	76
Tabla I.4.- Concentración principal de electrolitos en la película lagrimal humana.....	78
Tabla III.1.- Principales reactivos, medios de cultivo y compuestos químicos de los ensayos <i>in vitro</i>	99
Tabla III.2.- Equipos, instrumentos y material fungible empleados en el laboratorio	99
Tabla III.3.- Materiales empleados para la investigación clínica y para el análisis de las muestras obtenidas durante la fase <i>in vivo</i>	100
Tabla III.4.- Reactivos y materiales empleados para la valoración de las citologías de impresión	101
Tabla III.5.- Equipos empleados durante la fase clínica y en el procesamiento de las muestras obtenidas.	101
Tabla III.6.- Kits comerciales de ensayo ELISA utilizados durante la fase clínica.	102
Tabla III.7.- Programas y herramientas informáticas.....	102
Tabla III.8.- Composición de los sustitutos lagrimales comerciales utilizados en el estudio comparativo de citotoxicidad	107
Tabla III.9.- Resumen de las características demográficas de los pacientes incluidos en los estudios de la fase <i>in vivo</i>	108
Tabla III.10.- Pruebas realizadas en cada una de las visitas de la Fase I del estudio de seguridad y eficacia.....	112
Tabla III.11.- Pruebas realizadas en cada una de las visitas de la Fase II del estudio de seguridad y eficacia.....	113

Tabla III.12.- Interpretación de los niveles de calificación de la escala de valoración de complicaciones de lentes de contacto de Efron..... 119

Tabla III.13.- Características de la membrana utilizada en el dispositivo Eyeprim™..... 123

Tabla III.14.- Secuencia de procesamiento para la tinción PAS – hematoxilina de las citologías de impresión conjuntival..... 124

Tabla III.15.- Características de las lentes de contacto utilizadas para la evaluación de la humectación 129

Tabla III.16.- Pruebas realizadas en cada una de las visitas del estudio de evaluación de la concentración de moléculas pro - inflamatorias 134

Tabla IV.1.- Valores de viabilidad celular de diferentes concentraciones de Aloe vera añadidas a un sustituto lagrimal y sus respectivos controles 146

Tabla IV.2.- Parámetros físico – químicos de la solución experimental y de las soluciones comerciales utilizadas en el estudio comparativo del papel protector sobre células de epitelio corneal de conejo de la línea SIRC 147

Tabla IV.3.- Valores de viabilidad celular a los 10 y 60 minutos para cada una de las soluciones comerciales 150

Tabla IV.4.- Resumen de los resultados obtenidos en la Fase I del estudio de seguridad y eficacia 156

Tabla IV.5.- Resumen de los resultados obtenidos en la Fase II del estudio de seguridad eficacia 159

Tabla IV.6.- Cambios en la frecuencia e intensidad de la sintomatología de sequedad e irritación durante 3 meses de tratamiento con la solución control y experimental 173

Tabla IV.7.- Resultados del volumen y estabilidad lagrimal valorados con el test de Schirmer y con el TF BUT para la solución control y la solución experimental 174

RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad de ojo seco está causada por una ausencia crónica de lubricación y humectación sobre la superficie ocular. Se trata de una patología de carácter multifactorial caracterizada por la pérdida de homeostasis de la película lagrimal y en cuya etiología intervienen la inestabilidad e hiperosmolaridad de la película lagrimal (Bron et al., 2017; Craig et al., 2017b).

Las consecuencias de la enfermedad de ojo seco abarcan desde sintomatología de irritación ocular leve pero de carácter persistente, hasta una inflamación significativa y/o incluso a la aparición de lesiones en la superficie ocular de carácter irreversible.

Los sustitutos lagrimales se consideran el tratamiento sintomático base para esta patología (Jones et al., 2017; No author, 2016). Entre sus funciones está humectar y lubricar los epitelios corneal y conjuntival protegiéndolos frente a los fenómenos de desecación y reducir el coeficiente de fricción contra la superficie ocular con el objetivo de aliviar la sintomatología de los pacientes. Además de para humectar la superficie ocular, la mayoría de los sustitutos lagrimales están especialmente indicados para humectar la superficie de las lentes de contacto. Su uso está establecido tanto para facilitar la inserción como para evitar su deshidratación una vez se ha colocado la lente en la superficie ocular. En estos casos, la instilación de soluciones humectantes aumenta considerablemente el confort tanto en sujetos sanos como en usuarios de lentes de contacto con sintomatología de sequedad ocular (Pucker et al., 2016).

En este sentido, la búsqueda de nuevas soluciones terapéuticas exige el diseño de productos que mimeticen al máximo las características físico - químicas de la película lagrimal. Al mismo tiempo, la incorporación de nuevos ingredientes en este tipo de soluciones requiere la monitorización de los efectos producidos a nivel celular y la valoración de la seguridad y eficacia en los usuarios finales.

La actualización constante de la documentación técnica de los productos sanitarios abre la posibilidad de la búsqueda por parte de los fabricantes de nuevas aplicaciones además de las ya registradas del producto. En este aspecto, los sustitutos lagrimales son buenos candidatos para ser destinados además de al alivio de la irritación y de la sintomatología de sequedad ocular, a la humectación y lubricación de lentes de contacto y como terapia coadyuvante en trastornos inflamatorios de la superficie ocular. Sin embargo, la inclusión de nuevas aplicaciones en las instrucciones de uso del producto exige la realización de investigaciones clínicas que las respalden.

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido demostrar que la inclusión del ingrediente *Aloe vera* en la fórmula de un sustituto lagrimal con hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) presenta un efecto protector frente a la irritación a nivel celular y sobre la sintomatología de irritación ocular asociada a la enfermedad de ojo seco. De forma paralela y con el objetivo de demostrar otras posibles aplicaciones del producto se ha evaluado la humectación de lentes de contacto hidrofílicas tras la instilación de este sustituto lagrimal y el efecto sobre la concentración de moléculas pro-inflamatorias en sujetos con sintomatología de sequedad ocular.

Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que la inclusión de un 1% de *Aloe vera* en una fórmula base con HPMC produce un incremento en la viabilidad celular a corto plazo en un cultivo de células de epitelio corneal de conejo de la línea *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (SIRC). De forma paralela, en el análisis comparativo del efecto sobre la viabilidad celular de la solución experimental con otros sustitutos lagrimales ya comercializados, se observaron los mejores porcentajes de viabilidad celular a corto plazo con la solución de estudio basada en un 1% de *Aloe vera* y un 0.2% de HPMC y con el producto basado en un 0.5 % de carboximetilcelulosa (CMC).

En lo respectivo a los estudios *in vivo* la evaluación de la seguridad y eficacia ha demostrado que la solución experimental es igual de segura que la solución control y

presenta mayor eficacia en el alivio de la sintomatología de irritación asociada a la enfermedad de ojo seco leve – moderada.

Por último, la búsqueda de nuevas aplicaciones posibles de la fórmula han demostrado la eficacia *in vivo* durante los minutos iniciales después de la instilación de la solución experimental en la humectación de la superficie de lentes de contacto hidrofílicas así como un aumento en la satisfacción del usuario y una disminución inicial en la agudeza visual de bajo contraste. Por otro lado, la evaluación de la concentración de moléculas pro-inflamatorias en la película lagrimal tras 3 meses de uso de la solución experimental ha mostrado un descenso significativo en los niveles de metaloproteinasa de matriz - 9 y de interleuquina - 6.

Como conclusión de esta tesis doctoral se puede afirmar que la solución humectante basada en *Aloe vera* e HPMC es un producto adecuado para el alivio de la sintomatología de irritación asociada a sequedad ocular. Los estudios *in vivo* realizados destinados a demostrar nuevas aplicaciones del producto, como la humectación de lentes de contacto hidrofílicas y el efecto sobre los niveles de moléculas pro - inflamatorias en sujetos con sintomatología de sequedad ocular respaldan la posible inclusión de nuevas aplicaciones en el uso previsto del producto.

SUMMARY

Dry eye disease is caused by a chronic lack of lubrication and moisture on the ocular surface. It is a multifactorial pathology characterized by a loss of homeostasis of the tear film and whose etiology intervenes in the instability and hyperosmolarity of the tear film (Bron et al., 2017; Craig et al., 2017b).

The consequences of dry eye disease range from symptoms of mild but persistent eye irritation, to significant inflammation and / or even the appearance of irreversible lesions on the ocular surface.

Tear substitutes are considered the base symptomatic treatment for this pathology (Jones et al., 2017; No author, 2016). Its functions include moisturizing and lubricating the corneal and conjunctival epithelia, protecting them against desiccation phenomena and reducing the coefficient of friction against the ocular surface in order to alleviate the symptoms of patients. In addition to moisturizing the ocular surface, most tear substitutes are especially suitable for moisturizing the surface of contact lenses. Its use is established both to facilitate insertion and to avoid dehydration once the lens has been placed on the ocular surface. In these cases, the instillation of moisturizing solutions considerably increases comfort both in healthy subjects and in contact lens users with symptoms of dry eye (Pucker et al., 2016).

In this sense, the search for new therapeutic solutions requires the design of products that mimic the physicochemical characteristics of the tear film. At the same time, the incorporation of new ingredients in this type of solutions requires the monitoring of the effects produced at the cellular level and the assessment of safety and efficacy in end users.

The constant updating of the technical documentation of medical devices opens the possibility of searching by manufacturers for new applications in addition to those already registered for the product. In this regard, tear substitutes are good candidates

for use in addition to relieving irritation and dry eye symptoms, for moisturizing and lubricating contact lenses and as adjuvant therapy in inflammatory disorders of the ocular surface. However, including new applications in the product's instructions for use requires clinical research to support it.

The main objective of this PhD thesis has been to demonstrate that the inclusion of the ingredient *Aloe vera* in the formula of a tear substitute with hydroxypropylmethylcellulose has a protective effect against irritation at the cellular level and on the symptoms of eye irritation associated with dry eye disease. In parallel, and with the aim of demonstrating other possible applications of the product, the wettability of hydrophilic contact lenses after the instillation of this tear substitute and the effect on the concentration of pro - inflammatory molecules in subjects with dry eye symptoms has been evaluated.

In vitro studies have shown that the inclusion of 1% of *Aloe vera* in a base formula with hydroxypropylmethylcellulose produces a short-term increase in cell viability in a culture of rabbit corneal epithelium cells of the *Statens Seruminstitut Rabbit Cornea* (SIRC) line. In parallel, the comparative analysis of the effect on cell viability of the experimental solution with other tear substitutes already commercialized, the best percentages of short - term cell viability were observed with the experimental solution based on 1% of *Aloe vera* and 0.2% hydroxypropylmethylcellulose and with the product based on 0.5% of carboxymethylcellulose.

Regarding *in vivo* studies, the evaluation of safety and efficacy has shown that the experimental solution is just as safe as the control solution and that is more effective in relieving the symptoms of irritation associated with mild to moderate dry eye disease.

Finally, the search for new possible applications of the formula has shown the effectiveness *in vivo* during the initial minutes after instillation of the experimental solution in moisturizing the surface of hydrophilic contact lenses as well as an increase in users' satisfaction and an initial decrease in low contrast visual acuity. On the other hand, the

SUMMARY

evaluation of the concentration in the tear film of pro - inflammatory molecules after three months of continuous use of the experimental solution has shown a significant decrease in the levels of matrix metalloproteinase - 9 and interleukin - 6.

In conclusión of this PhD thesis, it can be stated that the moisturizing solution based on *Aloe vera* and hydroxypropylmethylcellulose is a suitable product for the relief of the symptoms of irritation associated with dry eye disease. In vivo studies carried out to demonstrate new applications of the product, such as the moisturizing of hydrophilic contact lenses and the effect on the levels of pro-inflammatory molecules in subjects with symptoms of dry eye disease support the inclusion of new applications in the intended use of the product.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. LA SUPERFICIE OCULAR

El término superficie ocular hace referencia al conjunto de todas las estructuras y órganos anejos del ojo que se encuentran en contacto con el exterior y que actúan en conjunto como una unidad anatómica y funcional. Engloba diferentes estructuras oculares vinculadas entre sí como: los epitelios corneal y conjuntival, la película lagrimal, las glándulas lagrimales principal y accesorias, los párpados y sus glándulas y el conducto nasolagrimal (Gipson, 2007).

Su función principal consiste en proporcionar protección al resto de tejidos del ojo frente a agentes externos, así como mantener la transparencia e integridad de la córnea. A diferencia de otros epitelios del cuerpo humano, la superficie ocular se encuentra especialmente expuesta a fenómenos de desecación, lesiones o contacto con patógenos. Por ello, cuenta con numerosos mecanismos de defensa que garantizan la visión.

2. LA PELÍCULA LAGRIMAL

La película lagrimal es un fluido que recubre, lubrica y nutre la superficie ocular. Constituye la primera superficie refractiva que atraviesa la luz cuando entra en el sistema visual y se encuentra en contacto directo con el aire, por ello, es considerada un mecanismo natural muy complejo, creado por nuestro organismo para proteger a las estructuras oculares frente a partículas externas (Maurice, 1990).

Su estabilidad es indicativa de salud ocular ya que se encuentra en contacto directo con el epitelio conjuntival y corneal. Éste último, es el que depende más directamente de ella tanto para su nutrición como para su humectación protegiéndolo frente a fenómenos de desecación.

2.1 ESTRUCTURA DE LA PELÍCULA LAGRIMAL

Aunque clásicamente siempre se ha establecido un modelo lagrimal en tres capas (Wolff, 1946): una capa externa lipídica que retarda la evaporación de la fase acuosa, una capa media acuosa que proporciona humectación, nutrientes y enzimas antimicrobianas y una capa interna mucínica, que disminuye la hidrofobicidad inherente a las células de los epitelios corneal y conjuntival, algunos autores sostienen que esto no representa la realidad (Doane, 1994).

Actualmente, se proponen modelos más complejos para ilustrar la estructura de la película lagrimal, describiendo la posible relación entre lípidos, proteínas y mucinas. Entre ellos el mejor establecido describe una estructura mucho más dinámica. Desde la zona más externa hacia la más interna: una capa lipídica muy fina que está en contacto directo con el aire, una capa acuoso-mucínica (Cher, 2008) subyacente más gruesa con un aumento de la concentración de mucinas a medida que nos acercamos a las células epiteliales corneales y una capa final muy delgada (glicocálix) unida a la membrana del epitelio que proporciona hidrofilia a la superficie del epitelio corneal de naturaleza hidrofóbica (Dilly, 1994).

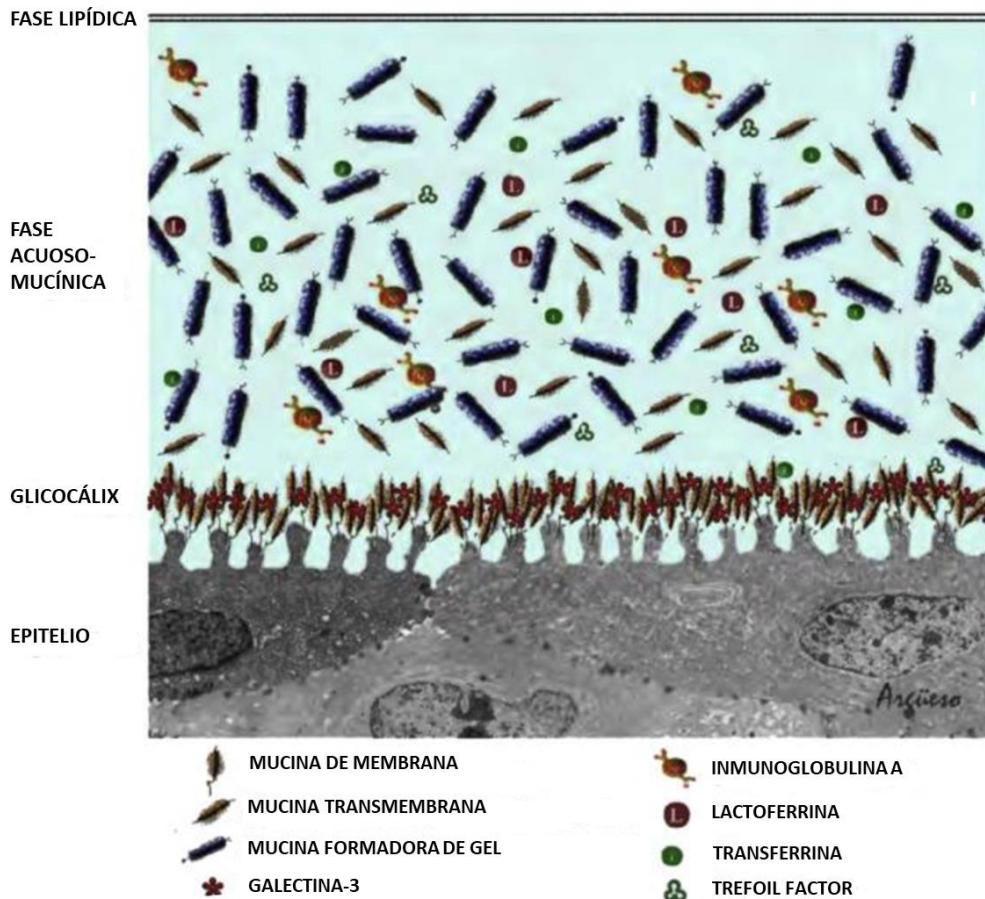


Figura I.1.- Estructura y componentes de la película lagrimal. *Imagen adaptada de P. Argüeso.* (Craig et al., 2017b).

2.2 COMPOSICIÓN DE LA PELÍCULA LAGRIMAL

Cada una de las capas definidas en el apartado anterior está compuesta por macromoléculas de gran relevancia en las funciones de la película lagrimal. En la fase acuoso-mucínica destaca la presencia de mucinas, glicoproteínas de alto peso molecular cuya principal característica es su capacidad para formar geles (Desseyn et al., 2000). Constituyen el componente principal del recubrimiento mucoso cumpliendo funciones que van desde la lubricación hasta la formación de barreras físicas y químicas donde con frecuencia juegan un papel inhibitorio frente a patógenos, protegiendo a los epitelios de la superficie ocular.

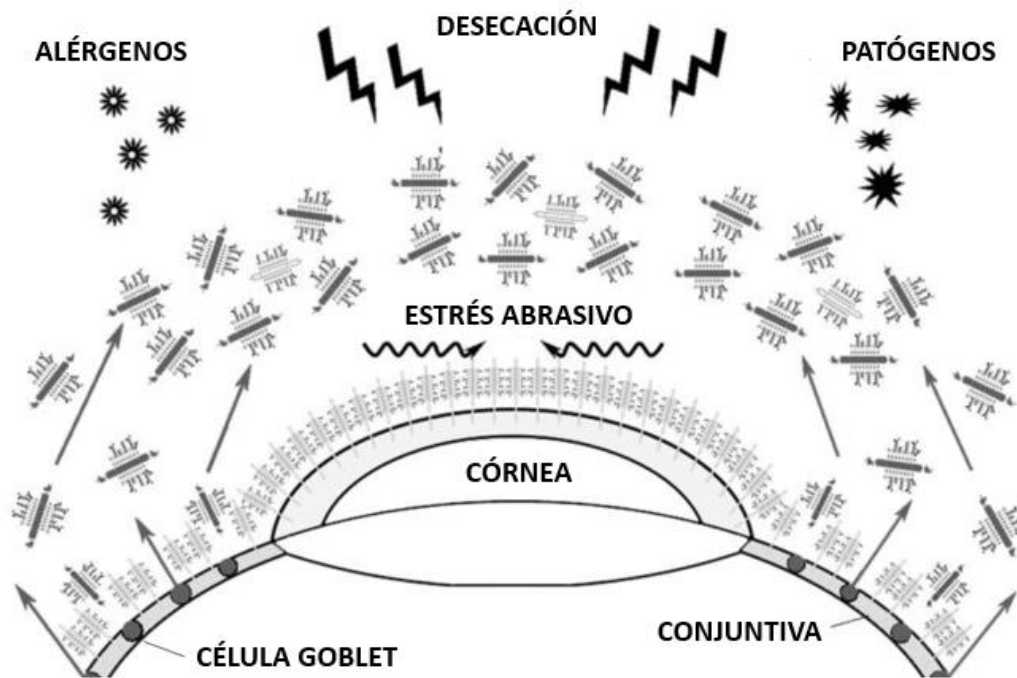


Figura I.2: Representación de la función de barrera protectora de las mucinas en la superficie ocular. *Imagen adaptada* (Mantelli and Argüeso, 2008).

Son secretadas mayoritariamente por células caliciformes especializadas del epitelio conjuntival (células Goblet), por las criptas de Henle (inflexiones del epitelio conjuntival localizadas en la conjuntiva tarsal) y por las células de Manz (localizadas en forma de anillo alrededor del limbo esclero-corneal). De los 20 tipos diferentes de mucinas que se encuentran descritos en el organismo, 9 tipos se encuentran en la superficie ocular.

Esta fase está compuesta principalmente por mucinas en suspensión o solubles, mucinas formadoras de gel y mucinas glicosiladas transmembrana, directamente ancladas al epitelio corneal formando el glicocáliz.

Las mucinas solubles son las de menor tamaño. Se sintetizan principalmente en la glándula lagrimal y no forman gel. Aunque su función en la superficie ocular todavía

no está clara, se ha descrito su actividad bactericida y fungicida en otros epitelios (Bobek and Situ, 2003; Lamblin et al., 2001). Entre ellas se encuentra la MUC7, expresada principalmente en los acinos de la glándula lagrimal (Watanabe, 2002).

Las mucinas formadoras de gel son las más numerosas en la superficie ocular y son secretadas principalmente por las células Goblet. Tienen capacidad de retener agua formando un gel hidromucínico que contribuye a lubricar las superficies epiteliales, así como a atrapar alérgenos y sustancias de desecho del metabolismo celular. Además, ha sido descrito en modelo animal, que pueden actuar uniéndose a patógenos como la *Pseudomona aeruginosa*, evitando su unión al epitelio corneal y facilitando su eliminación de la superficie ocular (Fleiszig et al., 1994).

Entre ellas, presenta un papel principal la MUC5AC, una de las mucinas más estudiadas en la superficie ocular, que constituye el componente mayoritario de la secreción de las células Goblet, y contribuye al mantenimiento de la viscosidad y de las características reológicas de la lágrima.

Cuando se encuentran almacenadas dentro de las células caliciformes las mucinas tienden a formar polímeros, sin embargo, son secretadas como monómeros a la película lagrimal. Este comportamiento puede deberse a la necesidad de formar un recubrimiento para el epitelio de baja viscosidad que contribuya a mantener la transparencia y por lo tanto las propiedades ópticas de la superficie ocular (Berry et al., 2004; Kautto et al., 2016; Spurr-Michaud et al., 2007).

Las mucinas transmembrana son las encargadas de formar el glicocálix de la superficie ocular siendo sintetizadas principalmente en el retículo endoplasmático de las células epiteliales. Gracias a sus características bipolares, pueden unirse por el extremo no polar a la membrana de las células epiteliales corneales y conjuntivales de características hidrofóbicas, y por su extremo polar a la fase acuosa de la película lagrimal. Estas propiedades surfactantes facilitan la interacción con la fase acuosa de la lágrima, proporcionando una superficie humectable que favorece la distribución del resto

INTRODUCCIÓN

de componentes con el parpadeo. Además, y al igual que las mucinas solubles y las formadoras de gel, también forman una primera línea de defensa para las células epiteliales contra patógenos, alérgenos, desecación y lesiones (Guzman-Aranguez and Argüeso, 2010; Mantelli and Argüeso, 2008).

MUC1, MUC4 y MUC16 son las mucinas transmembrana más comunes en la interfaz entre el epitelio de la superficie ocular y la película lagrimal. Cualquier alteración que afecte a la síntesis de mucinas o a la formación del glicocálix, va a producir una desestabilización del resto de componentes de la lágrima, disminuyendo la adherencia y provocando la aparición de zonas de exposición, lo que puede resultar en daño de la superficie ocular. Algunas de las patologías oculares más comunes en las que se producen alteraciones tanto en la secreción de mucinas como en las mucinas asociadas a las células epiteliales son: fenómenos alérgicos, síndrome de ojo seco de etiología autoinmune o no autoinmune e infecciones de la superficie ocular.

Tabla I.1.- Distribución de mucinas en el epitelio de la superficie ocular.

CLASIFICACIÓN		NOMBRE	LOCALIZACIÓN	REFERENCIAS
MUCINAS TRANSMEMBRANA (O ASOCIADAS A LA MEMBRANA)		MUC1	Epitelio corneal y conjuntival, glándula lagrimal, epitelio del saco lagrimal, conductos nasolagrimal.	(Gipson and Argüeso, 2003; Inatomi et al., 1995; Paulsen et al., 2004)
		MUC4	Epitelio conjuntival y corneal, glándula lagrimal, epitelio del saco lagrimal y conductos nasolagrimal.	(Gipson and Argüeso, 2003; Inatomi et al., 1996; Paulsen et al., 2004, 2003)
		MUC16	Epitelio corneal y conjuntival, glándula lagrimal principal y glándulas accesorias de Krause, conductos nasolagrimal.	(Argüeso et al., 2003; Blalock et al., 2007; Gipson and Argüeso, 2003; Jäger et al., 2007)
MUCINAS SECRETADAS	SOLUBLES	MUC7	Epitelio conjuntival, glándula lagrimal, epitelio del saco lagrimal y de los conductos nasolagrimal.	(Jumblatt et al., 2003; Paulsen et al., 2004)
	FORMADORAS DE GEL	MUC2	Conjuntiva, epitelio del saco lagrimal y conductos nasolagrimal	(McKenzie et al., 2000; Paulsen et al., 2003)
		MUC5AC	Células Goblet, glándula lagrimal, epitelio del saco lagrimal y de los conductos nasolagrimal	(Inatomi et al., 1996; Paulsen et al., 2004)
		MUC5B	Glándula lagrimal, epitelio del saco lagrimal y de los conductos nasolagrimal	(Paulsen et al., 2004, 2003)
		MUC6	Glándula lagrimal, epitelio del saco lagrimal y de los conductos nasolagrimal	(Paulsen et al., 2004, 2003)
		MUC19	Células Goblet	(Yu et al., 2008)

La fase acuosa está producida por la glándula lagrimal principal y por las glándulas accesorias de Krause y Wolfring. Entre las funciones principales de los componentes de la fase acuosa están: proporcionar oxígeno y nutrientes al epitelio corneal subyacente debido a las características avasculares de la córnea, protección inmunológica y antibacteriana, función refractiva y eliminación de detritus procedentes del metabolismo celular.

Está formada principalmente por agua. En ella se encuentran disueltos electrolitos como el Na^+ y el Cl^- , que intervienen en el mantenimiento de la osmolaridad fisiológica; Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} y K^+ esenciales para el mantenimiento de la integridad del epitelio corneal, urea, glucosa e iones bicarbonato y carbonato responsables de la regulación del pH.

También se ha descrito la presencia de una elevada concentración de proteínas, mayoritariamente lisozima y lactoferrina (esenciales por su potente acción antimicrobiana), lipocalina (fundamental en la interacción con la fase lipídica), lacritina (implicada en la proliferación y supervivencia de las células epiteliales), proteínas séricas como la albúmina, transferrina, inmunoglobulinas sIgA, IgG, IgM y mediadores inflamatorios (Glasgow and Gasymov, 2011; Kijlstra and Kuizenga, 1994; McClellan et al., 1973).

La proporción descrita de cada una de ellas en la literatura científica depende fundamentalmente del método utilizado para recoger la lágrima. Cuando se usan métodos invasivos se produce estimulación del tejido conjuntival, lo que resulta en una mayor proporción de proteínas plasmáticas. Sin embargo, cuando las muestras se recogen mediante métodos menos invasivos, como recogida por capilaridad, aparece una mayor proporción de proteínas procedentes de la glándula lagrimal. Aproximadamente entre un 20-30% del total del contenido proteico lagrimal es lisozima (Aho et al., 1996; Sack et al., 2001). Se ha descrito que los niveles normales de esta proteína se encuentran comprendidos en un rango entre 0.6 y 2.6 mg/mL (Avisar et al., 1979). Es secretada por la glándula lagrimal principal y actúa disolviendo la pared bacteriana mediante digestión enzimática de los mucopolisacáridos que la forman. La lactoferrina también representa alrededor del 20% del contenido proteico total tanto en la lágrima basal como en la refleja (Janssen PT, 1983; Sack et al., 2001). Su concentración promedio en la película lagrimal de sujetos sanos se encuentra en torno a 2.2 mg/mL (Kijlstra et al., 1983). Aunque han sido descritos mecanismos de acción

antimicrobiana independientes (Farnaud and Evans, 2003), su acción principal se debe a su alta capacidad de unión de cationes divalentes como el Fe^{+2} . Privando a las bacterias de la biodisponibilidad de este elemento, esencial para el crecimiento y la producción de toxinas (McDermott, 2013). Entre los ligandos nativos de la lipocalina lagrimal, otro de los elementos proteicos mayoritarios, se han identificado ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos y colesterol. Esta proteína interacciona mediante uniones lípido-proteicas con la fase lipídica contribuyendo al mantenimiento de la baja tensión superficial y a la viscosidad no newtoniana del fluido lagrimal, características esenciales para mantener la estabilidad lagrimal (Glasgow and Gasymov, 2011). Dentro del grupo de las inmunoglobulinas, la IgA es la más abundante. Actúa proporcionando un recubrimiento inmunológico al tejido conjuntival y constituye la primera línea del mecanismo de defensa frente a la infección gracias a la inhibición de la adhesión bacteriana y viral a las células epiteliales. Neutraliza las toxinas bacterianas y víricas tanto en el medio intra- como en el extracelular (Williams and Gibbons, 1972; Zierhut et al., 2002).

La fase lipídica constituye la parte más externa de la película lagrimal y por tanto es la que forma el contacto en la interfaz superficie ocular-aire. Entre sus funciones principales se encuentra la de reducir la tensión superficial, retardar la evaporación de la fase acuosa, actuar como lubricante durante el parpadeo y contener el fluido lagrimal en los márgenes del párpado (Bron et al., 2004; King-Smith et al., 2008). Además, estudios recientes han descrito las propiedades antimicrobianas de los lípidos meibomianos contra bacterias gram positivas y gram negativas y su participación en la defensa innata contra patógenos (Mudgil, 2014).

Esta capa lipídica se encuentra integrada como su nombre indica por lípidos de diverso tipo entre los que encontramos: ácidos grasos libres, lípidos polares (incluidos fosfolípidos), hidrocarbonos, triglicéridos, diglicéridos, lípidos no polares como el colesterol y monoésteres de cera, que actúan formando una barrera que evita la

evaporación del componente acuoso de la película lagrimal (Butovich, 2013). El componente clave y mayoritario de la capa lipídica, son los fosfolípidos. Sus características anfifílicas los convierten en los principales estabilizadores de la subcapa polar que se forma en la interfaz acuoso-lipídica. Además su presencia es esencial para conseguir una adecuada extensión de la fracción polar no lipídica de la lágrima (Rantamäki et al., 2011). En general se pueden identificar tres límites bien definidos si simplificamos la estructura de esta fase; fase acuosa / lípidos polares, lípidos polares / lípidos no polares y lípidos no polares / aire.

En cierto modo, en esta fase también están presentes proteínas, que se intercalan entre los lípidos principalmente en la subcapa polar, modificando sus propiedades. Investigaciones sobre la adsorción de las diferentes proteínas lagrimales en esta fase han mostrado que la lipocalina es la más activa y que lactoferrina, lisozima e IgA también interactúan con los lípidos mientras que proteínas séricas como la albúmina interaccionan de forma más débil. Además, se ha descrito la contribución de esta fase lipídica en el mantenimiento de la actividad enzimática de la lisozima, evitando la degradación que tiene lugar cuando se encuentra en una interfaz aire-agua (Dartt, 2011; Glasgow et al., 1999; Miano et al., 2005).

La mayoría de las investigaciones sobre la fase lipídica de la película lagrimal se han centrado en los lípidos presentes en las glándulas de Meibomio. Tradicionalmente estaba establecido que esta fase era secretada casi exclusivamente por estas glándulas (> 90%) (Jester et al., 1981; McCulley and Shine, 2003) situadas en la lámina tarsal de los párpados y de forma minoritaria por las glándulas de Zeiss y Moll, localizadas en el margen palpebral del tarso y en la base de las pestañas respectivamente (Georgiev et al., 2017). Esta creencia se ha visto modificada con la aparición de estudios recientes que discuten el origen de los fosfolípidos de la película lagrimal al observarse grandes diferencias en su concentración cuando se compara la composición de la película lagrimal con la composición de la secreción meibomiana (Brown et al., 2013; Lam et al.,

2014; Pucker and Haworth, 2015; Rantamäki et al., 2011). Del mismo modo, investigaciones como la de Butovich, comparando la fracción de lípidos no polares del fluido lagrimal con el fluido meibomiano revelan que, aunque es cierto que las glándulas meibomianas son una fuente importante, es necesario tener en cuenta otras fuentes probables de lípidos como la conjuntiva, la córnea y la secreción de la glándula lagrimal principal (Butovich, 2008).

2.3 HOMEOSTASIS DE LA PELÍCULA LAGRIMAL

El concepto homeostasis describe el estado del equilibrio en el cuerpo con respecto a sus diversas funciones y a la composición química de los fluidos y tejidos. La producción del fluido lagrimal es un proceso regulado. Tanto la superficie ocular como los márgenes palpebrales se encuentran densamente inervados formando la base para ajustar la secreción de la película lagrimal. Las glándulas lagrimales y sebáceas reciben inervación tanto del sistema simpático como del parasimpático (Botelho, 1964; Sibony et al., 1988), además, se cree que las células caliciformes encargadas de secretar el componente mucínico también se encuentran bajo control del sistema parasimpático (Dartt and Willcox, 2013).

La película lagrimal se forma con cada parpadeo como parte de un ciclo continuo. La tasa de secreción del fluido de la capa acuosa es de 1.2 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ (Mishima et al., 1966). Su volumen se distribuye cubriendo el área de la superficie ocular y formando el menisco lagrimal, que sirve de interfaz entre los márgenes del párpado y el epitelio corneal y conjuntival. El estímulo mecánico realizado en cada parpadeo, es el desencadenante para la salida de la secreción de las glándulas de Meibomio y permite que ésta se extienda sobre la película lagrimal preocular.

El parpadeo también es el encargado de facilitar el movimiento de drenaje hacia los orificios lagrimales. Dichas vías de drenaje se encuentran localizadas en la parte interna de los bordes palpebrales. Desde allí la lágrima fluye por los canaliculos superior e inferior desembocando en el sistema nasolagrimal. El volumen perdido por

evaporación y por el drenaje se reemplaza de nuevo con la secreción lagrimal y vuelve a comenzar el ciclo.

En el momento en que se producen alteraciones en la secreción de alguna de las fases de la película lagrimal, ésta se vuelve inestable y se pueden ver afectadas sus funciones.

3. LA CÓRNEA

La córnea es un tejido avascular y transparente situado en la parte anterior del globo ocular. Estas propiedades le confieren un papel principal en la formación de imágenes en la retina. Junto a la película lagrimal, forma una superficie regular que permite el paso adecuado de los rayos de luz hacia el cristalino y la retina. Además, actúa como barrera estructural protegiendo al ojo frente a infecciones (DeMonte and Kim, 2011).

Está formada principalmente por células epiteliales, queratinocitos, células endoteliales y por componentes acelulares como colágeno y glucosaminoglicanos. Desde el exterior hacia el interior tradicionalmente se ha estructurado en 5 capas: epitelio, membrana de Bowman o lámina basal anterior, estroma, membrana de Descemet o lámina basal posterior y endotelio. Se ha descrito la presencia de una sexta capa localizada entre el estroma y la membrana de Descemet denominada “Capa de Dua” (Dua et al., 2013).

El epitelio es la capa más externa y por lo tanto la que se encuentra en contacto directo con la lágrima. Consiste en una estructura escamosa compuesta por entre 5 y 7 capas de células pluriestratificadas no queratinizadas. Dentro de ellas las más superficiales presentan microvellosidades y micropliegues. Estas formaciones contribuyen al mantenimiento de la estabilidad de la película lagrimal al mejorar la adhesión de las mucinas. Gracias a la presencia de uniones estrechas o “*tight junctions*” entre las células y a la diferenciación y renovación constante de las células de la zona basal, sirve como barrera principal frente a los patógenos. Se encuentra anclado a una

lámina basal (membrana de Bowman), cuya función no está del todo clara todavía. Algunos autores sostienen que podría actuar como barrera física de protección del plexo nervioso subepitelial (Guthoff et al., 2005). Por otro lado, se ha descrito su papel principal en el mantenimiento de la hidratación y transparencia del estroma gracias a la protección frente a traumatismos (Lagali et al., 2009). Una de las primeras manifestaciones en las patologías que afectan a la superficie ocular es la epitelopatía corneal o queratitis punteada caracterizada por la aparición de zonas de lesión o pérdida celular visible mediante tinción con fluoresceína en las capas más superficiales del epitelio corneal.

El estroma representa la mayor parte del volumen corneal (alrededor del 90%). Está formado por una red de fibras de colágeno ordenadas en disposición laminar paralelas a la superficie y una matriz extracelular compuesta de agua, proteoglicanos, glicoproteínas y sales inorgánicas (Torricelli and Wilson, 2014). Los queratocitos, principales componentes celulares del estroma, se encuentran localizados entre las láminas y son los responsables de la síntesis de proteoglicanos y colágeno. Cuando se produce una lesión, migran hacia el lugar donde se ha producido y restauran las estructuras dañadas. Las fibras de colágeno están constituidas sobre todo por colágeno tipo I, V y en menor medida IV y su disposición característica asegura el mantenimiento de una tensión uniforme en toda la estructura corneal. El espacio interfibrilar del tercio estromal anterior y central es rico en proteoglicanos, responsables principalmente de captar agua e iones.

En la córnea posterior, inmediatamente después del estroma, se localiza una capa acelular muy resistente e impermeable al aire formada por entre 5 y 8 capas de colágeno y libre de queratocitos. La denominada "Capa Dua" (Dua et al., 2013).

La membrana de Descemet une el estroma y la capa de Dua con la capa celular más interna de la córnea, el endotelio. Esta membrana, también denominada membrana basal posterior, está formada por fibrillas de colágeno y proteínas como laminina y

fibronectina. Sirve de anclaje para el endotelio, una capa unicelular no regenerable, localizada en la superficie posterior de la córnea y encargada de mantener la transparencia a través del control del balance hídrico. Casi todos los intercambios metabólicos de la córnea ocurren a través de la interacción del endotelio con el humor acuoso.

4. LA CONJUNTIVA

La conjuntiva es una membrana mucosa elástica y transparente que cubre el globo ocular manteniendo una zona de continuidad desde el limbo esclero-corneal hasta el interior de los párpados. A diferencia de la córnea, la conjuntiva está muy vascularizada y presenta gran cantidad de tejido linfoide. Es particularmente sensible a las agresiones externas de origen infeccioso o alérgico, a las reacciones autoinmunes, a la irritación y a la sequedad ocular. Se divide en tres regiones principales: conjuntiva bulbar, conjuntiva tarsal o palpebral y conjuntiva de fondo de saco o fórnix. La conjuntiva bulbar proporciona cobertura a la esclera y a su vez se subdivide en dos zonas diferenciadas, la zona limbal que comienza inmediatamente a continuación del epitelio corneal y la zona escleral. En la conjuntiva tarsal se diferencian principalmente tres zonas: marginal, tarsal y región orbital. Finalmente, el fórnix, que forma la unión entre la conjuntiva bulbar y la palpebral, se divide en región superior, inferior, lateral y zona media.

El epitelio conjuntival, después de las glándulas lagrimales, es la segunda fuente de electrolitos y agua para la película lagrimal (Dartt and Willcox, 2013). Consiste en una capa celular de epitelio escamoso y columnar estratificados no queratinizados con células caliciformes intercaladas (Gipson, 2016; Shumway and Wade, 2018).

Las células caliciformes o Goblet de la conjuntiva se consideran la fuente principal de mucinas, mayoritariamente de las formadoras de gel, para la superficie ocular. Las cuales, como se ha descrito anteriormente, tienen un papel esencial en el

anclaje de la película lagrimal a los epitelios corneal y conjuntival (Gipson and Argüeso, 2003).

Tienen forma redondeada u ovalada dependiendo de la zona del epitelio donde se localicen y cuentan con un diámetro que puede oscilar entre 10 y 40 μm en función de si se encuentran llenas o de si acaban de liberar su secreción mucínica. Su membrana basal se encuentra en contacto directo con la membrana basal del epitelio, por lo que cubre todo su grosor llegando hasta la superficie apical. Lateralmente, Gipson et al. han descrito que forman uniones estrechas o “*tight junctions*” con las células epiteliales vecinas (Gipson et al., 2005).

En la conjuntiva humana, las células Goblet se pueden encontrar de forma aislada o formando grupos. La mayor densidad celular por área se encuentra en el epitelio conjuntival de la zona nasal, y las zonas con menor densidad son la conjuntiva bulbar superior e inferior (Kessing, 1968; Moore et al., 1987).

CÉLULAS GOBLET EN LA SUPERFICIE OCULAR

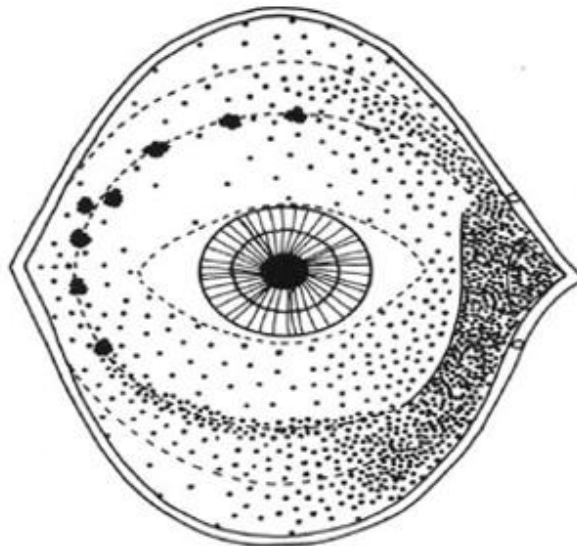


Figura I.3: Representación de la distribución de las células Goblet en la superficie ocular humana. Imagen obtenida de (Kessing, 1968).

Si comparamos la superficie no cubierta con la que se encuentra cubierta por el párpado, el número de células Goblet se duplica (Inatomi et al., 1996; Knop et al., 2011). Estas células contienen un elevado número de gránulos de mucina en su interior, que llenan la célula desplazando el núcleo hacia la membrana basal. Su secreción apocrina liberada por exocitosis contiene principalmente una mucina formadora de gel de elevado peso molecular, la MUC5AC (Inatomi et al., 1996). Además de la secreción de MUC5AC cada vez está más reconocido que las células Goblet también intervienen modulando la respuesta inmune en la superficie ocular mediante la liberación de citoquinas (García-Posadas et al., 2016). Su secreción está modulada por las terminaciones nerviosas del sistema simpático y parasimpático de los plexos epiteliales y subbasales que se distribuyen rodeándolas (Diebold et al., 2001).

Cuando se produce una disminución de la concentración de MUC5AC, la naturaleza hidrofílica de la película lagrimal se ve alterada, disminuyendo la humectabilidad y la lubricación de la superficie ocular.

4.1 CITOLOGÍAS DE IMPRESIÓN CONJUNTIVAL

La superficie ocular es una parte del cuerpo de fácil acceso. Debido al impacto producido por las patologías de la superficie ocular en las células Goblet, se han desarrollado diferentes técnicas para evaluar su estado. Entre ellas la más utilizada es la citología de impresión conjuntival.

Esta prueba consiste en una técnica mínimamente invasiva, que evalúa histológicamente la densidad celular, retirando las células situadas en las capas más superficiales del epitelio, mediante la aplicación de papel de filtro absorbente durante unos segundos. Inicialmente se empleaban membranas de acetato de celulosa, pero se descubrió que no eran el material más efectivo para muchas de las técnicas inmunohistoquímicas o análisis genéticos, por lo que se han empezado a utilizar membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) y polietersulfona (PES).

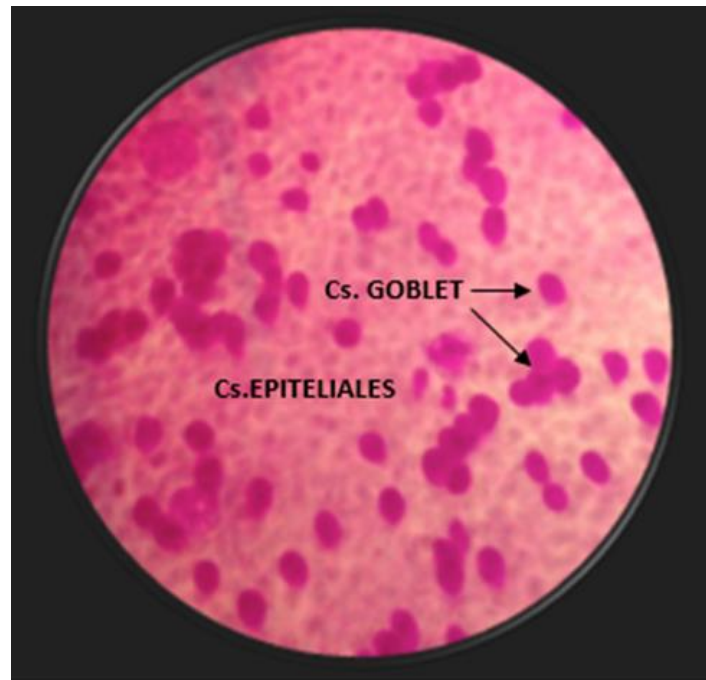


Figura I.4: Citología de impresión conjuntival con tinción PAS – hematoxilina (20x) del área bulbar superior de un sujeto sano. Lecho de células epiteliales y alta densidad de células Goblet o caliciformes.

Además de para análisis histológicos y diferentes técnicas de biología molecular, la muestra obtenida puede ser analizada por diferentes métodos entre los que se incluye la microscopía confocal. Peral y colaboradores desarrollaron una técnica en la que se combina la citología de impresión conjuntival y la microscopía láser confocal con el objetivo de obtener una imagen en 3D de las células Goblet y de su secreción mucínica. Este método hace posible la evaluación cuantitativa del espesor de la célula y de su secreción proporcionando datos de especial relevancia en el diagnóstico de alteraciones oculares (Peral and Pintor, 2008).

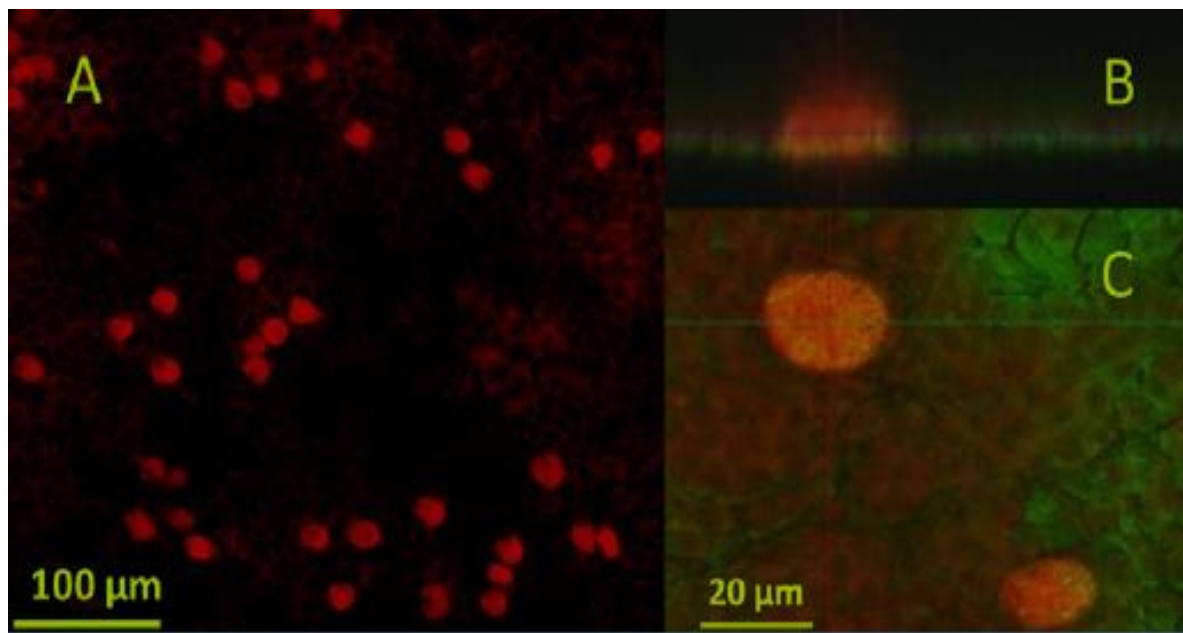


Figura I.5: Imagen de citología de impresión obtenida por microscopía láser confocal. (A) Densidad de células Goblet obtenida con magnificación 20x (B) espesor de la capa celular (CLT) y altura nube de mucina (MCH) (C) Células Goblet con aumento 40x. *Imagen obtenida de* (Carracedo et al., 2016).

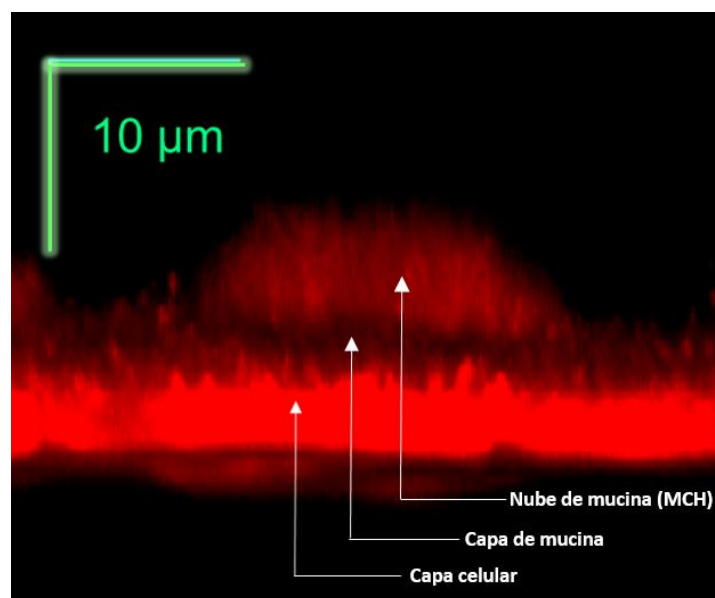


Figura I.6: Detalle de la secreción de la célula Goblet. *Imagen adaptada de* (Peral and Pintor, 2008).

Muchas de las patologías de la superficie ocular revelan una densidad de células Goblet disminuida y directamente relacionada con la severidad de la alteración (Nelson JD, 1986). Numerosos estudios han reportado la asociación entre la sintomatología de sequedad ocular y la densidad de células Goblet en la conjuntiva (Moore et al., 2009; Yeo et al., 2003; Zuazo et al., 2014). Por lo que, en la última década, esta técnica se ha convertido en uno de los métodos estándar para el diagnóstico y la monitorización del síndrome de ojo seco (Wolffsohn et al., 2017).

Varios estudios muestran que la pérdida de células Goblet está correlacionada con la gravedad clínica y el nivel de inflamación de la superficie ocular en ojo seco acuodeficiente. Además se ha observado que la sintomatología de irritación está inversamente correlacionada con la densidad de células Goblet (Zuazo et al., 2014).

5. IRRITACIÓN OCULAR Y ENFERMEDAD DE OJO SECO

Las mucosas oculares están expuestas de forma directa al medio ambiente y por tanto a diferentes alérgenos y sustancias irritantes. El término irritación ocular se usa para describir un amplio espectro de síntomas entre los que se incluyen sequedad ocular, picazón, ardor y sensación de arenilla. Esta condición se encuentra entre las quejas más comúnmente reportadas en las consultas oftalmológicas y optométricas pudiendo estar asociada a numerosas causas.

Factores como el porte de lentes de contacto y/o el uso de pantallas de visualización, la presencia de agentes irritantes externos o contaminantes pueden producir irritación ocular transitoria. Sin embargo, si la exposición del ojo a estos agentes es continua, la sintomatología de irritación ocular puede llegar a convertirse en crónica.

La severidad del daño producido por un agente externo en la superficie ocular depende de diferentes factores como el pH, la capacidad de unión a las células de los epitelios corneal y conjuntival y el grado de penetración principalmente a nivel corneal. En el momento en que un agente irritante entra en contacto con la superficie ocular, comienzan a accionarse mecanismos de defensa. Entre ellos encontramos la acción de

INTRODUCCIÓN

la película lagrimal y del parpadeo, que de manera conjunta actúan eliminando sustancias, alérgenos y patógenos potencialmente dañinos. Inicialmente se produce un aumento en la secreción lagrimal con el objetivo de disminuir o eliminar su contacto directo con las células epiteliales y de forma paralela aumenta la tasa de parpadeo para conducir lo antes posible el agente externo hacia el sistema de drenaje nasolagrimal. En caso de que con este proceso no se consiga la eliminación total del agente irritante, entran en juego el glicocálix, las uniones estrechas y las células epiteliales corneales y conjuntivales limitando su ingreso en las capas más profundas del tejido.

La literatura científica atribuye en gran medida la irritación ocular a los procesos alérgicos. No obstante, se ha descrito que su aparición también está estrechamente relacionada con otra de las patologías de la superficie ocular de mayor prevalencia, la enfermedad de ojo seco (Stull et al., 2017). Galor y colaboradores demostraron recientemente que los pacientes con sintomatología de irritación ocular moderada - severa también presentan síntomas más severos de sequedad ocular (Galor et al., 2018). A menudo ambos procesos se encuentran solapados, lo que hace difícil el diagnóstico diferencial entre patologías que incluyen irritación, sequedad ocular o los dos procesos.

Los pacientes con sequedad ocular, sin necesidad de tener en cuenta la etiología, presentan generalmente una superficie ocular comprometida. Los mecanismos de defensa naturales de la superficie ocular, en este caso, no son plenamente funcionales, apareciendo zonas de desecación más expuestas y vulnerables de lo normal a agresiones externas. Por otro lado, en sujetos sanos, la presencia continua de agentes irritantes puede conducir a daño en las estructuras oculares más externas. Algunas como las células epiteliales corneales o las células caliciformes conjuntivales se encargan de secretar una fracción importante de los componentes de la película lagrimal. Por lo que si se ve afectada su función va a conducir a fenómenos de sequedad ocular secundarios a procesos irritantes. Ambos

procesos se encuentran en todo momento interrelacionados, por lo que el tratamiento de los síntomas debe abordarse al mismo tiempo.

La definición de la Enfermedad de Ojo Seco (EOS) ha evolucionado a medida que ha avanzado el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de esta patología. La más reciente y que mejor refleja lo que implica esta enfermedad es la establecida por el panel de expertos del TFOS DEWS II en el año 2017 (Craig et al., 2017b). En ella se recoge la naturaleza multifactorial del ojo seco como una enfermedad donde la pérdida de la homeostasis de la película lagrimal es el concepto fisiopatológico central. Como característica principal sigue presente la sintomatología ocular, dentro de la que se incluyen molestias y/o alteraciones visuales. El reflejo del proceso clínico de inestabilidad de la película lagrimal, hiperosmolaridad, inflamación y daño en la superficie ocular, también se consideró clave a la hora de transmitir la etiología de la enfermedad. Por último, el aumento de la literatura científica en el área de las anomalías neurosensoriales asociadas a la enfermedad hizo necesaria la inclusión de este término en la definición (Belmonte et al., 2017; Galor et al., 2015).

Teniendo en cuenta estas características se estableció la definición oficial recogida a continuación:

“El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular, que se caracteriza por una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y que va acompañada de síntomas oculares, en la que la inestabilidad e hiperosmolaridad de la superficie ocular, la inflamación y el daño de la superficie ocular, y las anomalías neurosensoriales desempeñan papeles etiológicos” (Craig et al., 2017b).

5.1 CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE OJO SECO

Tradicionalmente se han planteado diferentes formas de clasificar la enfermedad de ojo seco. Desde la perspectiva etiopatogénica, esta patología puede dividirse en dos grandes categorías: ojo seco acuodeficiente y ojo seco evaporativo, los cuales pueden producirse de forma aislada o combinada (Lemp, 1995). Para la subclasificación, inicialmente el panel de expertos del TFOS propuso en 2007 (Lemp et al., 2007) varios factores intrínsecos y extrínsecos que se cree que tienen influencia en el desarrollo de la enfermedad.

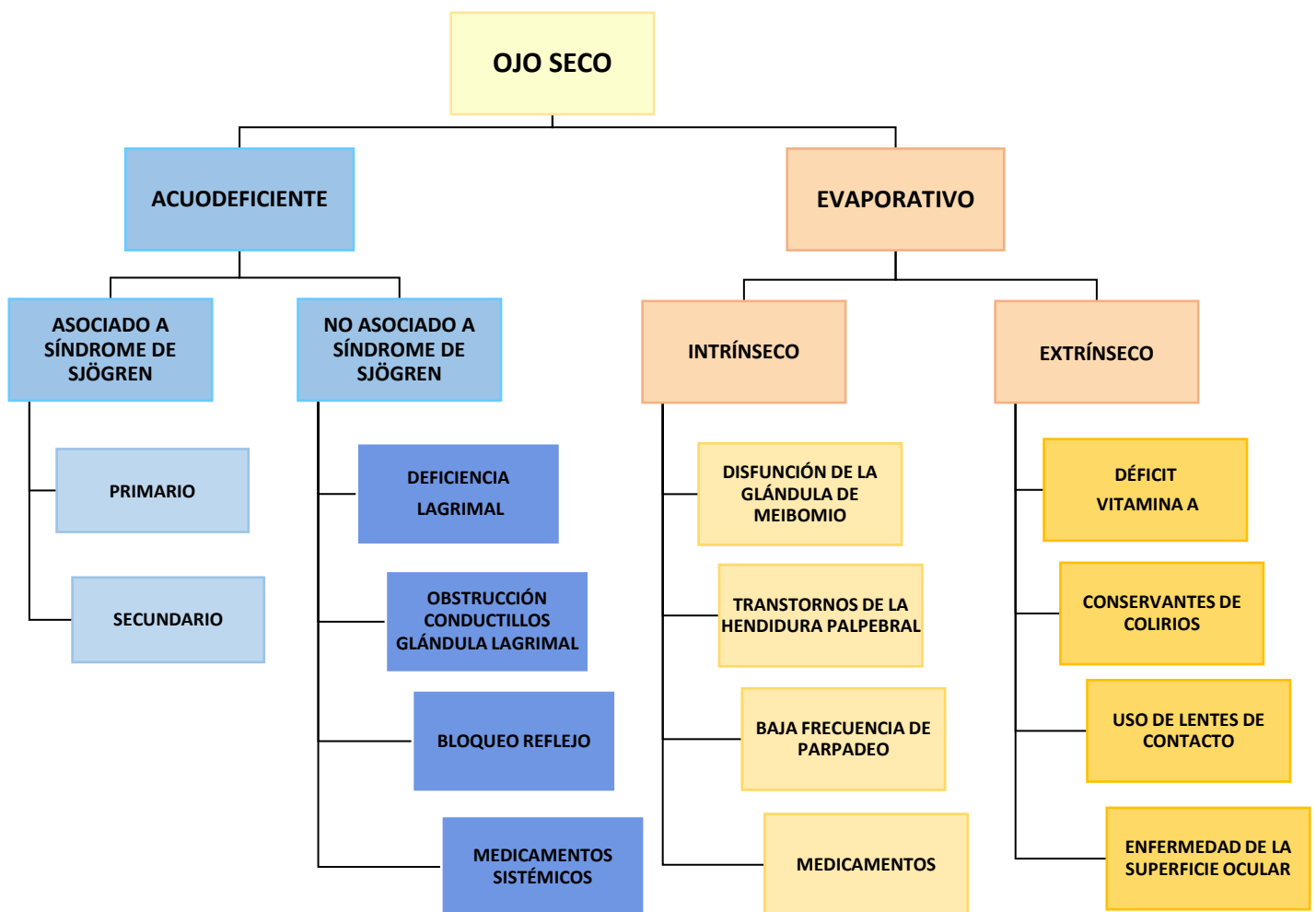


Figura I.7: Clasificación de ojo seco del informe del TFOS DEWS 2007.

Esquema adaptado (Lemp et al., 2007)

Sin embargo durante la revisión de este informe en el año 2017 (Craig et al., 2017b) se han propuesto modificaciones de los esquemas de clasificación tradicionales. Teniendo en cuenta la naturaleza cíclica de la enfermedad de ojo seco, una vez que el individuo entra en el círculo fisiopatológico (inestabilidad de la película lagrimal, hiperosmolaridad e inflamación de la superficie ocular) independientemente del punto de partida, las etiologías subyacentes acuodeficientes y evaporativas se combinan.

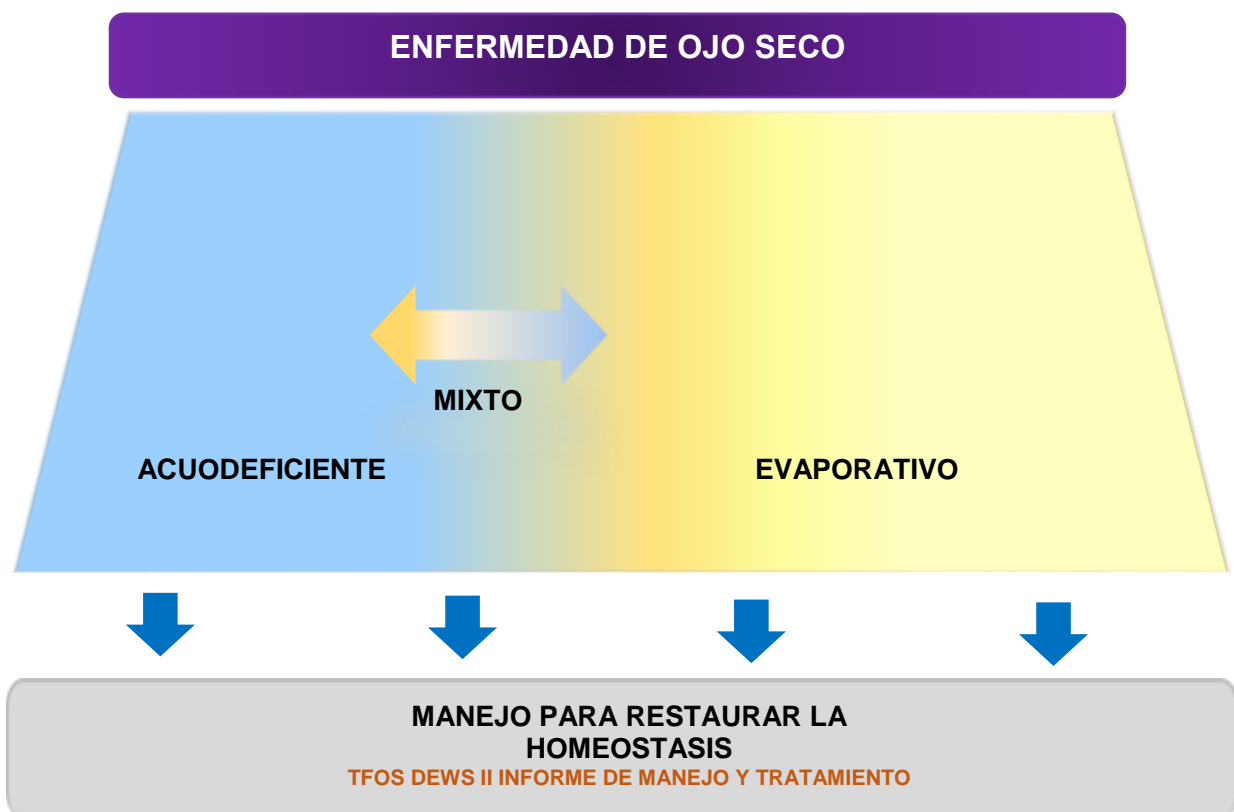


Figura I.8: Clasificación de la enfermedad de ojo seco del informe del TFOS DEWS II 2017. Imagen adaptada (Craig et al., 2017b).

Factores como las condiciones ambientales, el uso de lentes de contacto y la disminución en la tasa de parpadeo influyen en la sequedad ocular de etiología evaporativa. Situaciones más severas como la disfunción de las glándulas de meibomio implican una deficiencia generalizada de la capa lipídica de la película lagrimal. La enfermedad de ojo seco de origen acuodeficiente se produce por una disminución en la secreción lagrimal. Puede estar relacionada con numerosas causas. Entre los principales factores de riesgo se encuentran la edad avanzada, la administración de

algunos fármacos sistémicos y enfermedades de origen autoinmune como el síndrome de Sjögren. Aunque la causa principal varíe, todas sus formas entran dentro del círculo clínico que conduce a los signos y síntomas de la Enfermedad de Ojo Seco.

El descenso de la producción y/o el incremento de la evaporación de la película lagrimal producen un aumento en la osmolaridad, desencadenando una secuencia inflamatoria que produce daño en las células epiteliales, en el glicocálix y en las células caliciformes en forma de epitelopatía punteada, siendo la forma final común para todos los tipos de ojo seco.

Identificar la etiología subyacente predominante de la enfermedad de ojo seco (acuodeficiente o evaporativo) sigue siendo importante para la clasificación y es crucial para el abordaje clínico de la enfermedad. No obstante este panel de expertos sostiene que los subtipos forman parte de un cuadro de enfermedades en lugar de considerarse entidades fisiopatológicas diferenciadas (Craig et al., 2017b).

5.2 INFLAMACIÓN ASOCIADA A LA ENFERMEDAD DE OJO SECO

Ha sido descrito que aproximadamente el 50% de los pacientes con sintomatología de sequedad ocular sufren procesos inflamatorios en la superficie ocular con efectos clínicamente significativos (Boehm et al., 2011; Lam et al., 2009). La hiperosmolaridad de la película lagrimal promueve la producción de biomarcadores inflamatorios, diferenciación celular anormal y apoptosis en las células epiteliales. Este efecto produce una activación inmediata de las vías MAPK (de las siglas en inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases* o proteínas quinasas activadas por mitógenos) y NFkB (*Nuclear factor kappa B* o factor nuclear kappa B), que controlan la supervivencia celular y la producción de citoquinas, conduciendo a una cascada de eventos inflamatorios. Entre ellos, se produce una activación transcripcional de genes que codifican metaloproteinasas de matriz pro-inflamatorias (MMPs), especialmente MMP-9.

La MMP-9 es una de las metaloproteinasas de matriz más estudiadas, debido a su papel central en los procesos inflamatorios de la superficie ocular (Acera et al., 2013, 2008; Chotikavanich et al., 2009). Esta enzima actúa desestabilizando la película lagrimal y contribuye a la disrupción de la barrera epitelial mediante la escisión de proteínas como la *zonula occludens* y ocludina (Pflugfelder et al., 2005). Su expresión por las células epiteliales corneales en condiciones de sequedad ocular se encuentra incrementada y presenta una correlación positiva con el estrés generado por la hiperosmolaridad (Li et al., 2004). Por esta razón constituye uno de los biomarcadores más relevantes para el diagnóstico clínico y la monitorización de procesos inflamatorios de la superficie ocular como la enfermedad de ojo seco.

La expresión de la MMP-9 está inducida por la presencia de otras citoquinas relacionadas con las primeras etapas de la cascada inflamatoria en la enfermedad de la superficie ocular. Formas pro-inflamatorias de interleuquina - 1 (IL-1 α e IL-1 β) e interleuquina - 6 (IL-6) están involucradas en procesos inflamatorios locales y sistémicos y median directamente la regulación de la MMP-9 a través de la vía de señalización JNK (*Jun N-terminal* Kinase o Quinasa Jun N-Terminal) (Li et al., 2004, 2002).

Una de las primeras opciones para reducir los signos y síntomas de sequedad ocular es el uso de sustitutos lagrimales, sin embargo, otras modalidades de tratamiento como fármacos anti-inflamatorios, retención lagrimal y terapias más novedosas enfocadas a la estimulación de la secreción lagrimal también están disponibles (Jones et al., 2017). La mayoría de los productos comercializados actualmente son sustitutos lagrimales. Estas formulaciones suelen tener un efecto en la sequedad como síntoma, mejorando la comodidad del paciente; sin embargo, en la mayoría de los casos, no tienen ningún efecto sobre los procesos inflamatorios de la superficie ocular.

6. SUSTITUTOS LAGRIMALES

Los sustitutos lagrimales son soluciones acuosas que contienen como ingredientes activos diferentes polímeros con el objetivo de aportar viscosidad a la solución, así como propiedades humectantes, emulsionantes y lubricantes. Se utilizan ampliamente en la clínica tanto para el tratamiento de la disfunción lagrimal producida por alteraciones en la producción de cualquiera de las fases de la lágrima, como para el alivio de las irritaciones oculares. Siendo la primera opción sea cual sea el estadio de la alteración.

Su objetivo principal consiste en aliviar la sintomatología y favorecer la recuperación de la superficie ocular cuando se producen lesiones en las capas más superficiales de los epitelios corneal y conjuntival. Además, en el caso de la irritación ocular, actúan facilitando la limpieza y reduciendo el contacto de agentes externos y patógenos con los tejidos.

6.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUSTITUTOS LAGRIMALES

A la hora de desarrollar sustitutos lagrimales destinados al alivio de la sintomatología de sequedad e irritación ocular, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Búsqueda de buena tolerancia a nivel de la superficie ocular.
- Inclusión de ingredientes con alta afinidad por los epitelios corneal y conjuntival.
- Viscosidad similar o ligeramente superior a la de la película lagrimal para evitar borrosidad.
- Incremento del tiempo de permanencia en la superficie ocular.

6.1.1 PROPIEDADES FÍSICO – QUÍMICAS DE LA PELÍCULA LAGRIMAL Y DE LOS SUSTITUTOS LAGRIMALES

Actualmente ningún sustituto lagrimal tiene la capacidad de suplir por completo las características de la lágrima ya que no es posible reproducir con exactitud los componentes naturales que la forman.

Uno de los principales objetivos en la formulación de sustitutos lagrimales es emular el contenido hídrico y las características físico-químicas de la película lagrimal humana (pH, osmolaridad, tensión superficial, viscosidad).

- pH – El pH de la película lagrimal es un factor de gran importancia, ya que se encuentra relacionado con la función fisiológica que desempeña en el ojo. Es necesario tener en cuenta que la solución quedará depositada sobre la superficie ocular, por lo que deberá tener un pH similar al de la lágrima humana para evitar lesiones oculares generadas por excesiva alcalinidad o basicidad. La literatura científica recoge que el valor fisiológico de pH de la lágrima humana en condiciones normales se encuentra entre de 6,5 y 7,6, con un valor promedio entre 7,0 y 7,6 dependiendo del método de medida (Abelson et al., 1981; Fischer and Wiederholt, 1982; Kaufman and Alm, 2004). Por tanto, cualquier solución destinada a ser instilada directamente en el ojo debe ser neutra o ligeramente alcalina (Gangrede et al., 1996). Aunque el fluido lagrimal presenta cierta capacidad amortiguadora, para la formulación de sustitutos lagrimales se proponen valores de pH entre 7,2 y 7,6 al ser los mejor tolerados (Motolko and Breslin, 1981). Para conseguir este objetivo se utilizan sistemas tampón o “*buffers*” reguladores de pH como el tampón fosfato (fosfato sódico monobásico / fosfato sódico dibásico), tampón citrato (ácido cítrico monohidrato / citrato sódico dihidrato), tampón bicarbonato (ácido carbónico / ión bicarbonato) y tampón bórico / bórax (ácido bórico / bórax decahidrato).

- Osmolaridad – la osmolaridad de la lágrima humana es un parámetro físico-químico de considerable importancia, dado que sus valores reflejan el grado de intercambio de agua y solutos entre la lágrima y la superficie ocular. La presión osmótica de la película lagrimal en sujetos sanos se corresponde con la de una solución de cloruro sódico al 0.9%, es decir, está en torno a 300 mOsm/L (Craig et al., 1995; Tomlinson et al., 2006). Sin embargo, en sujetos con sequedad ocular o con alteraciones en la superficie ocular, la concentración de solutos aumenta al disminuir el volumen lagrimal (hiperosmolaridad). Se propone la isotonicidad o una ligera hipotonicidad en las fórmulas de sustitutos lagrimales, con el objetivo de contrarrestar la hiperosmolaridad que se produce en pacientes con sequedad ocular, restableciendo la osmolaridad normal fisiológica. El componente principal utilizado para establecer la tonicidad de las soluciones oftálmicas es el NaCl. En los últimos años se ha propuesto la inclusión en las nuevas fórmulas de electrolitos que se encuentran de forma natural en la lágrima como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} y que juegan un papel muy importante en el mantenimiento de las funciones de la superficie ocular.
- Tensión superficial – el término tensión superficial está relacionado con la humectabilidad. El interés de este parámetro a la hora de diseñar sustitutos lagrimales está en que juega un papel clave en las propiedades humectantes de la solución. El componente mayoritario de la fase serosa de la película lagrimal es el agua, cuya tensión superficial está en torno a 70 mNm^{-1} , mientras que la del epitelio corneal es relativamente inferior 28 mNm^{-1} . El valor medio de la película lagrimal en sujetos sanos está comprendido entre 42 y 46 mN/ m^{-1} (Nagyová and Tiffany, 1999; Tiffany et al., 1989). Para la correcta extensión de una solución acuosa sobre la superficie ocular es necesaria la presencia de agentes con propiedades tensioactivas que igualen la tensión superficial de la lágrima y de los epitelios. En la lágrima natural es

el componente mucínico el que permite este efecto. Por tanto, cualquier alteración en la fase mucínica repercutirá en la humectabilidad de la superficie ocular. Cuando se utiliza un sustituto lagrimal, el volumen de instilación es mucho mayor al volumen medio del fluido lagrimal (25 - 50 μ l) frente a 7 μ l respectivamente, por lo que la influencia del valor de tensión superficial de la solución instilada es de especial importancia. La valoración de la idoneidad de este parámetro se puede realizar indirectamente evaluando la capacidad de humectar una superficie. Entre los principales ingredientes con propiedades surfactantes incluidos en las soluciones oftálmicas se encuentran polímeros sintéticos derivados del vinilo como la polivinilpirrolidona o povidona y derivados del etilenglicol, como los polietilenglicoles, que además de propiedades surfactantes aportan propiedades bioadhesivas y no son irritantes para los tejidos oculares.

- Viscosidad - la película lagrimal humana es un fluido no newtoniano, con una viscosidad en torno a 1 – 2 centipoises (cP) (Zhu and Chauhan, 2008). Los sustitutos lagrimales incluyen como ingredientes activos polímeros viscosizantes de alto peso molecular con propiedades viscoelásticas y bioadhesivas. Al añadir componentes con estas propiedades, se consigue incrementar la viscosidad de la solución oftálmica y su adhesión a la superficie ocular. Este efecto proporciona un incremento en el tiempo de retención de la solución en el ojo, mayor lubricación y protección del epitelio frente a la desecación y a la presencia de agentes irritantes. Al mismo tiempo actúan como barrera física facilitando la regeneración del epitelio en los casos en los que ya existe daño. El valor de la viscosidad de las soluciones debe estar siempre relacionado con la severidad de la sintomatología del paciente. Generalmente se emplean formulaciones cuya viscosidad oscila entre 10 y 25 cP. Las fórmulas de viscosidad elevada (> 50 cP) producen borrosidad, lo cual será aceptado por pacientes con sintomatología severa.

Sin embargo, la tolerancia de soluciones muy viscosas en pacientes con sintomatología leve - moderada será menor. Algunos de los polímeros más empleados actualmente en soluciones oftálmicas son polisacáridos de origen vegetal derivados de la celulosa. Se clasifican como mucílagos porque actúan imitando las propiedades de las mucinas presentes de forma natural en la película lagrimal. Los más comunes son el hidroxipropilguar (HP-Guar) y derivados celulósicos como la carboximetilcelulosa (CMC) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC). Otros ejemplos son el hialuronato sódico (HA), el alcohol polivinílico (PVA) y la polivinilpirrolidona (PVP).

6.1.2 AGENTES CONSERVANTES

Cualquier preparado oftálmico diseñado para ser instilado en la superficie ocular, debe ser estéril, por lo que la fabricación tiene que realizarse en condiciones asépticas y éstas deben mantenerse durante su uso.

Inicialmente con los dispositivos multidosis era necesaria la presencia de un agente conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos en las soluciones. Sin embargo, ha sido descrito que la administración crónica de formulaciones con conservantes genera un efecto tóxico sobre el epitelio, principalmente en aquellos sujetos en los que la superficie ocular se encuentra comprometida, agravando las alteraciones ya existentes (Anwar et al., 2013; Baudouin, 2001; Mantelli et al., 2011; Noecker, 2001; Stalmans et al., 2013; Stewart et al., 2011). Se cree que la toxicidad de estos compuestos y su efecto en la disfunción de células epiteliales así como la inhibición de la proliferación celular están relacionados con su efecto antimicrobiano. El mecanismo de acción mediante el cual actúan se basa en la interacción con los lípidos, proteínas y glicoproteínas de las membranas celulares de los microorganismos pero también podrían interaccionar con las membranas celulares humanas (Baudouin et al., 2010a).

Los principales agentes conservantes empleados en las soluciones oftálmicas son compuestos organomercuriales, amidinas, biguanidas, alcoholes, complejos oxiclорados y amonios cuaternarios. Numerosos estudios revelan que la exposición crónica a estos compuestos puede inducir apoptosis de las células de los epitelios corneal y conjuntival provocando alteraciones en la barrera hidrofóbica epitelial, inestabilidad de la película lagrimal y daño en los nervios corneales (Chen et al., 2013; Lin et al., 2013; Pinheiro et al., 2016). En usuarios de lentes de contacto, al igual que ocurre con las soluciones de mantenimiento, la aplicación reiterada de sustitutos lagrimales durante el porte puede generar fenómenos de absorción de los conservantes en la matriz de las lentes y una posterior liberación a la película lagrimal (Morris et al., 2018). Este fenómeno implica un mayor tiempo de contacto de la superficie con el conservante y se ha relacionado con la aparición de procesos alérgicos (Jones and Powell, 2013).

La tendencia en los nuevos desarrollos de fórmulas oftálmicas va dirigida hacia la fabricación de soluciones libres de conservantes. Uno de los avances más importantes en la fabricación de sustitutos lagrimales ha sido la eliminación de su presencia en las fórmulas gracias a sistemas de envasado en monodosis y a la reciente aparición de dispositivos multidosis con filtros esterilizantes incorporados. Con estas nuevas tecnologías se evita la aparición de los efectos adversos asociados a estos compuestos.

7. ALOE VERA

La especie *Aloe barbadensis miller*, comúnmente llamada *Aloe vera*, pertenece a la familia Asphodelaceae (Liliaceae). Es una planta perenne de porte más o menos arborescente y de color verde azulado o grisáceo. Se caracteriza por tener hojas suculentas, lanceoladas, harto carnosas dispuestas en forma de roseta basal con el margen cubierto de espinas y por una raíz fibrosa y gruesa. Ha sido utilizada con fines medicinales en las culturas egipcia, griega, india, mexicana y china durante milenios

(Marshall, 1990). Las primeras referencias sobre su uso se remontan al “Libro de las hierbas medicinales” chino, considerado una de las primeras obras escritas en la historia de la literatura.

Gracias a sus mecanismos de adaptación a hábitats con disponibilidad de agua baja o irregular, es común encontrarla en regiones áridas, semiáridas o de precipitación errática. Aunque está descrito que originariamente era una especie endémica del este y sur de África (Breyer-Brandwijk, 1962; Grindlay and Reynolds, 1986), hoy en día se puede encontrar en la mayor parte de las regiones cálidas del mundo. Su cultivo se ha extendido principalmente por Estados Unidos, Japón, y en países caribeños y tropicales, debido en gran medida al aumento de su uso en aplicaciones biomédicas, farmacéuticas y cosméticas.

Dependiendo de la zona de la hoja que se procese, se pueden obtener dos productos claramente diferenciados y comercialmente importantes de la planta de *Aloe vera*. La resina, procedente de la zona externa de la hoja, obtenida al evaporar el látex de las células pericíclicas que se encuentran inmediatamente debajo de la piel; y el gel de *Aloe vera*, un material claro y gelatinoso procedente de las células mucilaginosas que se encuentran en el tejido interno de la hoja. Ambos productos se obtienen de las hojas frescas, pero tanto la composición química como las acciones terapéuticas descritas para cada uno de ellos son diferentes.

El gel de *Aloe vera* es el producto utilizado con mayor frecuencia en las industrias cosmética, alimentaria y farmacéutica y constituye entre el 60 y el 80% del peso total de la planta. Consiste en un tejido mucilaginoso rico en polisacáridos (también denominado hidroparénquima), formado por células de paredes muy finas y caracterizadas por su habilidad para almacenar grandes cantidades de agua. Esta característica es la que permite mantener el estado hídrico de la planta aún en condiciones de sequía.

A la hora del procesado industrial, este gel localizado en la parte interna de la hoja en algunos casos se diluye en agua y en otros se somete a un proceso de secado para formar extractos concentrados de *Aloe vera*.

Entre los ingredientes activos que incluye el gel de *Aloe vera* se encuentran monosacáridos (manosa-6-fosfato) y polisacáridos (acemanano, glucomanano), glicoproteínas (alprogen, lectina), alantoína, enzimas (ciclooxygenasa, amilasa, lipasa, catalasa, alcalin fosfatasa, carboxipeptidasa), ácido salicílico, glucosa, colesterol, precursores de prostaglandinas (ácido gamma linoleico), compuestos inorgánicos (magnesio, zinc, calcio, sodio, potasio y fósforo), vitaminas (A, C, E) y aminoácidos esenciales (Ni et al., 2004; Oryan et al., 2010; Surjushe et al., 2008).

Dentro de los carbohidratos, la manosa-6-fosfato y el acemanano son los principales componentes del gel de *Aloe vera* (Davis et al., 1994). Investigaciones existentes refieren diversas estructuras diferentes de polisacáridos que pueden atribuirse a diferentes orígenes geográficos. Los polisacáridos mayoritarios que se encuentran en el gel son el glucomanano, de excelentes propiedades humectantes y emolientes, cuyo uso ha sido reportado en gran cantidad de cosméticos (Henry, 1979); y el acemanano, que constituye la mayor fracción de polisacáridos contenida en el gel y que raramente se encuentra en otro tipo de plantas. Este último (Das et al., 2011) es un polímero soluble en agua formado por largas cadenas de manosa. Se cree que es el que contribuye en mayor medida al efecto emoliente del *Aloe vera* y la literatura científica describe su intervención en procesos inmunitarios y de cicatrización así como su actividad anti-inflamatoria (Ni et al., 2004), antineoplásica y sus efectos antivirales (Peng et al., 1991). Además, contiene glicoproteínas con propiedades anti-alérgicas como el alprogen (Ro et al., 2000). Ha sido descrito que la fracción activa de los polisacáridos presentes en el *Aloe vera* es la de peso molecular de entre 50 y 200 KDa.

Tabla I.2.- Componentes mayoritarios del *Aloe vera*. Información tomada de (Raksha, 2014; Surjushe et al., 2008).

COMPONENTES MAYORITARIOS DEL ALOE VERA		
Antraquinonas	Aloe-emodina; aloína; aloenina; aloesina; aloeresina; ácido aloético; antraceno; antranol; barbaloína; isobarbaloína; éster de ácido cinámico; resistanol	
Carbohidratos	Monosacáridos libres	Manosa; glucosa; galactosa; fructosa; xilosa; aldopentosa; arabinosa; L-ramnosa
	Polisacáridos solubles	Celulosa, glucomanano, acemanano
Glicoproteínas	Alprogen; lectinas	
Vitaminas	Ácido fólico; A (β – caroteno); B1; B2; B3; B6; C; E; colina; ácido fólico; α -tocoferol	
Minerales	Calcio; cromo; magnesio; manganeso; selenio; potasio; zinc; sodio; cobre; hierro; fósforo; cromo	
Enzimas	Amilasa; carboxipeptidasa; catalasa; ciclooxidasa; celulasa; fosfatasa alcalina; lipasa; bradiquinasa; ciclooxigenasa; superóxido dismutasa	
Compuestos de bajo peso molecular	Ácido araquidónico; colesterol; lupeol; giberelina; sublectina; lignina; ácido salicílico; β -sitosterol; campesterol; esteroides; triglicéridos; ácido úrico	
Aminoácidos	Alanina; arginina; ácido aspártico; ácido glutámico; glicina; histidina; lisina; isoleucina; metionina; fenilalanina; prolina; tirosina; treonina; valina	

Entre las indicaciones terapéuticas asociadas al *Aloe vera* que se encuentran descritas en la literatura científica encontramos: propiedades cicatrizantes, emolientes, hidratantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras.

7.2 PROPIEDADES CICATRIZANTES

Los procesos de cicatrización se definen como mecanismos biológicos de regeneración de un tejido tras sufrir una lesión. En este sentido el crecimiento de células endoteliales, epiteliales y fibroblastos juega un papel crítico. El uso del *Aloe vera* con fines cicatrizantes no es reciente. En torno al 99% de la planta es contenido en agua, lo que contribuye a prevenir la desecación en las heridas y proporciona propiedades calmantes. Dentro de los monosacáridos la manosa-6-fosfato es el componente mayoritario del gel de *Aloe vera*. La literatura científica disponible describe que las propiedades cicatrizantes del *Aloe vera* se deben en gran medida a su contenido en glucomanano, un polisacárido formado por numerosas cadenas de manosa y glucosa. Este polisacárido interviene en los procesos de cicatrización, mejorando la síntesis de

colágeno y glucosaminoglicanos de la matriz extracelular, gracias a la estimulación de la actividad y de la proliferación de los fibroblastos (Hashemi et al., 2015; Khorasani et al., 2009). Por otro lado, también ha sido descrito el efecto en la cicatrización de la manosa-6-fosfato cuando se une a proteínas formando mucopolisacáridos. Estas estructuras, muy abundantes en las secreciones mucosas, actúan como reservorio de agua facilitando la cicatrización y tienen un papel como filtro biológico, atrapando grandes estructuras e impidiendo su acceso a otros tejidos. Dicha propiedad tiene especial importancia ya que consiste en un efecto similar al ejercido por las mucinas presentes de forma natural en la película lagrimal de sujetos sanos.

El tejido mucilaginoso del *Aloe vera* no solo favorece el incremento de la cantidad de colágeno en la zona de la herida, sino que también aumenta las conexiones transversales entre estas moléculas, acelerando los procesos de cicatrización (Boudreau and Beland, 2006).

Por otro lado, se ha descrito la intervención de sistemas enzimáticos antioxidantes presentes en el tejido mucilaginoso del gel de *Aloe vera* como el glutatión, peróxido dismutasa y la superóxido dismutasa, en la aceleración de los procesos de cicatrización, gracias a la neutralización del efecto de los radicales libres en la herida y a sus propiedades antiinflamatorias (Hajhashemi et al., 2012). En este sentido se cree que el *Aloe vera* puede actuar facilitando la cicatrización de heridas a través de la regulación de las proteasas, más en concreto del grupo de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Mandal et al., 2017).

La angiogénesis es uno de los procesos principales durante la formación de nuevos tejidos. Sin el aporte de oxígeno y metabolitos al tejido, no se produce un óptimo proceso de cicatrización. Se han descrito incrementos en el suministro sanguíneo después del tratamiento con *Aloe vera*.

Actualmente los extractos de esta planta son utilizados como ingrediente en un amplio rango de productos, haciendo referencia a sus propiedades cicatrizantes. No

obstante, la búsqueda en bases de datos de ensayos clínicos sobre la seguridad y eficacia en este campo revela que todavía no existe la suficiente evidencia científica para avalar estas propiedades (Dat et al., 2012).

7.3 ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA E INMUNOMODULADORA

Numerosas investigaciones sugieren que el *Aloe vera* podría tener acción antiinflamatoria e inmunomoduladora. Cualquier proceso inflamatorio implica la activación de factores que estimulan la transcripción de genes pro-inflamatorios. En este sentido, la gran cantidad de compuestos presentes en el gel de *Aloe vera* puede ser la responsable de la activación de una o de diversas vías que contribuyen a la acción antiinflamatoria. Se ha sugerido que uno de los mecanismos antiinflamatorios involucrados podría ser una acción inhibitoria del gel de *Aloe vera* sobre la ciclooxigenasa y por tanto sobre la producción de prostaglandinas y leucotrienos (Das et al., 2011). Este efecto se encuentra directamente relacionado con la disminución en los niveles de moléculas pro-inflamatorias (Vázquez et al., 1996).

El factor de transcripción nuclear kappa B (NFkB) juega un papel muy importante en la expresión de numerosos genes implicados en procesos inflamatorios y de muerte celular programada (apoptosis) (Barnes and Karin, 1997). Uno de los mecanismos antiinflamatorios descritos del *Aloe vera* es la disminución de la activación del factor NFkB (Duansak et al., 2003; Kim et al., 2010). Sin embargo, todavía no está del todo claro a qué nivel de señalización actúa ni cuáles son los compuestos presentes en el *Aloe vera* responsables de este efecto. Entre las proteínas pro-inflamatorias, cuya transcripción está mediada por el NFkB, se encuentran las interleuquinas-1, -2, -6 y -8 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) implicadas en inflamación a nivel sistémico y local. Numerosos estudios exponen la participación de estas citoquinas en las primeras etapas de los procesos inflamatorios de la superficie ocular (Li et al., 2004, 2002).

Compuestos como la aloína y la aloe-emodina con estructura polifenólica podrían ser los responsables de la actividad antiinflamatoria del *Aloe vera* (Korkina et

al., 2003; Somboonwong et al., 2000). Los datos proporcionados en las investigaciones de Park y colaboradores en líneas celulares murinas revelaron la reducción de la concentración de mediadores pro-inflamatorios como el óxido nítrico y la ciclooxigenasa - 2 tras la adición de estos compuestos (Park et al., 2009).

Estudios *in vitro* con células epiteliales corneales humanas, han reflejado un descenso de la concentración de IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α en el medio de cultivo después de la adición de extractos de *Aloe vera*. Por otro lado, Duansak y colaboradores han descrito los efectos sobre los niveles de IL-6 y TNF- α en un modelo animal con quemaduras (Duansak et al., 2003).

La mayoría de las investigaciones sobre la actividad inmunomoduladora del *Aloe vera* se centran en los efectos de la fracción mayoritaria de polisacáridos contenidos en el gel, principalmente el acemanano, debido a su implicación en la movilización de células especializadas del sistema inmune como macrófagos y leucocitos. Sorprendentemente, son necesarias concentraciones muy elevadas de este compuesto para conseguir la activación de los macrófagos y leucocitos lo que evidencia la existencia de más componentes en el gel relacionados con este efecto (Boudreau and Beland, 2006; Pugh et al., 2001).

7.4 ACCIÓN ANTIOXIDANTE

En los últimos años, se ha observado un interés creciente en el estudio de la composición química de los extractos herbales debido a las propiedades de algunos de sus componentes en la inhibición, interrupción o ralentización de procesos oxidativos, combatiendo el daño celular causado por la acción de los radicales libres.

La literatura científica revela que los compuestos fenólicos (principalmente flavonoides y antraquinonas) el ácido ascórbico y la vitamina E son los principales responsables de la actividad antioxidante del *Aloe vera* (Du et al., 2007). Estos compuestos se encuentran tanto en la corteza como en el gel de *Aloe vera*. El mecanismo de acción a través del cual ejercen su actividad antioxidante está basado en

una combinación de sus propiedades quelantes, captando iones metálicos con el objetivo de impedir la catalización de procesos oxidativos, y por otro lado de su capacidad para secuestrar radicales libres inhibiendo su acción. Este efecto antioxidante no se debe exclusivamente a la concentración presente de estos compuestos. En el caso de los compuestos fenólicos también depende de su estructura, variaciones en el número y posición de los grupos hidroxilo, dobles enlaces y anillos aromáticos. Cambios estructurales menores implican modificaciones significativas en sus propiedades biológicas y químicas y por tanto en si funcionan modulando la actividad enzimática o como agentes antioxidantes (Rice-Evans, 2004).

Además de la acción antioxidante de los compuesto fenólicos, se ha identificado la contribución a dicha acción de alcaloides y algunos de los polisacáridos presentes en el gel de *Aloe vera* (Kang et al., 2014). Sin embargo, algunos autores mantienen que los compuestos presentes en la corteza externa son los que contribuyen mayoritariamente a la acción antioxidante de la planta mientras que el gel interno o tejido parenquimatoso lo hace en menor medida (Lucini et al., 2015).

7.5 EFECTO CONTRA LAS RADIACIONES GAMMA Y ULTRAVIOLETA

Algunos autores han descrito el efecto del *Aloe vera* neutralizando el impacto de la exposición de los epitelios a la radiación ultravioleta (UV) (Haddad et al., 2013). Aunque muchos compuestos herbales se usan comúnmente como fotoprotectores contra los efectos nocivos de la radiación UV, los mecanismos involucrados no están del todo claros. En el caso del *Aloe vera* se cree que los esteroides que contiene podrían estar involucrados en este efecto protector frente a la radiación UV (Misawa et al., 2017). Por otro lado, también se ha descrito que algunos oligosacáridos y polisacáridos actúan modulando la liberación de citoquinas por parte de los queratinocitos lo que ralentizaría las reacciones de hipersensibilidad inducidas por la exposición a radiación ultravioleta (Byeon et al., 1998; Strickland et al., 1999). Estudios *in vitro* e *in vivo* de Rodrigues y colaboradores muestran el efecto protector de extractos de *Aloe Barbadensis Miller*

contra la muerte celular inducida por radiación UVA en una línea de queratinocitos HaCaT (Rodrigues et al., 2016). Por otro lado, investigaciones sobre su capacidad para mejorar la supresión inmune inducida por la radiación ultravioleta en modelo murino revelaron que los animales tratados tópicamente con *Aloe vera* conservaron la cantidad y la morfología de las células epidérmicas dendríticas implicadas en el inicio y en la regulación de la respuesta inmune (Strickland et al., 1994). Ji y colaboradores evaluaron la absorción de la radiación ultravioleta de una solución oftálmica formulada con extractos de *Aloe vera*. Sus resultados mostraron picos de absorción de la solución en las regiones del UVA, B y C atribuyendo esta propiedad a los cromóforos fenólicos de la aloína (Ji and Jia, 2009).

El efecto protector que el *Aloe vera* parece realizar sobre otros epitelios humanos, nos hace pensar que su uso sería beneficioso si se incorpora en soluciones humectantes destinadas a la superficie ocular.

7.6 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

El uso de extractos de *Aloe vera* ha sido propuesto para la elaboración de soluciones oftálmicas destinadas al tratamiento de infecciones oculares como conjuntivitis, infecciones corneales y de los párpados debido a su efecto antimicrobiano (Woźniak and Paduch, 2012). Se cree que este efecto es resultado de la acción sinérgica de varios compuestos presentes en la planta. Entre ellos se ha atribuido una posible acción antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* del compuesto aloemodina, el cual actúa inhibiendo la formación de *biofilms* (Xiang et al., 2017).

En términos de eficacia se ha demostrado su amplio espectro contra bacterias gram positivas y gram negativas eliminando o reduciendo en gran medida su crecimiento (Cataldi et al., 2015). Algunos autores han descrito la actividad antifúngica de proteínas aisladas del gel de *Aloe vera* contra *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida albicans* (Das et al., 2011). Estas propiedades antimicrobianas se han atribuido a compuestos como las saponinas, las antraquinonas (Reynolds and Dweck, 1999; Urch,

INTRODUCCIÓN

1999) y a los polisacáridos presentes en el gel a través de la activación de leucocitos y macrófagos movilizados para destruir los patógenos (Gelderman et al., 1998; Lawless and Allan, 2000; Pugh et al., 2001).

Dentro del grupo de las antraquinonas, se ha descrito la acción de la aloína, un compuesto fenólico que actúa inactivando algunos virus con envoltura como el Herpes simplex, Varicella-zoster e Influenza (Borges-Argáez et al., 2019; Sydiskis et al., 1991). El posible mecanismo de acción podría estar basado en la inhibición de la adsorción del virus evitando así su replicación. Otros compuestos activos presentes en el *Aloe vera* como el lupeol (dentro de los ácidos grasos) el ácido salicílico, ácido ascórbico, ácido cinámico, pirocatecol y el nitrógeno ureico también presentan acción inhibitoria contra algunos tipos de bacterias, hongos y virus (Lawrence et al., 2009).

Tabla I.3.- Resumen de los efectos terapéuticos de los principales compuestos del gel de *Aloe vera*.

COMPONENTES	EFECTO TERAPEÚTICO	
Vitaminas	Acción antioxidante (neutralización de radicales libres)	(Hęs et al., 2019)
Antraquinonas	Anti-inflamatoria	(Kshirsagar et al., 2014)
	Antibacteriana	(Xiang et al., 2017)
	Antiviral	(Sydiskis et al., 1991)
Acemanano	Actividad inmunomoduladora	(Liu et al., 2019; Ni et al., 2004)
	Antibacteriana	(Jain et al., 2016)
	Antimicótico	(Boudreau and Beland, 2006; Gelderman et al., 1998)
	Antiviral	(Womble and Helderman, 1988)
	Antitumoral	(Peng et al., 1991)
Manosa-6-fosfato	Efecto cicatrizante	(Hashemi et al., 2015)
	Actividad anti-inflamatoria	(Ni et al., 2004)
Glicoproteínas	Antialérgico	(Ro et al., 2000)
	Anti-inflamatoria	(Hutter et al., 1996)
	Propiedades cicatrizantes	(Choi et al., 2001)
	Proliferación celular	(Boudreau and Beland, 2006)
Enzimas	Efecto anti-inflamatorio (Bradiquinasa) Descomposición de azúcares y grasas	(Ito et al., 1993)
Minerales	Mantenimiento del funcionamiento de los complejos enzimáticos. Efecto anti-oxidante	(Surjushe et al., 2008)
Ácidos grasos	Anti-inflamatorios	(Surjushe et al., 2008)
	Antiséptico	(Surjushe et al., 2008)

8. HIDROXIPROPILMETILCELULOSA

La hidroxipropilmetilcelulosa también conocida como hipromelosa (HPMC), es un polímero semisintético y viscoelástico que se emplea en la fabricación de soluciones humectantes destinadas al alivio de la sequedad ocular. Consiste en un coloide hidrofílico derivado de la celulosa que contiene grupos metilo y una pequeña proporción de grupos hidroxipropilo. Estas características la convierten en una macromolécula hidrofílica muy soluble en agua y con una elevada capacidad de hidratación (Sarkar and Walker, 1995).

Actúa como agente optimizador de la viscosidad siendo uno de los ingredientes más comunes en las soluciones oftálmicas, en soluciones de mantenimiento para lentes de contacto y como viscoelástico en cirugía oftalmológica (Liesegang, 1990). Se encuentra disponible en un amplio rango de concentraciones y puede ser usado solo o en combinación con otros ingredientes (Dogru et al., 2013; Murube et al., 1998; Tong et al., 2012). Su uso está indicado por sus propiedades emolientes, humectantes y por su importante actividad bioadhesiva incrementando el tiempo de retención de la película lagrimal en la superficie ocular y protegiendo a las células epiteliales corneales y conjuntivales frente a la desecación.

Presenta un comportamiento pseudoplástico, es decir, la viscosidad de la solución disminuye al ser sometida a esfuerzos de cizalla como es el caso del parpadeo (Andueza et al., 2000). Para aumentar el tiempo de retención de las soluciones humectantes en la superficie ocular, es necesario que tengan una viscosidad superior a la de la lágrima. Se sabe que este valor es aproximadamente de 2 cP (Gouveia and Tiffany, 2005). Para alcanzarlo se requiere una concentración de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en un intervalo de 2 a 3 g/L.

Existen múltiples estudios que revelan la seguridad y eficacia de soluciones oftálmicas basadas en HPMC para el tratamiento de la sequedad ocular leve - moderada (Pucker et al., 2016). El mecanismo de acción de este agente viscosizante está basado

en fenómenos de adsorción. Este efecto permite un incremento en el tiempo de ruptura lagrimal (TFBUT) de la película lagrimal precorneal. A su vez el aumento en el TFBUT se traduce en una mayor permanencia de la lágrima en la superficie ocular, lo que favorece la reepitelización de los tejidos corneal y conjuntival.

9. ELECTROLITOS ESENCIALES

En los últimos años uno de los principales puntos de interés en el desarrollo de nuevos sustitutos lagrimales ha sido mimetizar las características electrolíticas de la lágrima humana.

La película lagrimal es isotónica en condiciones normales con un valor de tonicidad que se corresponde al de una solución de NaCl al 0.9%. Sin embargo, las proporciones de electrolitos guardan diferencias significativas entre sí. Los principales electrolitos descritos en la fase acuosa de la película lagrimal de sujetos sanos son el Na^+ (120 - 170 mmol/Kg), K^+ (6 - 42 mmol/Kg), Ca^{2+} (0.3 - 2.0 mmol/Kg) y Mg^{2+} (0.3 - 1.1 mmol/Kg) (Gilbard and Rossi, 1994; Stahl et al., 2012; Woodward et al., 2012). Todos ellos desempeñan funciones críticas para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos de la superficie ocular.

Tabla I.4.- Concentración principal de electrolitos en la película lagrimal humana. *Tabla adaptada de* (Stahl et al., 2012)

CONCENTRACIÓN mmol/kg				μmol/kg		mmol/kg		
Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Zn^{2+}	Mn^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	PO_4^{3-}
120 - 170	6 - 42	0.3 - 2.0	0.3 - 1.1	50 - 100	0.2 - 0.9	106 - 135	26	0.07

Cuando aparecen alteraciones en la glándula lagrimal, se produce una variación en la concentración de sales, lo que desemboca en la pérdida del equilibrio u homeostasis del fluido lagrimal.

La mayor parte de los estudios que se realizan para evaluar el daño producido por una patología de la superficie ocular representando condiciones de hiperosmolaridad, se centran en el efecto de soluciones de NaCl prestando menos atención a la influencia del resto de electrolitos presentes en la lágrima. Ha sido demostrado que la inclusión de electrolitos y/o iones en las soluciones oftálmicas es beneficiosa para el tratamiento del daño en la superficie ocular asociado a sequedad. Numerosos estudios destacan su importancia en el mantenimiento de la integridad de los epitelios corneal y conjuntival (Bachman and Wilson, 1985; O'leary et al., 1985; Wilson et al., 1986).

Los cationes Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} juegan un papel significativo en el mantenimiento de las funciones de la córnea. El Na^+ es el ión más numeroso y por tanto el que contribuye en mayor medida a la isotonicidad de la lágrima. Seguido en importancia por el ión K^+ , cuya elevada concentración podría estar relacionada con un efecto protector ante la radiación UVB del epitelio corneal (Schotanus et al., 2011; Ubels et al., 2010). Los menos numerosos son el Ca^{+2} y el Mg^{+2} , pero presentan un papel esencial en la nutrición y crecimiento de los epitelios corneal y conjuntival por su intervención en el mantenimiento de las uniones intracelulares.

Se ha descrito que el Ca^{+2} presente en la película lagrimal interviene en la regulación de la descamación epitelial (Chu and Zhao, 2019). Experimentos realizados evaluando epitelios corneales de conejo mediante microscopía especular, muestran que la tasa de descamación celular se mantiene en valores normales cuando la solución en la que se baña el tejido contiene Ca^{+2} . Sin embargo, la tasa de descamación aumenta cuando se usa una solución basada en NaCl. No está del todo claro el mecanismo de acción del Ca^{+2} en este proceso, pero se cree que puede intervenir en el desacoplamiento de las "*gap junctions*". La teoría más establecida sostiene que la permeabilidad de la membrana celular aumenta en las células más envejecidas. Este fenómeno produce un aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular facilitando el

desacoplamiento de las uniones estrechas (o “*gap junctions*”) entre las células envejecidas y las que todavía mantienen su integridad. Si disminuye la concentración de Ca^{+2} extracelular, este ión no penetra en las células no funcionales y por lo tanto las uniones estrechas que mantienen unidas las células funcionales y las no funcionales, no se deshacen. Como consecuencia, se produce una alteración del equilibrio iónico intracelular en las células sanas, induciendo muerte prematura y el consiguiente daño a nivel epitelial (Chu and Zhao, 2019; Klingler et al., 2000; O’leary et al., 1985).

Entre las funciones del Mg^{+2} se incluyen la estabilización estructural de proteínas, ácidos nucleicos y membranas celulares. Además, un elevado número de enzimas dependientes de Mg^{+2} están involucradas en procesos metabólicos (Gibson and Reif-Lehrer, 1985; Reinhart, 1988). Gong y colaboradores investigaron en modelo animal los cambios en la estructura de la superficie corneal cuando existe déficit de Mg^{+2} . Los resultados de su estudio muestran que a nivel del epitelio corneal se produce una disminución en la densidad de las microvellosidades y en el número de hemidesmosomas, así como la aparición de un mayor número de núcleos apoptóticos en las células (Gong et al., 2003). Estos efectos se traducen en una mayor predisposición a alteraciones en la película lagrimal por la pérdida de su anclaje natural a la superficie ocular, en una disminución de la protección frente a infecciones y en la aparición de zonas de desecación y lesiones epiteliales.

Por su parte, el ión K^{+} está implicado en funciones relacionadas con la resistencia y metabolismo del glicocálix (Reddy et al., 1996). Además se ha descrito que la disminución de sus niveles está relacionada con un aumento del espesor corneal (Green et al., 1992). Su concentración en la película lagrimal es aproximadamente entre 4 y 6 veces mayor que la concentración sanguínea (Botelho and Martinez, 1973; Miller, 1970; Mircheff, 1989; Rismondo et al., 1989). Este dato refuerza la idea de que es uno de los electrolitos más importantes para el mantenimiento del epitelio corneal. Bachman y Wilson describieron en 1985, un mayor desprendimiento de las células epiteliales en las

córneas conservadas en una solución con NaCl que en las que se conservaron en una solución a base de NaCl y KCl. Este estudio relaciona la tasa de desepitelización de la superficie ocular con la inclusión de electrolitos como el ión K^+ en las soluciones de mantenimiento (Bachman and Wilson, 1985). Por lo tanto, su incorporación en soluciones oftálmicas destinadas al alivio de la sequedad e irritación ocular es interesante ya que cualquier disfunción lagrimal que pueda ocasionar una disminución de la concentración de K^+ podría desembocar en una mayor descamación de las células epiteliales corneales, comprometiendo la integridad del tejido (Green et al., 1992).

Además del efecto de la inclusión de estos compuestos en las fórmulas de sustitutos lagrimales, es necesario tener en cuenta que los sistemas empleados para tamponar las soluciones también pueden tener un efecto electrolítico (Klyce, 2004).

10. REGULACIÓN APLICABLE A SUSTITUTOS LAGRIMALES COMO PRODUCTO SANITARIO

Los sustitutos lagrimales están categorizados dentro del ámbito de los productos sanitarios invasivos al considerarse el contacto con la superficie externa del globo ocular, contacto con un orificio corporal (Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de Clasificación, 2017). Por lo que el efecto de cualquier nuevo diseño y su mecanismo de acción deben encontrarse dentro de la definición descrita en la Directiva relativa a los Productos Sanitarios (MDD) 93/42/CEE y en el nuevo Reglamento Europeo (UE) 2017/745 del Parlamento Europeo y del consejo del 5 de Abril de 2017 sobre productos sanitarios que se muestra a continuación (Directiva para Productos sanitarios, 1993; Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios, 2017):

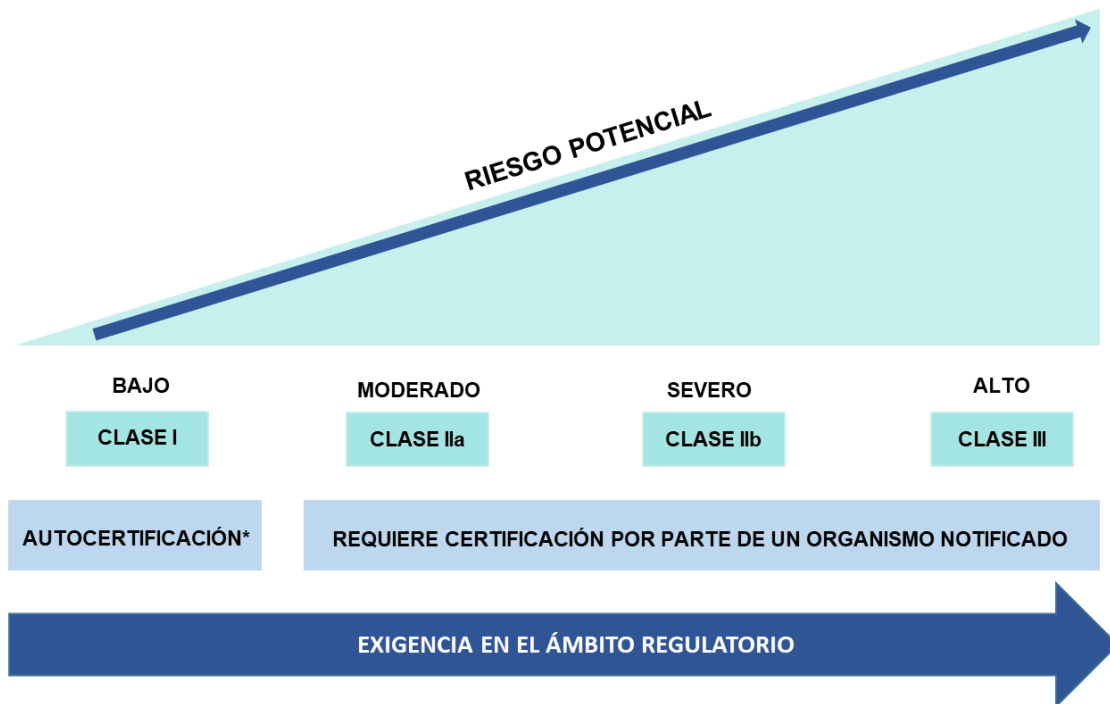
«producto sanitario»: todo instrumento, dispositivo, equipo, programa informático, implante, reactivo, material u otro artículo destinado por el fabricante a ser utilizado en personas, por separado o en combinación con alguno de los siguientes fines médicos específicos:

INTRODUCCIÓN

- *diagnóstico, prevención, seguimiento, predicción, pronóstico, tratamiento o alivio de una enfermedad*
- *diagnóstico, seguimiento, tratamiento, alivio o compensación de una lesión o de una discapacidad*
- *investigación, sustitución o modificación de la anatomía o de un proceso o estado fisiológico o patológico*
- *obtención de información mediante el examen in vitro de muestras procedentes del cuerpo humano, incluyendo donaciones de órganos, sangre y tejidos,*

y que no ejerce su acción principal prevista en el interior o en la superficie del cuerpo humano por mecanismos farmacológicos, inmunológicos ni metabólicos, pero a cuya función puedan contribuir tales mecanismos”.

La clasificación de los productos sanitarios está basada en la invasividad, en los riesgos asociados a su uso previsto y en el tiempo de contacto con el organismo, siendo la clase I la de menor riesgo y la clase III la de mayor riesgo (Criterio clasificación directiva de productos sanitarios, 2010; MEDDEV 2.4/1 rev 9, 2010; Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación, 2017a) **(Figura I.9)**.



* Autocertificación de productos clase I salvo los categorizados como reusables, estériles y de medida que requiere evaluación del organismo notificado.

Figura I.9.- Clasificación de productos sanitarios de acuerdo al Reglamento Europeo (UE) 2017/745 (Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación, 2017a).

La aplicación de las reglas de clasificación se realiza generalmente en función del uso previsto. En el caso de un producto sanitario que pueda clasificarse siguiendo varias reglas, se aplica la más restrictiva de todas ellas. Algunos productos sanitarios, como es el caso de los sustitutos lagrimales, pueden presentar varias aplicaciones al mismo tiempo y esto a su vez abrir la posibilidad de dar clasificaciones distintas. Siguiendo en la misma línea restrictiva, el producto se clasificará de acuerdo a la aplicación que suponga un mayor riesgo.

El uso previsto principal en este tipo de productos consiste en el alivio de la irritación y/o de la sintomatología de sequedad ocular a través de la humectación y lubricación de la superficie ocular, por lo que generalmente se clasifican dentro de la clase IIa según la Regla 5 del Reglamento Europeo 2017/745 que recoge lo siguiente (Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación, 2017b):

“Todos los productos invasivos en relación con los orificios corporales, salvo los productos invasivos de tipo quirúrgico, que no estén destinados a ser conectados a un producto activo o que estén destinados a ser conectados a un producto activo de la clase I se clasifican:

- *en la clase I si se destinan a un uso pasajero;*
- *en la clase IIa si se destinan a un uso a corto plazo, salvo si se utilizan en la cavidad oral hasta la faringe y en el conducto auditivo externo hasta el tímpano o en la cavidad nasal en cuyo caso se clasifican en la clase I, y*
- *en la clase IIb si se destinan a un uso prolongado, salvo si se utilizan en la cavidad oral hasta la faringe, en el conducto auditivo externo hasta el tímpano o en la cavidad nasal y no pueden ser absorbidos por la membrana mucosa, en cuyo caso se clasifican en la clase IIa.”*

Sin embargo, existe cierta controversia en la clasificación cuando intervienen otras variables como el tiempo de duración de la exposición al producto (uso pasajero / uso a corto plazo / uso prolongado) (Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación, 2017c).

- *Uso pasajero: productos destinados a utilizarse de forma continua durante menos de 60 minutos.*
- *Uso a corto plazo: productos destinados a utilizarse de forma continua durante un período de entre 60 minutos hasta 30 días.*
- *Uso prolongado: productos destinados a utilizarse de forma continua durante un período de más de 30 días.*

En función del criterio del experto del organismo notificado que revise la documentación técnica del producto, puede haber variabilidad en la clasificación, al considerar que cuando los usuarios hacen un uso continuado, el tiempo de permanencia en la superficie ocular se acumula y es mayor a 30 días. A mayor tiempo de contacto del producto sanitario con el tejido ocular, la exigencia a nivel regulatorio es mayor. (Figura I.10).

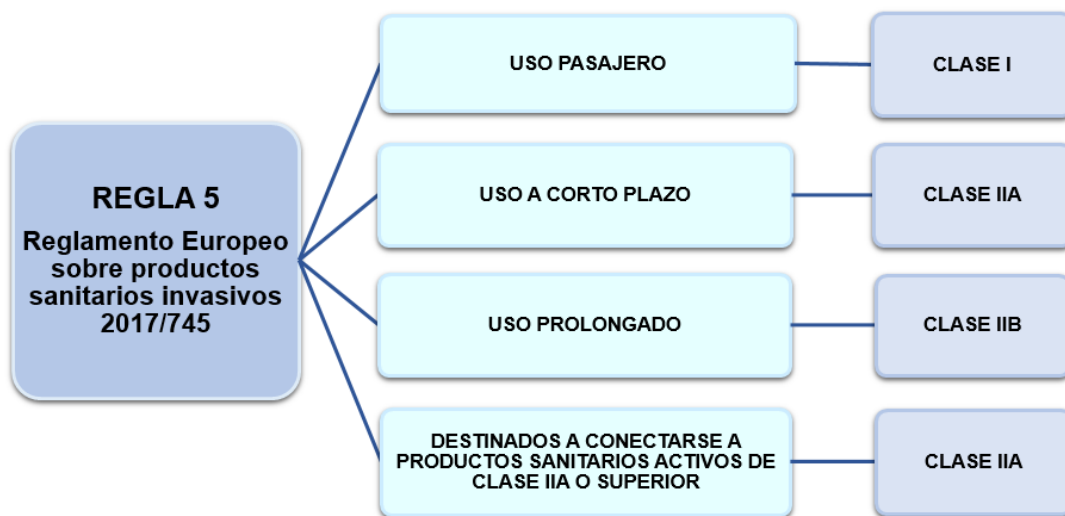


Figura I.10.- Regla 5 de clasificación de productos sanitarios invasivos de acuerdo al Reglamento Europeo 2017/745 sobre productos sanitarios (Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación, 2017b).

Además del alivio de la irritación y de la sintomatología de sequedad ocular, otra de las aplicaciones más frecuentes de los sustitutos lagrimales es la humectación y lubricación de las lentes de contacto, con el objetivo de aliviar el discomfort asociado a su porte. En este caso, estos productos no se clasifican de acuerdo a la Regla 5. El hecho de que sean utilizados con este fin, aunque la fórmula y los componentes de la solución sean exactamente iguales, hace que se clasifiquen siguiendo la Regla 16 del

Reglamento Europeo que se describe a continuación (Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación, 2017d):

“Todos los productos destinados específicamente a usos de desinfección, limpieza, enjuague o, en su caso, a la hidratación de lentes de contacto, se clasifican en la clase IIb.”

Como producto sanitario, los sustitutos lagrimales deben cumplir una serie de requerimientos para su puesta en el mercado. En este sentido, la clasificación previa del producto durante la fase de desarrollo por el propio fabricante es uno de los elementos clave a la hora de plantear los estudios clínicos necesarios para la obtención del mercado CE.

Dentro de los estudios a plantear para el diseño y desarrollo de un sustituto lagrimal está la determinación de las concentraciones efectivas de los ingredientes de la fórmula. El siguiente paso a seguir consiste en comprobar si el efecto que produce es similar al de sustitutos lagrimales ya comercializados y con eficacia demostrada. Una vez valorados estos efectos, el paso final y uno de los más importantes para la aprobación del producto es la comprobación de la seguridad y la eficacia en los usuarios a los que está destinado.

El fabricante presentará la documentación técnica del producto (formada por información fuera del ámbito clínico y por los estudios de seguridad y eficacia) al organismo notificado correspondiente para la obtención del mercado CE. Una vez obtenido el mercado CE el producto podrá comercializarse con el uso previsto registrado. Sin embargo, cualquier modificación que el fabricante quiera realizar en el futuro sobre el uso previsto o la inclusión de nuevas aplicaciones del producto, requiere la realización de investigaciones clínicas que lo justifiquen y su aprobación de nuevo por parte del organismo notificado.

El proceso a seguir en las investigaciones clínicas con productos sanitarios está indicado en la norma UNE - EN ISO Investigación clínica de productos sanitarios para humanos – Buenas Prácticas Clínicas (UNE-EN ISO 14155, 2011) y depende principalmente de si el producto ostenta o no el marcado CE. En caso de que ya ostente el marcado CE dependerá de si es posible demostrar la nueva aplicación siguiendo la indicación de uso ya señalada en el correspondiente certificado.

De esta forma, la evaluación de la seguridad y eficacia siempre se englobará dentro de los estudios pre-comercialización del producto y los destinados a la búsqueda de nuevas aplicaciones, aunque son denominados como estudios post-comercialización, deberán seguir el mismo proceso que los estudios pre-comercialización en el caso de que se utilice el producto en una indicación diferente a la señalada en el marcado CE. Es decir, la obtención del dictamen favorable del comité de ética de investigaciones clínicas (CEIC) y la aprobación del estudio por parte de las autoridades sanitarias correspondientes (en el caso de investigaciones clínicas realizadas en España, autorización de la AEMPS o Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). Por otro lado, los estudios en los que la demostración de nuevas aplicaciones del producto sea posible siguiendo el uso previsto ya registrado, necesitarán el dictamen favorable del CEIC, pero únicamente será requerida una notificación de la puesta en marcha del estudio a las autoridades sanitarias (AEMPS) **(Figura I.11).**

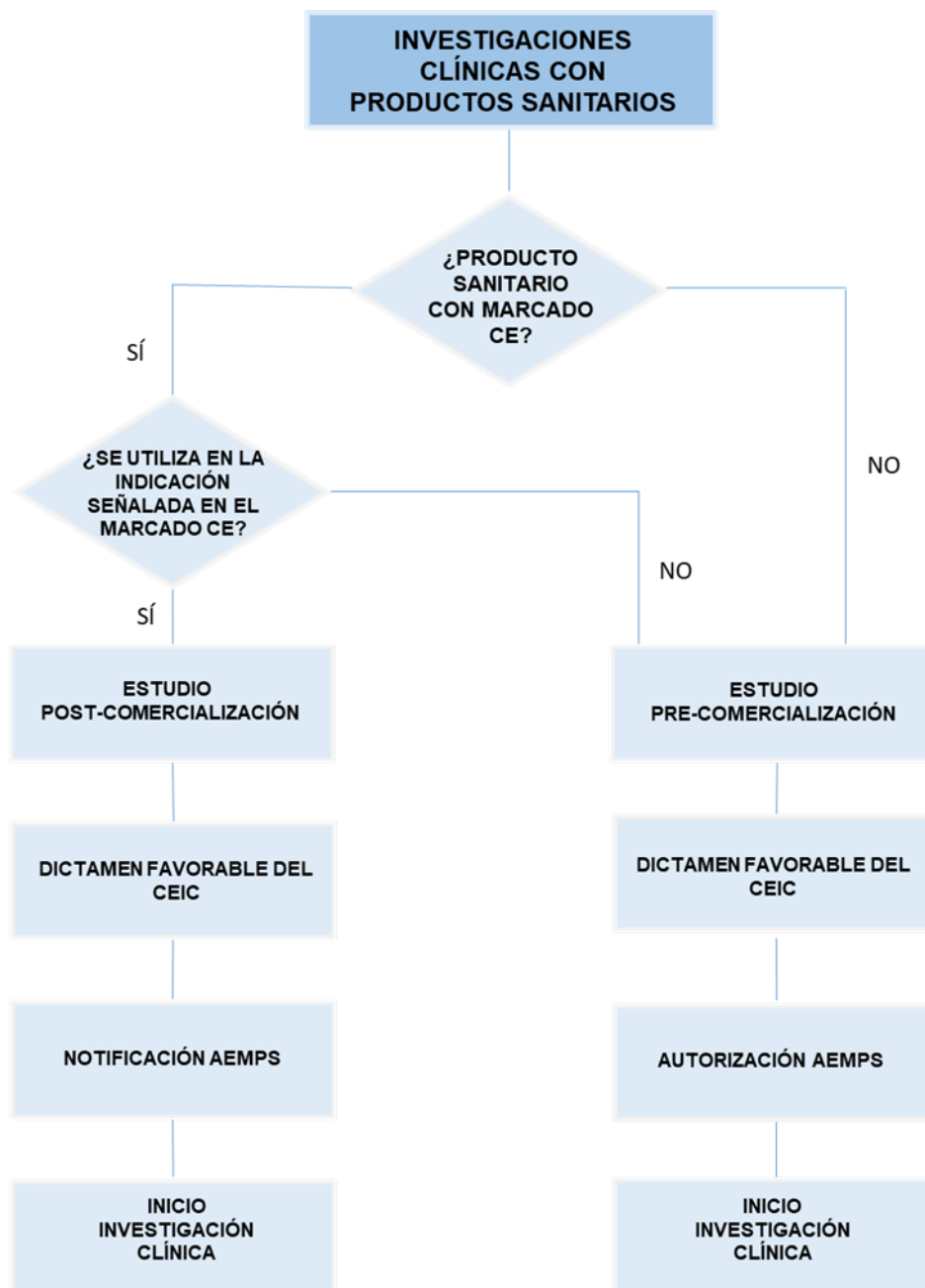


Figura I.11.- Investigaciones clínicas pre- y post-comercialización para productos sanitarios; UNE – EN ISO 14155:2011 Investigaciones clínicas de productos sanitarios para humanos – Buenas prácticas clínicas (UNE-EN ISO 14155, 2011).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de ojo seco está causada por una ausencia crónica de lubricación y humectación sobre la superficie ocular. Se trata de una patología de carácter multifactorial caracterizada por la pérdida de homeostasis de la película lagrimal y en cuya etiología intervienen la inestabilidad e hiperosmolaridad de la película lagrimal (Bron et al., 2017; Craig et al., 2017b).

Las consecuencias de la enfermedad de ojo seco abarcan desde sintomatología de irritación ocular leve pero de carácter persistente a una inflamación significativa y/o incluso a la aparición de lesiones en la superficie ocular de carácter irreversible.

Los datos de prevalencia global de la patología de ojo seco oscilan entre valores del 5 y el 50% (Stapleton et al., 2017), probablemente debido a la escasa correlación entre los signos y síntomas clínicos y a la falta de consenso en los criterios diagnósticos utilizados en los estudios epidemiológicos (Sullivan et al., 2014). La prevalencia basada en los signos es mayor y presenta más variabilidad que la basada en los síntomas (Craig et al., 2017a). Afecta con mayor frecuencia al género femenino que al masculino, sin embargo, se ha descrito que las diferencias se vuelven significativas sólo con la edad (Stapleton et al., 2017; Sullivan et al., 2017). Estos datos han sido confirmados en estudios de prevalencia en España en población adulta por encima de los 40 años, donde se encontró un 12% de prevalencia en mujeres frente a un 9% en hombres y se ha asociado también con la edad (Viso et al., 2009). Factores como el envejecimiento progresivo de la población anticipan un aumento considerable de la prevalencia de esta patología en los próximos años.

Además de la problemática clínica y social, la carga económica y el impacto de la enfermedad de ojo seco en la visión, a nivel psicológico, en la calidad de vida (Grubbs et al., 2014; Miljanović et al., 2007; Uchino and Schaumberg, 2013) y en la productividad

laboral son considerables, principalmente los gastos asistenciales y los ligados a la disminución en la productividad laboral (Pflugfelder, 2008; Stapleton et al., 2017; Uchino et al., 2014; Yamada et al., 2012). Estudios recientes muestran que es uno de los principales motivos de consulta en atención primaria y en las consultas de profesionales de la visión (Bradley et al., 2019; Stapleton et al., 2015). Sin embargo, se cree que la prevalencia e incidencia de esta patología pueden ser superiores a lo estimado en investigaciones epidemiológicas y que un porcentaje considerable de pacientes podrían ser asintomáticos (Stapleton et al., 2017).

La evaluación del impacto económico en España de los costes de la atención médica asociados a la enfermedad de ojo seco ha reflejado un aumento de 4.9 a 30.3 millones de euros desde el año 1997 hasta el año 2015. Se estima que el coste medio anual por paciente se encuentra en torno a 7.400 euros (Darbà and Ascanio, 2020). Lo que pone de manifiesto la relevancia de la enfermedad de ojo seco como un problema creciente de salud pública.

En el ámbito laboral, es probable que la incidencia de la enfermedad aumente debido a la influencia de factores asociados a los lugares de trabajo actuales, ambientes cerrados con sistemas de climatización no controlados o riesgos ergonómicos asociados al uso de pantallas y dispositivos electrónicos (Nakamura et al., 2010).

Los factores de riesgo de la enfermedad de ojo seco pueden clasificarse en modificables y no modificables. Entre los factores no modificables están principalmente la edad, el sexo femenino, la disfunción de las glándulas de Meibomio y enfermedades autoinmunes como el síndrome de Sjögren (Moss et al., 2000; De Paiva, 2017; Schaumberg et al., 2013). Dentro de los factores modificables está el uso de lentes de contacto, el uso de dispositivos electrónicos, factores ambientales como contaminación o sequedad del entorno y el uso de determinados fármacos tópicos y sistémicos (Fraunfelder et al., 2012; Kojima, 2018; Markoulli and Kolanu, 2017).

Los sustitutos lagrimales se consideran el tratamiento base para esta patología (Jones et al., 2017; No author, 2016). Entre sus funciones está humectar y lubricar los epitelios corneal y conjuntival protegiéndolos frente a los fenómenos de desecación y reducir el coeficiente de fricción contra la superficie ocular con el objetivo de aliviar la sintomatología de los pacientes. Además de para humectar la superficie ocular, la mayoría de los sustitutos lagrimales están especialmente indicados para humectar la superficie de las lentes de contacto (Pucker, 2020). Su uso está establecido tanto para facilitar la inserción como para evitar su deshidratación una vez se ha colocado la lente de contacto en la superficie ocular. Toda lente de contacto, incluso cuando se hace una correcta adaptación y mantenimiento, constituye una alteración en la homeostasis fisiológica de la superficie ocular por lo que pueden aparecer zonas con una humectación deficiente que dan lugar a problemas de tolerancia (Mann and Tighe, 2013). En estos casos el uso de soluciones humectantes aumenta considerablemente el confort tanto en sujetos sanos como en usuarios con sintomatología de sequedad ocular (Pucker et al., 2016).

En este sentido, la búsqueda de nuevas soluciones terapéuticas exige el diseño de productos que mimeticen al máximo las características físico-químicas de la película lagrimal. Al mismo tiempo, la incorporación de nuevos ingredientes en este tipo de soluciones requiere la monitorización de los efectos producidos a nivel celular y la valoración de la seguridad y eficacia en los usuarios finales.

Por otro lado, la actualización constante de la documentación técnica de los productos sanitarios abre la posibilidad de la búsqueda por parte de los fabricantes de nuevas aplicaciones, además de las ya registradas para el producto. En este sentido, como se ha dicho con anterioridad, los sustitutos lagrimales son buenos candidatos para ser destinados además de al alivio de la irritación y de la sintomatología de sequedad ocular, a la humectación y lubricación de lentes de contacto y como terapia coadyuvante en trastornos inflamatorios de la superficie ocular. Sin embargo, la inclusión de nuevas

aplicaciones en las instrucciones de uso del producto exige la realización de investigaciones clínicas que las respalden.

2. HIPÓTESIS

Numerosos estudios han mostrado las propiedades cicatrizantes y humectantes del ingrediente *Aloe vera*, así como su posible uso para el tratamiento de algunas alteraciones de la superficie ocular. Investigaciones previas realizadas en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular IV de esta facultad han demostrado el efecto protector sobre cultivos celulares de soluciones destinadas al mantenimiento de lentes de contacto incluyendo este ingrediente (Pintor et al., 2014). De forma paralela, estudios de otros grupos de investigación han evaluado la seguridad y eficacia de esta solución de mantenimiento en los usuarios finales con resultados satisfactorios (Pinto-Fraga et al., 2015).

Por lo tanto, la hipótesis principal del presente trabajo es que la inclusión del ingrediente *Aloe vera* en la fórmula de un sustituto lagrimal podría tener un efecto protector frente a la irritación a nivel celular y sobre la sintomatología de irritación ocular asociada a la enfermedad de ojo seco.

3. OBJETIVOS

Todos los antecedentes descritos nos llevaron a plantearnos como objetivo general de esta tesis doctoral evaluar el efecto protector de un sustituto lagrimal que incluye los ingredientes *Aloe vera* e HPMC en su composición. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar *in vitro* el efecto de la inclusión de diferentes concentraciones de *Aloe vera* en una fórmula base con HPMC sobre la viabilidad de células epiteliales corneales.

2. Hacer un análisis comparativo del efecto sobre la viabilidad de células epiteliales corneales de la solución experimental con *Aloe vera* e HPMC frente al de diferentes sustitutos lagrimales ya comercializados.

3. Evaluar la seguridad y eficacia de la solución experimental con *Aloe vera* e HPMC sobre pacientes con sintomatología de sequedad e irritación ocular.

4. Analizar *in vivo* la capacidad humectante, el confort y las variaciones en la agudeza visual tras la instilación de la solución experimental sobre diferentes tipos de lentes de contacto hidrofílicas.

5. Estudiar el efecto de la solución basada en *Aloe vera* e HPMC sobre la concentración de moléculas pro-inflamatorias en la película lagrimal de pacientes con sintomatología de sequedad e irritación ocular.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

1.1.1 REACTIVOS Y PRODUCTOS QUÍMICOS

Todos los reactivos y productos químicos empleados en el desarrollo experimental de los ensayos *in vitro* se encuentran detallados en la siguiente tabla.

Tabla III.1.- Principales reactivos, medios de cultivo y compuestos químicos utilizados en los ensayos *in vitro*.

REACTIVOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS	PROVEEDOR	USO
MEM con sales Earle's sin rojo fenol	Gibco	Cultivo celular
Bicarbonato sódico líquido		
Piruvato sódico 100 mM		
Tripsina – EDTA 0.05%		
FBS		
Penicilina - Estreptomicina	Merck	Viabilidad celular y citotoxicidad
Alcohol Isopropílico		
DMSO	Sigma - Aldrich	
MTT - formazán		

1.1.2 INSTRUMENTACIÓN GENERAL

Tabla III.2.- Equipos, instrumentos y material fungible empleado en el laboratorio.

EQUIPOS E INSTRUMENTOS	FABRICANTE	USO
Incubador para cultivos celulares HeraCell	Heraeus	Cultivo celular
Agitador-incubador	New Brunswick Scientific	
Campana de Flujo laminar Hera Safe	Heraeus	
Cámara de Neubauer	Brand GMHB	
Pipetas estériles (3, 5, 10 y 25 ml)	Cultek	
Botellas de cultivo (25, 75 cm ²)		
Placas multipocillo (6, 12, 24, 48 y 96)		
Contenedor para congelación de células Mr. Frosty™	Nalgene	
Microscopio confocal Zeiss Axiovert software LSM 5 Pascal	Carl Zeiss	Microscopía
Módulo Confocal Pascal		

Balanza electrónica Mettler PJ 360	Mettler	Varios
Balanza de precisión Mettler A5100		
Centrífuga de sobremesa Picofuge®	Heraeus	
Centrífuga Labofuge 400		
Centrífuga refrigerada Kubota 6500	Kubota	
Estufa	Memmert, Grupo Taper	
Baño de ultrasonidos	Selecta	
Baño termostatzado	Labnet Internacional	
Lector de placas Power Wave XS2	BioTek	
PH-metro GLP-21	Crison	
Viscosímetro Brookfield DV2TLVTJ0	Brookfield	
Osmómetro de congelación Osmomat 030	Gonotec	
Micropipetas	Eppendorf	
Vortex	Heidolph	

1.2 ESTUDIOS *IN VIVO*

1.2.1 MATERIALES DEL ESTUDIO CLÍNICO

La siguiente tabla recoge los materiales y soluciones empleadas durante la fase clínica experimental.

Tabla III.3.- Materiales empleados para la investigación clínica y para el análisis de las muestras obtenidas durante la fase *in vivo*.

MATERIALES	PROVEEDOR	USO
Suero fisiológico	NaCl 0.9% B. Braun	Irrigación
Clorito sódico	Quality chemicals	Inducción irritación
Test de Schirmer	TearFlo™ Sterile Strips HUB Pharmaceuticals	Volumen lagrimal Recogida de lágrima para análisis de marcadores inflamatorios
Fluoresceína sódica 2%	Fluoresceinnatrium Chauvin eye drops	Evaluación del tiempo de ruptura lagrimal y tinciones corneales
Filtro Amarillo Wratten #12	Eastman Kodak, Rochester NY, EEUU	
Verde de Lisamina	GreenGlo™ Ophthalmic Strips HUB Pharmaceuticals	Tinciones conjuntivales
Escala Efron	Efron Grading Scale for Contact Lens Complications	Clasificación grado tinciones corneales y conjuntivales
Cuestionario Mcmonnies	The Vision Care institute Johnson& Johnson	Sintomatología
Cuestionario DEQ	Dry Eye Questionnaire	
Cuestionario VAS	Visual Analogue Scale	Satisfacción

Test ETDRS	Optotipo de Escala logarítmica ETDRS Promoción Optométrica	Agudeza Visual
CSV-1000	VectorVision, Greenville, OH, EEUU	Sensibilidad al contraste
Eyeprim™	OPIA Technologies SAS, Paris, Francia	Citología de impresión conjuntival
Portas y cubreobjetos	Thermo Scientific	

Tabla III.4.- Reactivos y materiales empleados para la valoración de las citologías de impresión.

REACTIVOS Y MATERIALES	PROVEEDOR	USO
Ácido periódico 1%	Merck	Tinción PAS- Hematoxilina
Reactivo de Schiff	Merck	
Hematoxilina (en solución modificada según Gill II)	Merck	
Etanol 70%	Panreac AppliChem	
Etanol 96%	Panreac AppliChem	
Etanol 100%	Panreac AppliChem	
Xilol	Merck	
Agua destilada	---	---
Medio de montaje Entellan®	Merck	Montaje citología

1.2.2 EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN GENERAL

Tabla III.5.- Equipos empleados durante la fase clínica y en el procesamiento de las muestras obtenidas.

EQUIPOS	NOMBRE COMERCIAL FABRICANTE	USO
Lámpara de hendidura	SL-D4, Topcon	Integridad superficie ocular
Tonómetro	NT-1000 non-contact tonometer, Nidek Co.	Presión Intraocular
Retinógrafo	TRC.NW8 Non-mydratiac retinal camera, Topcon	Fondo de ojo
Topógrafo corneal	Medmont E300	Humectación <i>in vivo</i>
Pantalla con polarización lineal	VX22 PL, Luneau Technology	Medida agudeza visual de alto y bajo contraste
Lector de placas Power Wave XS2	BioTek	Ensayo ELISA

Tabla III.6.- Kits comerciales de ensayo ELISA utilizados durante la fase clínica.

KITS COMERCIALES	FABRICANTE	USO
Human MMP-9 quantikine ELISA kit	R&D Systems, Vitro S.A	Cuantificación concentración MMP-9
Human IL-1 β quantikine ELISA kit		Cuantificación concentración IL-1 β
Human IL-6 quantikine ELISA kit		Cuantificación concentración IL-6

1.2.3 PROGRAMAS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

Tabla III.7.- Programas y herramientas informáticas.

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	USO
Pubmed (<i>National Institutes of Health</i>)	Motor de búsqueda para bases de datos bibliográficas
Software LSM 5 Pascal (Zeiss)	Varios
Software Gen 5 (BioTek)	Análisis de datos lector placas
GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software)	Análisis estadístico

2. MÉTODOS

2.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

2.1.1 MODELO CELULAR

Los experimentos de citotoxicidad con el método MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio bromuro) fueron realizados en una línea celular inmortal de epitelio corneal de conejo establecida, SIRC (*Statens Seruminstitut Rabbit Cornea*) Cat N°= CCL-60 lot n° 30/974187 Freeze n°1974187. Para el mantenimiento del cultivo celular se empleó medio MEM (*Minimum Essential Medium*) con sales Earle's y aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, bicarbonato sódico suplementado con suero fetal bovino (FBS) activado al 10% pH 7.3. Se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada y con un 5% de CO₂. El cambio de medio se realizó cada dos días y se establecieron pases cada 7 días.

El procedimiento de descongelación de las células SIRC se realizó con 10 ml de medio de cultivo MEM previamente atemperado a 37°C. Se sacó un vial de células SIRC

a -80°C y se procedió a su descongelación con ayuda de unos 500 μl del MEM atemperado. Una vez descongelado se trasvasó el contenido a un tubo falcon de 15 ml. Se procedió a centrifugarlo durante 10 minutos a 800 rpm y a temperatura ambiente. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante con rapidez para reducir al mínimo su contacto con las células, ya que contiene DMSO y este compuesto cuando se encuentra a temperatura ambiente es citotóxico. El pellet resultante fue resuspendido en medio de cultivo y llevado a una botella de 75 cm^2 .

2.1.2 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR POR REDUCCIÓN DEL COMPUESTO MTT

Las soluciones de sales de tetrazolio se caracterizan por ser incoloras o débilmente coloreadas. Sin embargo, cuando se forma como subproducto de la reducción enzimática, el formazán, la solución cambia a un color fuerte. Su uso se ha establecido para diversas aplicaciones en los campos de la histoquímica, biología celular, bioquímica y biotecnología. Entre las más utilizadas para la aplicación en cultivos celulares se encuentra el MTT.

Este método, basado en la reducción metabólica del compuesto MTT es uno de los más utilizados para la medida de la viabilidad celular. Consiste en un ensayo colorimétrico en el que se cuantifica indirectamente la viabilidad celular a través de la medida de la actividad metabólica de las células presentes en un cultivo. Desarrollado por Mosmann, quien demostró en 1983 que la conversión del MTT en formazán era proporcional al número de células metabólicamente viables (Mosmann, 1983), fue mejorado por varios investigadores en años sucesivos (Gerlier and Thomasset, 1986; Hansen et al., 1989; Tada et al., 1986).

El MTT presenta grupos laterales lipofílicos y una carga neta positiva por lo que puede atravesar la membrana celular. Este compuesto es una sal de tetrazolio que en disolución es amarilla, pero al reducirse, cuando entra en contacto con enzimas mitocondriales o plasmáticas como oxidorreductasas, deshidrogenasas, oxidasas y

peroxidasas dependientes de NADPH se convierte en un compuesto de la familia de los formazanos (Berridge and Tan, 1993), de color púrpura oscuro (azul-magenta) insoluble en agua, pero que puede analizarse colorimétricamente después de disolverse en solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (DMSO). La solución resultante puede ser cuantificada midiendo la absorbancia en un rango de longitudes de onda de entre 500 y 600 nm. Este efecto permite determinar la función de las células tratadas, siendo el número de células vivas proporcional a la cantidad de cristales de formazán producidos (Vistica et al., 1991).

Actualmente se sabe que su reducción no está asociada exclusivamente con la actividad de la mitocondria sino que también intervienen en gran medida estructuras no mitocondriales como el compartimiento endosoma / lisosoma y la membrana citoplasmática (Berridge et al., 2005; Stepanenko and Dmitrenko, 2015).

Como el proceso de formación de los cristales de formazán insolubles tiene lugar dentro de la célula, se ve afectada su integridad. Por esta razón dentro de los protocolos de los ensayos MTT se suele incluir un paso de lisis celular y un paso de disolución de los cristales de formazán antes de la medida por espectrofotometría.

2.1.2.1 EVALUACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON *ALOE VERA* E HIDROXIPROPILMETILCELULOSA SOBRE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL DE CONEJO MEDIANTE MTT

Para la evaluación del posible papel protector de la solución humectante basada en *Aloe vera* e HPMC se realizó un estudio de citotoxicidad basado en el método MTT.

Se establecieron diferentes tratamientos con concentraciones crecientes de *Aloe vera* (0.5, 1, 2, 3 y 5%) para determinar la cantidad con la que se producía un mayor efecto protector en las células de epitelio corneal de conejo immortalizadas (SIRC). Como control se utilizó suero fisiológico al 0.9% y lágrima artificial con un 0.2% de HPMC sin *Aloe vera*. Todos los productos se caracterizaron por ser fórmulas libres de conservantes.

Para este propósito, se utilizaron 2 placas multiwell de 24 pocillos donde se añadieron 1.5×10^4 células de epitelio corneal de conejo inmortalizadas (SIRC) y 100 μL de medio de cultivo MEM (sin rojo fenol) en cada uno de los pocillos. Después se realizó una incubación durante 24 horas a 37°C en atmósfera humidificada y con CO_2 al 5%. Una vez que las células fueron llevadas a la confluencia cada una de las placas se destinó a un tiempo de exposición de 10 y 60 minutos respectivamente al agente irritante DMSO (1%).

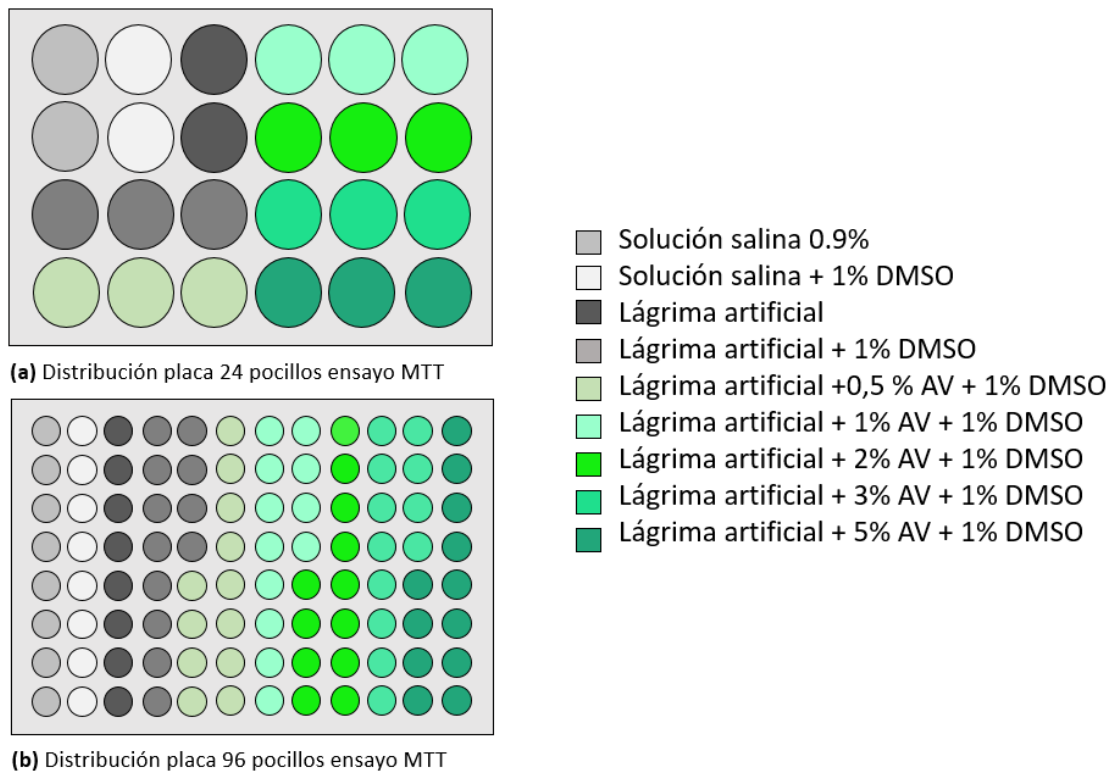


Figura III.1.- Esquema de distribución del ensayo MTT. (a) Distribución en la placa de 24 pocillos; (b) distribución de la placa de 96 pocillos.

En cada placa multiwell de 24 pocillos (**Figura III.1.a**) se utilizaron 2 o 3 pocillos respectivamente para cada una de las soluciones controles y de estudio. Con el objetivo de producir la solución MTT se disolvieron 5 mg de MTT (MTT Formazán, Sigma-Aldrich®) en medio de cultivo MEM sin FBS y sin rojo fenol (0.5 mg/ml). Una vez transcurrido el tiempo de exposición al agente irritante establecido para cada uno de los

ensayos se retiró cuidadosamente el medio de cultivo y se añadieron 300 µl de la solución MTT en cada uno de los pocillos.

Para permitir la formación de los cristales de formazán el tiempo de incubación total de las células SIRC con la solución de MTT fue de 1 hora a 37°C con un 5% de CO₂. Una vez pasado este tiempo, se eliminó el sobrenadante de la solución y se comprobó la formación de los cristales. Para disolver los cristales de formazán se agregaron 500 µl de DMSO (Sigma-Aldrich®; 99.9% riqueza) a los pocillos manteniéndolos en agitación lenta durante 15 minutos a temperatura ambiente con el objetivo de homogeneizar la placa.

Una vez transcurrido este proceso se transvasaron 250 µl de la solución resultante a dos placas de 96 pocillos según el esquema mostrado en la **figura III.1.b**.

La integridad de las células se valoró a través de la medida de la absorbancia por lectura espectrofotométrica, realizando dos medidas en el lector de placas, una a una longitud de onda de 570 nm que nos da la información de la cantidad de formazán y otra a 690 nm que es la que se corresponde con el background del MTT que no ha formado cristales.

Para el cálculo de la viabilidad celular con las diferentes soluciones, se valoró el porcentaje con respecto a la viabilidad celular obtenida con el control de la solución humectante sin *Aloe vera* con MEM. Por lo tanto, los resultados de la lágrima con las diferentes concentraciones de *Aloe vera* serán referenciados con respecto a este valor.

Los resultados se presentan como medida de porcentaje con desviación estándar y se determinaron a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{(\text{Densidad óptica promedio del problema} \times 100)}{(\text{Densidad óptica promedio del control})}$$

2.1.2.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON *ALOE VERA* E HIDROXIPROPILMETILCELULOSA VERSUS DIFERENTES SUSTITUTOS LAGRIMALES DISPONIBLES EN EL MERCADO

Con el objetivo de comparar el papel protector de la solución humectante de *Aloe vera* e HPMC con otras formulaciones presentes en el mercado, se evaluó de nuevo la viabilidad celular con el método MTT.

Para ello, se seleccionaron las siguientes fórmulas comerciales teniendo en cuenta diferentes composiciones y rangos de viscosidad. Todas ellas fueron incluidas en su versión sin conservantes.

Tabla III.8.- Composición de los sustitutos lagrimales comercializados utilizados en el estudio comparativo de citotoxicidad.

PRODUCTO	COMPOSICIÓN
Acuolens® (Alcon)	HPMC 0.3%
Artific® (Angelini)	HPMC 0.32%
Viscofresh® (Allergan)	CMC 0.5%
Optava Fusion® (Allergan)	HA 0.1% + CMC 0.5%
Opticalm Plus® (Omega Pharma)	HA 0.2% + HPMC 0.2%
Hyabak® (Thea)	HA 0.15%
Lubristil® (Angelini)	HA 0.2%
Visaid 0.2%® (Avizor)	HA 0.2% + GLICERINA 0.5% + PVP 0.25%
Visaid 0.3%® (Avizor)	HA 0.3% + GLICERINA 0.25% + PVP 0.4%
Aquoral® (Esteve)	HA 0.4%
Systane® (Alcon)	HA + HP - GUAR + PEG 400 0.4% + PPG 0.3%
Systane Ultra® (Alcon)	HP - GUAR + PEG 400 0.4% + PPG 0.3%

Como control, se utilizaron las células SIRC en medio MEM sin irritar y las células en medio MEM incluyendo el agente irritante DMSO a una concentración del 1% siguiendo el mismo procedimiento experimental empleado para la determinación de la concentración efectiva de *Aloe vera* y descrito en el apartado **2.1.2.1**.

En este caso, se empleó como solución de estudio la fórmula con el porcentaje de *Aloe vera* que mostró mejores resultados de protección frente a la irritación en el ensayo de viabilidad celular inicial.

2.2 ESTUDIOS *IN VIVO*

La siguiente tabla recoge un resumen de las características demográficas de los pacientes incluidos en los estudios realizados en la fase *in vivo*.

Tabla III.9.- Resumen de las características demográficas de los pacientes incluidos en los estudios de la fase *in vivo*.

GRUPO MUESTRAL	N	MUJERES	HOMBRES	EDAD (MEDIA ± SD)	EDAD (RANGO)
Evaluación de la seguridad y eficacia	36	21	15	32,5 ± 8,1 años	18 - 35 años
Evaluación de la humectabilidad sobre la superficie de lentes de contacto hidrofílicas	15	9	6	25,3 ± 3,0 años	18 - 35 años
Evaluación de la concentración de moléculas pro-inflamatorias	20	12	8	51,9 ± 8,4 años	38 – 66 años

2.2.1 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA

2.2.1.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Con el objetivo de valorar la seguridad y eficacia de la solución en fase de investigación, se realizó un estudio clínico experimental, unicéntrico, prospectivo, aleatorizado, cruzado y doble enmascarado. Para ello se evaluó su comportamiento *in vivo* frente al de una solución control (NaCl 0.9%).

El orden de uso de las soluciones para cada uno de los pacientes se seleccionó de forma aleatoria. Dicha aleatorización fue realizada utilizando el programa EXCEL mediante la función ALEATORIO. ENTRE (I,II), siendo el valor “I” el asignado para el producto en fase de investigación y el valor “II” el asignado para la solución control. Ni el sujeto ni el investigador tuvieron conocimiento del tipo de solución (experimental o control) que el sujeto estaba utilizando en cada momento del estudio.

Para el análisis de los resultados se escogió solamente un ojo por paciente (aunque fueron evaluados los dos ojos), seleccionado de forma aleatoria. Del mismo modo que para la aleatorización de las soluciones, se empleó la función ALEATORIO.ENTRE (D,I) para la aleatorización de la selección del ojo incluido en el tratamiento de los datos, siendo el valor “D” el ojo derecho y el valor “I” el ojo izquierdo.

Este estudio recibió la aprobación del Comité de ética de investigaciones clínicas del Hospital Clínico San Carlos de Madrid antes de su comienzo y su realización fue autorizada por la AEMPS. Debido a la recogida de muestras biológicas, se aseguró el cumplimiento de la ley 14/2007 de Investigación Biomédica (Agencia estatal BOE 159, 2007). Todas ellas fueron utilizadas con fines científicos y una vez finalizada la investigación fueron destruidas de acuerdo a las pautas legales.

La presente investigación clínica fue realizada de acuerdo a los requerimientos de la norma UNE - EN ISO 14155: 2011 Investigación clínica de productos sanitarios para humanos – Buenas prácticas clínicas (UNE-EN ISO 14155, 2011) y según los principios éticos para la investigación biomédica sobre sujetos humanos de la Declaración de Helsinki (Tognoni, 2009).

Todos los pacientes del estudio fueron reclutados en la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid. Previo al comienzo del estudio se obtuvo el consentimiento informado por escrito después de la explicación de la naturaleza y de los riesgos y beneficios potenciales derivados del mismo. También se advirtió a los pacientes de la posibilidad de interrumpir el estudio en cualquier momento y sin necesidad de justificación.

2.2.1.2 SELECCIÓN DE LOS SUJETOS

El cálculo del tamaño muestral necesario se realizó con el software Granmo 6.0. asumiendo un 20% de pérdidas y considerando como variable principal la sintomatología de irritación ocular. Se estimó necesario el reclutamiento de 36 pacientes.

Los criterios de inclusión que se establecieron para el reclutamiento fueron los siguientes:

- Firma del consentimiento informado previa a la realización de cualquier prueba del estudio.
- Firma del formulario de protección de datos previo a cualquier prueba del estudio.
- Ser hombre o mujer de edad igual o superior a 18 años, con capacidad para otorgar libremente el consentimiento informado para la participación en el estudio.
- Ser usuario de lentes de contacto en el momento del estudio y/o practicar deportes acuáticos al menos 2 veces a la semana y/o usuario de dispositivos electrónicos al menos durante 6 horas al día.
- Presentar una puntuación igual o superior a 3 en al menos una de las preguntas 7 a, b y c del *Dry Eye Questionnaire* (DEQ) y que hayan tenido una respuesta afirmativa a mínimo una de las preguntas 4, 5 o 6 del test McMonnies.
- No estar diagnosticado de sequedad ocular bajo tratamiento farmacológico.
- No presentar patologías sistémicas y oculares asociadas a la irritación.
- No presentar ninguno de los criterios de exclusión.

Como criterios de exclusión se establecieron los siguientes:

- Sensibilidad o intolerancia conocidas a alguno de los productos o ingredientes de las formulaciones utilizadas en el estudio.
- Historial de infecciones oculares o procesos inflamatorios severos en los 6 meses previos al comienzo del estudio.
- Cualquier cirugía ocular en los 3 meses previos al comienzo del estudio.

- Inicio, discontinuación o cambio a lo largo del estudio de la dosis de antihistamínicos, agentes colinérgicos, agentes beta-bloqueantes, antidepresivos o cualquier otra medicación sistémica con posibles efectos sobre la película lagrimal.
- Embarazo o lactancia.
- Participación del sujeto en investigaciones clínicas en los últimos 30 días previos al estudio.

El número final de pacientes incluidos en el estudio fue 36 con un rango de edad de entre 18 y 35 años. La media de edad de los pacientes fue de $32,5 \pm 8,1$ años y el ratio mujer/hombre fue 60/40.

2.2.1.3 FASES DEL ESTUDIO

La investigación clínica para el estudio de la seguridad y eficacia del sustituto lagrimal basado en *Aloe vera* e HPMC fue dividida en dos fases. Entre una fase y otra se estableció un período de al menos 7 días de descanso (*wash-out*).

2.2.1.3.1 FASE I: EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA A CORTO PLAZO

En esta primera fase del estudio de seguridad y eficacia se programaron 2 visitas. La visita I o de inclusión fue la del reclutamiento de pacientes. Después de la explicación de los procedimientos y tras la firma del consentimiento informado y del formulario de protección de datos se realizaron las pruebas recogidas en la **tabla III.10**. Una vez finalizado el reclutamiento se estableció un período de lavado (*wash out*) de una semana con suero fisiológico al 0.9% y una pauta de instilación de 3 a 8 veces el día previo a la visita 2 en todos los pacientes.

Durante la visita II se indujo irritación ocular a todos los pacientes incluidos en el estudio instilando agua clorada en concentraciones similares a las de las piscinas (0.045 mg/L) (Blanxart, n.d.). Después de inducir la irritación, a la mitad de los pacientes se les instiló la solución humectante y a la otra mitad la solución control. Se evaluaron una

batería de parámetros antes y después de la instilación de las soluciones (tras 15 minutos, 60 minutos y 120 minutos). A la mitad de los pacientes se les instiló el sustituto lagrimal y a la otra mitad la solución control, la división se realizó aleatoriamente siguiendo el procedimiento de aleatorización descrito en el apartado 2.2.1.1.

Tabla III.10.- Pruebas realizadas en cada una de las visitas de la Fase I del estudio de seguridad y eficacia.

	VISITA 1 PRE	VISITA 2 15 MINUTOS	VISITA 2 60 MINUTOS	VISITA 2 120 MINUTOS
Consentimiento informado	■			
Historia médica y ocular	■			
<i>Visual Analogue Scale (VAS)</i>		■	■	■
Agudeza Visual (ETDRS)	■	■		■
Biomicroscopía	■	■	■	■
Tiempo de ruptura lagrimal (TFBUT)	■	■	■	■
Tinción corneal	■	■	■	■
Tinción conjuntival	■	■	■	■
Test de Schirmer	■	■		■
Presión Intraocular	■			■
Fondo de ojo	■			■
Citología de impresión conjuntival	■			■
Acontecimientos adversos		■	■	■

2.2.1.3.2 FASE II: EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA A MEDIO PLAZO

Dentro de la Fase II las visitas fueron programadas por semanas; 0 (visita de referencia o PRE 1) 1, 2, 4, 6 (visita PRE 2) 7, 9 y 11. La Fase II a su vez se subdividió en dos etapas, en las que los sujetos participantes utilizaron la solución en fase de investigación durante un período de 30 días y durante otros 30 días la solución control, estableciendo un período de lavado de 15 días entre cada una de ellas. El uso de la solución de estudio y la solución control fue aleatorizado. Las pruebas realizadas en cada una de las visitas de la Fase II se encuentran recogidas en la **tabla III.11**. Con el objetivo de evitar posibles influencias diurnas en los parámetros evaluados, todas las medidas fueron realizadas en la misma franja horaria.

Tabla III.11.- Pruebas realizadas en cada una de las visitas de la Fase II del estudio de seguridad y eficacia.

	VISITA PRE 1 SOLUCIÓN 1	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	VISITA PRE 2 SOLUCIÓN 2	VISITA 4	VISITA 5	VISITA 6
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 7	Semana 9	Semana 11
	0	Día 5 a 9	Día 12 a 16	Día 27 a 33	0	Día 5 a 9	Día 12 a 16	Día 27 a 33
Desviaciones								
Sintomatología (DEQ)	■			■	■			■
VAS		■		■		■		■
Refracción subjativa	■				■			
Agudeza visual (ETDRS)	■	■		■	■	■		■
Sensibilidad al contraste	■	■		■	■	■		■
Biomicroscopía	■	■	■	■	■	■	■	■
TFBUT	■	■	■	■	■	■	■	■
Tinción corneal	■	■	■	■	■	■	■	■
Tinción conjuntival	■	■	■	■	■	■	■	■
Test de Schirmer	■	■		■	■	■		■
Presión Intraocular	■			■	■			■
Fondo de ojo	■			■	■			■
Acontecimien tos adversos		■	■	■		■	■	■
Dispensación del producto	■				■			
Recolección del producto				■				■

2.2.1.4. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA

En la Fase I las variables principales de eficacia evaluadas fueron: la hiperemia conjuntival, los parámetros asociados a la citología de impresión (densidad celular; espesor celular y nube de mucina) y el test subjetivo para valorar el confort *Visual Analogue Scale* (VAS).

La variable principal de eficacia en la Fase II del estudio fue el *Dry Eye Questionnaire* (DEQ) (pregunta 7 relacionada con la irritación ocular).

2.2.1.5. VALORACIÓN DE LA SEGURIDAD

La valoración de la seguridad y tolerancia de la solución en fase de investigación se realizó a través de la comparación de los perfiles de seguridad a corto plazo recogidos como parámetros secundarios de seguridad y eficacia. Se determinó la frecuencia de los acontecimientos adversos con las dos soluciones (experimental y control). Las variables de estudio fueron las siguientes:

- Evaluación de tinciones corneales y conjuntivales.
- Medida de la estabilidad de la película lagrimal mediante el TFBUT.
- Test de Schirmer sin anestesia.
- Función visual mediante la medida de la agudeza visual y la sensibilidad al contraste con el test ETDRS y CSV100E respectivamente.
- Presión intraocular.
- Presencia de acontecimientos adversos oculares y periorbitarios.
- Reducción de al menos una línea de la AV (LogMAR) no mejorable con corrección o con la instilación de sustitutos lagrimales.
- Cualquier suceso oftálmico adverso severo.
- Presencia de acontecimientos adversos graves o no graves durante todo el estudio.

2.2.1.6. ENSAYOS

Tras la firma del consentimiento informado y la recogida de información sobre el historial médico y ocular de cada uno de los pacientes se realizaron las siguientes pruebas.

Con el objetivo de evaluar la sintomatología se utilizó el cuestionario DEQ (*Dry Eye Questionnaire*) en su versión de 8 preguntas (DEQ-8) tanto para el reclutamiento de los pacientes como para la monitorización antes y después del uso de las soluciones durante la fase II del estudio. Este cuestionario incluye escalas categóricas para 8 síntomas comunes en sujetos que sufren sequedad ocular o irritación: discomfort,

sequedad, sensación de arena, sensación de ardor, sensación de picor, sensación de cuerpo extraño, irritación y sensibilidad a la luz. En cada uno de los síntomas se especifican frecuencia, intensidad en la mañana y en la tarde y grado de molestia para el sujeto (Begley et al., 2002). Para cada una de las preguntas existen 5 respuestas posibles representadas en una puntuación de 0 a 4 donde 0 representa “nunca” y 4 “constantemente” para la frecuencia, 0 representa “nada” y 4 “muy intenso” respecto a la intensidad y 0 representa “nada” y 4 “muy molesto” para el grado de molestia. Además este cuestionario también incluye preguntas sobre la edad, género, efecto sobre la actividad diaria, uso de dispositivos electrónicos, tratamientos farmacológicos, alergias, etc (Begley et al., 2001). También se presenta una versión adaptada para usuarios de lentes de contacto de este cuestionario denominada *Contact Lens Dry Eye Questionnaire* (CLDEQ) (Chalmers et al., 2012) y una versión reducida de 5 preguntas (DEQ-5) incluida dentro de los cuestionarios recomendados por el informe de metodología y diagnóstico del TFOS DEWS II (Wolffsohn et al., 2017). Todos los participantes respondieron individualmente a cada una de las preguntas sin la intervención del investigador garantizando las pautas marcadas en el protocolo de investigación.

Cada uno de los sujetos participantes en el estudio completó el cuestionario VAS (*Visual Analogue Scale*). Este test consiste en una línea horizontal de 100 mm en la que los pacientes marcan en la escala la zona que mejor se corresponde con sus síntomas. La puntuación final está en un rango de 0 a 100, donde los 0 puntos indican que el usuario está extremadamente insatisfecho y los 100 puntos se corresponden con la mejor puntuación.

La refracción subjetiva fue calculada siguiendo la misma técnica estándar en todos los pacientes y con el objetivo de determinar la mejor agudeza visual con corrección (BCVA).

Con el objetivo de monitorizar posibles cambios en la visión subjetiva del paciente tras la instilación de la solución en fase de investigación se evaluó agudeza visual con el test ETDRS (de las siglas en inglés de *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*), basado en el formato estandarizado de láminas de agudeza visual de alto contraste utilizado en el estudio del tratamiento precoz de la retinopatía diabética. Este optotipo de progresión logarítmica está considerado como el *gold standard* para la evaluación de la agudeza visual al permitir una mejor detección, dando el valor por letras en lugar de por filas (Noushad et al., 2012). Su diseño permite mayor precisión y consistencia del valor de agudeza visual siendo el más utilizado en investigaciones clínicas (Kaiser, 2009).

Las láminas se colocaron en una caja retroiluminada a una distancia de 4 metros con iluminación estandarizada. Aunque en el protocolo de investigación se estableció una distancia de un metro para la medida de la agudeza visual en sujetos con visión reducida, esta adaptación no fue necesaria en ninguno de los participantes. La prueba se realizó monocularmente (tomando siempre primero la medida del ojo derecho) con la mejor corrección refractiva y en condiciones fotópicas. Todos los pacientes fueron instruidos para leer los optotipos de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo hasta la línea en la que cometieron más de 3 fallos. El valor de agudeza visual se anotó como la última línea entera leída más las letras de la siguiente incrementando el resultado en 0.02 unidades logarítmicas por letra (AV LogMAR).

La función de sensibilidad al contraste se evaluó con el test CSV1000E (VectorVision, Greenville, OH, EEUU) en condiciones fotópicas a 2.5 metros de distancia. La prueba se realizó con un panel retroiluminado que presenta cuatro frecuencias espaciales de 3 (rango umbral 0.70 – 2.08), 6 (rango umbral 0.91- 2.29), 12 (rango umbral 0.61- 1.99), y 18 (0.17-1.55) ciclos/grado (Koefoed et al., 2015). Las frecuencias espaciales están localizadas en cuatro filas de forma que aparecen representadas dos láminas circulares en cada nivel de contraste y para cada una de las

frecuencias espaciales. Ambas se encuentran representadas una encima de otra de forma que una de las láminas contiene una red sinusoidal y la otra un patrón de color gris uniforme. Cada una de las frecuencias espaciales cuenta con 8 niveles de contraste, en pasos de 0.14 unidades logarítmicas. El paciente realizó la prueba con la refracción con la que logró la mejor agudeza visual corregida y fue instruido para identificar que lámina circular presentaba la red sinusoidal para cada uno de los niveles de contraste (círculo superior o inferior). Con el objetivo de evitar una elección forzada no se estableció un tiempo estricto de respuesta.

La evaluación de la integridad de la superficie ocular se realizó mediante biomicroscopía de polo anterior con una lámpara de hendidura (SL-D4, Topcon, Tokio, Japón) utilizando las características de iluminación y los aumentos recomendados para observar cada una de las zonas de la superficie ocular. La escala de Efron, con una puntuación de 0 a 4 fue la escogida para valorar los siguientes hallazgos: hiperemia bulbar y tarsal, presencia de papilas, neovascularización corneal y aparición de infiltrados (Efron, 1998).

El volumen lagrimal fue recogido realizando el test de Schirmer I (sin anestesia) siguiendo el criterio de van Bijsterveld (Van Bijsterveld, 1969). La tira de Schirmer (TearFlo™ sterile strips, HUB Pharmaceuticals) fue colocada en la conjuntiva tarsal de la zona temporal del párpado inferior durante 5 minutos. El paciente fue instruido para mantener los ojos cerrados, evitando así la secreción refleja. Una vez transcurridos los 5 minutos el volumen lagrimal fue registrado teniendo en cuenta la longitud en milímetros de la tira de Schirmer humedecida por la lágrima.

Después de la realización del test de Schirmer, teniendo en cuenta que es una prueba ligeramente invasiva, se estableció un período de descanso de 10 minutos hasta la evaluación del tiempo de ruptura lagrimal (TFBUT) para favorecer la recuperación de la superficie ocular y de los valores basales de volumen lagrimal.

La valoración del tiempo de ruptura lagrimal se realizó con lámpara de hendidura aumento 10x bajo iluminación azul cobalto y a través de un filtro amarillo Wratten #12 (Eastman Kodak, Rochester, NY, EEUU) para mejorar el contraste. Con el objetivo de garantizar la repetibilidad del procedimiento de tinción, se utilizó una solución con fluoresceína sódica (NaFL) al 2% (Fluorescinnatrium Chauvin) (Korb et al., 2008). En cada aplicación se instilaron 5 µl de fluoresceína diluida en el fondo de saco conjuntival inferior y se pidió al sujeto que parpadeara varias veces para conseguir su correcta extensión sobre la superficie ocular, esperando 20 segundos hasta realizar la primera evaluación del TFBUT. Se registró el intervalo de tiempo desde el último parpadeo hasta la aparición de la primera zona de ruptura de la película lagrimal (discontinuidad de la tinción con fluoresceína) (Norn, 1969). El resultado se expresó como el promedio de tres medidas consecutivas.

Tras la evaluación del TFBUT se estableció un período de descanso de 10 minutos y se volvieron a instilar 5 µl de fluoresceína sódica diluida al 2% en el fondo de saco conjuntival inferior para evaluar la integridad corneal. Se pidió al sujeto que parpadeara varias veces para que la fluoresceína se extendiera correctamente en la superficie del ojo. El procedimiento para examinar la superficie corneal teñida fue similar al que se ha descrito para evaluar el TFBUT, modificando únicamente el aumento de la lámpara de hendidura a 16x. La valoración se realizó utilizando una plantilla que divide la córnea en 5 áreas (central, temporal, nasal, superior e inferior) alineando la circunferencia exterior con el limbo corneal.

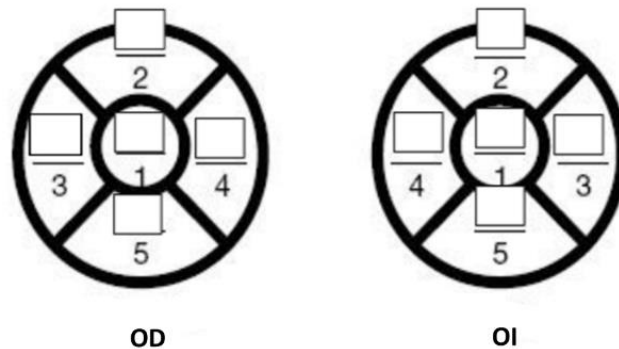


Figura III.2.- División corneal en diferentes áreas.

La intensidad de la tinción corneal con fluoresceína se clasificó en cada área con una puntuación de 0 a 4 puntos de acuerdo a la escala de valoración de complicaciones de lentes de contacto diseñada por Nathan Efron. En esta escala cada paso de calificación de 1.0 unidades se corresponde con una diferencia clínicamente significativa en la gravedad del hallazgo (Efron, 1998; Efron et al., 2001). La interpretación de los niveles de calificación se realizó siguiendo los grados y descripciones descritos en ella (tabla III.12).

Tabla III.12.- Interpretación de los niveles de calificación de la escala de valoración de complicaciones de lentes de contacto de Efron. *Tabla adaptada* (Efron, 1998).

GRADO	INTERPRETACIÓN
0	Normal – sin cambios en el tejido
1	Leves indicios – no precisa acción clínica
2	Medio – es posible que pueda precisar acción clínica
3	Moderado – generalmente requiere acción clínica
4	Grave – requiere acción clínica urgente

Una vez valorado el grado de tinciones corneales se estableció de nuevo un período de 10 minutos hasta la valoración del grado de las tinciones conjuntivales, con el objetivo de permitir la eliminación de los restos de fluoresceína sódica. En este caso se utilizaron tiras de Verde de Lisamina (GreenGlo™, HUB Pharmaceuticals)

humedecidas con 25 μ l de suero fisiológico (NaCl 0.9%). Se aplicó una gota en el fondo de saco conjuntival inferior esperando 2 minutos para su correcta extensión y a continuación se evaluó la superficie conjuntival en la lámpara de hendidura con aumento 16x. Se usó como guía una plantilla que divide la conjuntiva en 6 áreas (central superior e inferior de la zona nasal, central superior e inferior de la zona temporal, periférica nasal y periférica temporal). Del mismo modo que para las tinciones corneales la severidad de los hallazgos en conjuntiva se clasificó de 0 a 4 puntos siguiendo la escala de Efron (Efron, 1998; Efron et al., 2001).

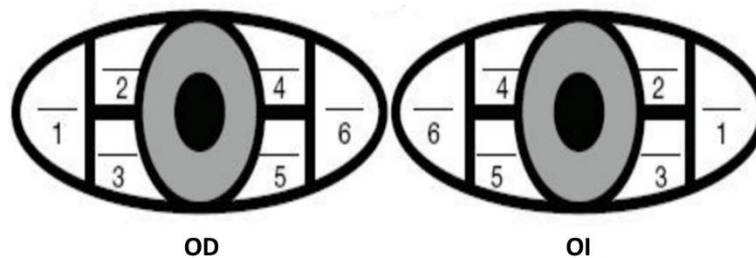


Figura III.3.- División en áreas de la conjuntiva bulbar.

La valoración de la presión intraocular (PIO) fue realizada utilizando tonometría de aire (NT-1000 non-contact tonometer, Nidek Co. Gamagori, Japón). El resultado se anotó como la media de tres medidas consecutivas en cada uno de los ojos.

El fondo de ojo fue examinado mediante retinografía no midriática (TRC.NW8 Non-mydratic retinal camera, Topcon, Tokio, Japón), permitiendo la aclimatación del paciente a la oscuridad durante unos minutos para dilatar la pupila. Se recogieron todos los posibles hallazgos anormales y se guardaron todas las imágenes generadas.

Del mismo modo se notificó en la ficha de cada uno de los pacientes cualquier acontecimiento adverso encontrado relacionado con la instilación del producto. Se dividieron en las categorías de graves y no graves. Lo que determinó el procedimiento a seguir para la notificación y la documentación de los mismos.

Durante la Fase I del estudio de seguridad y eficacia se recogió una muestra de las células epiteliales de la conjuntiva mediante citología de impresión. Antes de tomar la muestra y con el objetivo de eliminar los restos de los colorantes vitales instilados se realizó un lavado con suero fisiológico (NaCl 0.9%) de la superficie ocular y se estableció un período de reposo de 10 minutos antes de realizar la prueba para evitar interferencias.

Se realizó una primera recogida para obtener valores basales y otra una vez inducida la irritación e instilada la solución en fase de investigación y la solución control, con el objetivo de observar y monitorizar el efecto de la instilación a corto plazo a nivel de la superficie ocular.

Para realizar las citologías de impresión conjuntivales se utilizó el dispositivo Eyeprim™ (OPIA Technologies SAS, Paris, Francia) equipado con papel de filtro, membrana de polietersulfona (PES), y diseñado teniendo en cuenta la curvatura de la esclera y el diámetro limbal.

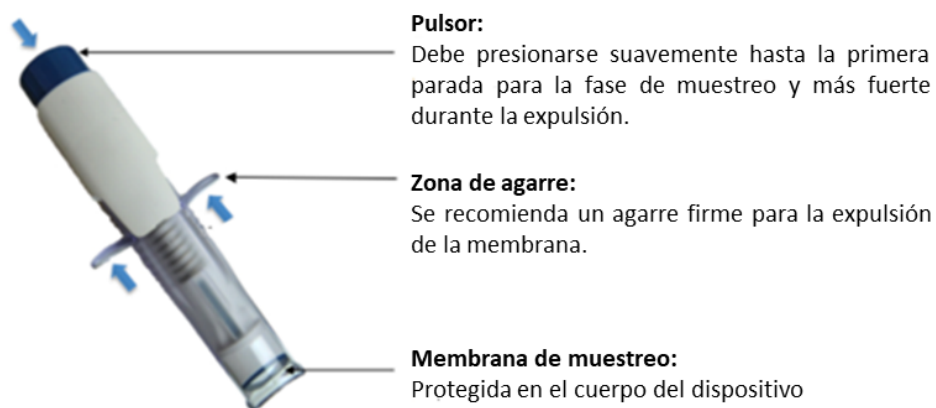


Figura III.4.- Dispositivo Eyeprim™ (OPIA Technologies SAS, Paris, Francia).

Imagen adaptada del prospecto del producto 07- 2019.

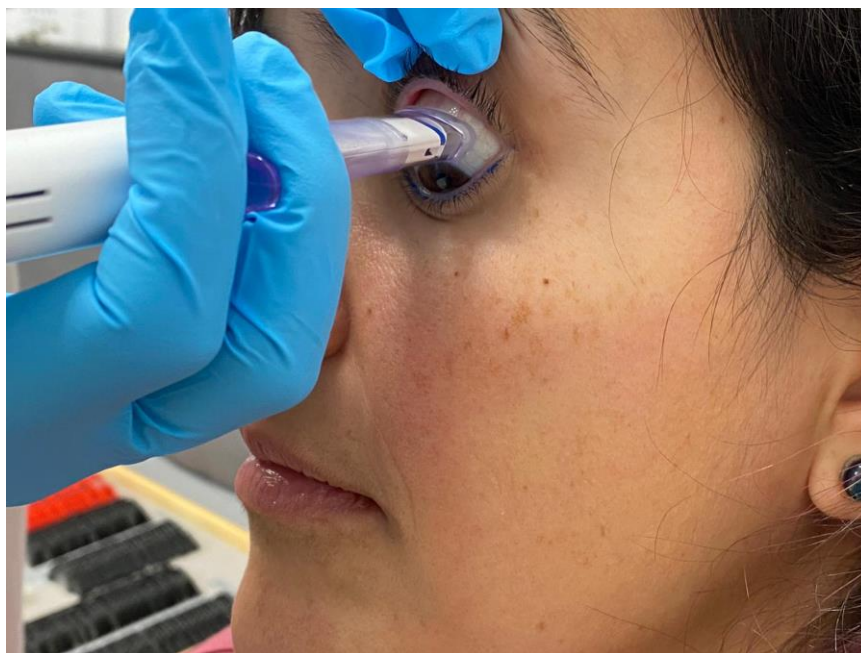



Figura III.5.- Toma de muestra de citología de impresión en conjuntiva bulbar superior con dispositivo Eyeprim™ (OPIA Technologies SAS, Paris, Francia).

Este dispositivo cuenta con una membrana de muestreo de una superficie de 69 mm² destinada a ser puesta en contacto con la conjuntiva bulbar superior de los pacientes tomando una distancia de seguridad de 1.5 a 2 mm desde el borde del filtro hasta el área del limbo corneal (**ver Tabla III.13**). La toma de muestra se realizó sin anestesia manteniendo un contacto suave, aproximadamente durante 2-3 segundos entre la membrana de PES y la conjuntiva bulbar superior (**Ver figura III.5**).

Tabla III.13.- Características de la membrana utilizada en el dispositivo Eyeprim™ (OPIA Technologies SAS Paris, Francia). Tabla adaptada del prospecto de EYEPRIM™ -07-2019.

CARACTERÍSTICAS DE LA MEMBRANA	
FORMA	 <p>Curvatura escleral</p> <p>Diámetro Limbal</p>
SUPERFICIE	69 mm ²
TIPO	Polietersulfona optimizada para obtener el mejor rendimiento

Todas las muestras fueron conservadas en alcohol al 96% y a temperatura de entre 2- 5°C antes de su tinción. El tiempo máximo transcurrido entre la toma de la muestra y su introducción en alcohol fue de 10 minutos con el objetivo de evitar la lisis celular.

El método de tinción seleccionado para la visualización de las mucinas secretadas por las células Goblet fue la Tinción PAS – hematoxilina (*Periodic Acid Schiff* – hematoxilina). Esta tinción histoquímica es un método ampliamente utilizado para la detección de polisacáridos simples, mucopolisacáridos y muco- y glicoproteínas en diferentes tejidos.

El mecanismo de coloración de este tipo de tinción se basa en una modificación química del tejido previa a la coloración, en la que el ácido periódico es el que lleva a cabo la reacción. El fundamento de la reacción consiste principalmente en la oxidación de los tejidos con ácido periódico con el objetivo de incrementar el número de grupos carbonilos (aldehídos o cetonas) presentes en ellos. La muestra es tratada con el

reactivo de Schiff que reacciona con dos grupos aldehídicos dando lugar a una coloración rojo – púrpura.

La secuencia completa para la realización de la tinción de las muestras se encuentra recogida en la **tabla III.14**. Una vez en el portaobjetos las muestras fueron sumergidas en hematoxilina durante 20 segundos con el objetivo de teñir el lecho epitelial. Este paso se realizó en ausencia de luz para evitar la oxidación del colorante. Después de la tinción se realizó un lavado en agua destilada antes de deshidratar y fijar las muestras a través de series de etanol ascendentes y de la exposición a xilol.

Tabla III.14.- Secuencia de procesamiento para la tinción PAS - hematoxilina de las citologías de impresión conjuntival.

PREPARADO HISTOLÓGICO EN PLACA MULTIWELL 24	
Agua destilada	10 minutos de enjuague y lavado
Ácido periódico 1%	10 minutos (muestra protegida de la exposición a la luz)
Agua destilada	3 minutos
Reactivo de Schiff (Leucofucsina)	3 minutos
Agua destilada	5 minutos
PREPARADO HISTOLÓGICO EN PORTAOBJETOS	
Solución de hematoxilina	20 segundos
Agua destilada	5 minutos
Etanol al 70%	2 minutos
Etanol 96% (x2)	2 minutos (x2)
Etanol 100% (x2)	2 minutos (x2)
Xilol	9 minutos
MONTAJE EN PORTAOBJETOS CON MEDIO DE MONTAJE ANHIDRO ENTELLAN®	

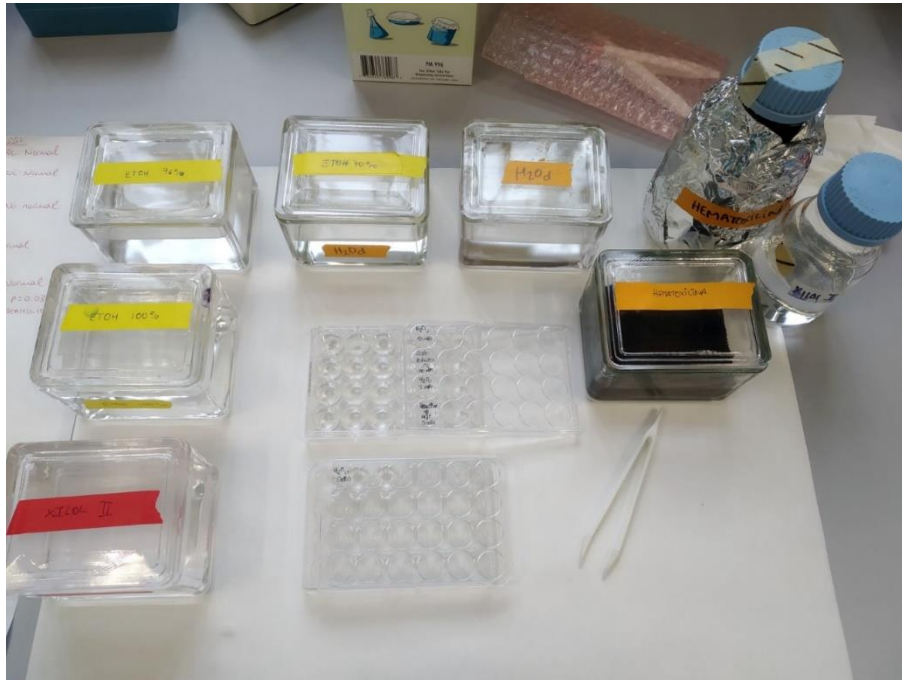


Figura III.6.- Procedimiento de tinción PAS – hematoxilina para citologías de impresión conjuntival.

Como paso final, las muestras se montaron en un portaobjetos con medio de montaje Entellan® para la posterior evaluación microscópica. La visualización de las preparaciones fue realizada mediante microscopía confocal de escaneo láser (LCM) con el microscopio Zeiss Axiovert equipado con el módulo LSM 5 Pascal (Zeiss LSM Pascal; Carl Zeiss, Jena, Alemania) siguiendo el protocolo descrito por Peral y Pintor (Peral and Pintor, 2008).

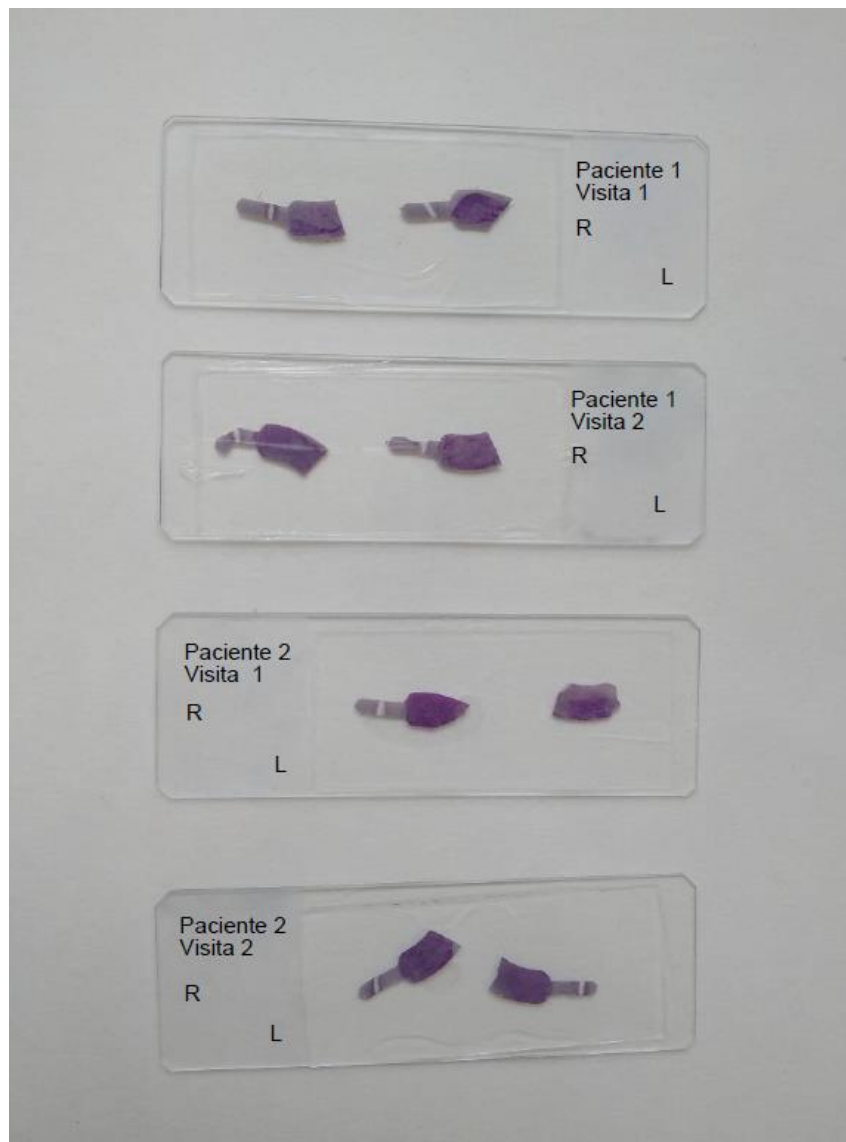


Figura III.7.- Montaje citológicas de impresión conjuntival tras tinción PAS - hematoxilina.



Figura III.8.- Microscopio confocal Zeiss LSM Pascal (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

En cada citología se evaluaron 3 parámetros: densidad celular (células/mm²), altura de la nube de mucina (MCH) y espesor de las células Goblet (CLT), éstas dos últimas medidas en micras (µm). Para la evaluación de la densidad celular se utilizó un aumento 20x mientras que en el análisis del espesor de las células Goblet y de la nube de mucina se empleó un aumento 40x. Los tres parámetros se evaluaron con 488 y 543 nm y una transmisibilidad del 10% y del 15,9% respectivamente. La microscopía confocal láser escanea muestras en el eje Z a intervalos de 0.25 µm entre fotogramas. El tamaño de campo para las imágenes confocales fue de 450 x 450 µm utilizando un factor de multiplicación para obtener la densidad celular de 4.938. Para contabilizar la densidad de las células Goblet se analizaron 5 cuadrantes de la muestra seleccionados aleatoriamente. La medida del espesor de la célula y de la altura de la nube de mucina se realizó de forma simultánea en 10 células seleccionadas también al azar.

2.2.2 EVALUACIÓN DE LA HUMECTABILIDAD SOBRE LA SUPERFICIE DE LENTES DE CONTACTO DEL SUSTITUTO LAGRIMAL BASADO EN *ALOE VERA* E HPMC

2.2.2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Con el objetivo de evaluar la capacidad de humectar la superficie de las lentes de contacto de la solución basada en *Aloe vera* e HPMC se realizó un estudio experimental, prospectivo y de corte transversal.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos de Madrid previo al comienzo del estudio y la realización fue aprobada por las autoridades sanitarias correspondientes (AEMPS). Se siguieron los requerimientos de la norma UNE – EN ISO 14155: 2011 Investigación clínica de productos sanitarios para humanos – Buenas prácticas clínicas (UNE-EN ISO 14155, 2011) y los principios de la Declaración de Helsinki de 1964, renovada y revisada por última vez en el 2009 (Tognoni, 2009).

Las pruebas se llevaron a cabo en 30 ojos de 15 sujetos sanos con edades comprendidas entre 18 y 35 años y una media de $25,3 \pm 3,0$ años, en los que se evaluó la humectación sobre la superficie de lentes de contacto hidrofílicas antes y después de la instilación de la solución control y de la solución en fase de investigación. El ratio mujer/hombre fue 60/40.

Al igual que para el resto de estudios *in vivo* todas las pruebas se realizaron en la Clínica de Optometría de la Facultad de Óptica y Optometría, de la Universidad Complutense de Madrid y con el objetivo de evitar posibles influencias diurnas en los parámetros evaluados, todas las medidas fueron realizadas en la misma franja horaria.

La sala en la que se realizaron las medidas se mantuvo en condiciones de temperatura y humedad controlada (aproximadamente entre 24°C y 40% de humedad relativa respectivamente) siguiendo los mismos criterios en todos los pacientes.

Se incluyeron en el estudio 30 ojos de 15 sujetos sanos. Cada paciente utilizó una lente de contacto de reemplazo diario hidrofílica o lente 1 (ocufilcon D) en un ojo y una lente de contacto de hidrogel silicona o lente 2 (somofilcon A) en el ojo contralateral. Todas ellas con una potencia dióptrica de -0.50 D. La selección del material adaptado en cada ojo se realizó de forma aleatoria. Previo al comienzo del estudio todas las lentes de contacto fueron equilibradas en solución salina (NaCl 0.9%) durante 30 minutos.

Tabla III.15.- Características de las lentes de contacto utilizadas para la evaluación de la humectación.

LENTE 1	BIOMEDICS 1 DAY EXTRA
Material	45% ocufilcon D y 55% de agua
Grupo ISO / FDA	Hidrogel (Grupo IV)
Fabricante	Coopervision Inc
LENTE 2	CLARITY 1 DAY
Material	44% somofilcon A y 56% de agua
Grupo ISO / FDA	Hidrogel de Silicona (Grupo V)
Fabricante	Coopervision Inc

Después del porte de la lente de contacto durante 30 minutos para permitir la estabilización de la película lagrimal, se analizó la superficie de la lente *in vivo* con el topógrafo corneal Medmont E300 (Medmont International, Melbourne, Australia) mediante un sistema de videoqueratoscopía. Esta técnica no invasiva consiste en una extensión de la popular técnica estática para evaluar la topografía corneal y está basada en el análisis de la estructura de la imagen reflejada del disco de plácido sobre la superficie corneal o sobre la cara anterior de la lente de contacto. Si la superficie presenta irregularidades, el rayo reflejado se desvía o se dispersa y la imagen adquirida pierde su forma original de patrón de anillo. A través de la medida de la estructura del patrón de anillo se puede estimar la calidad de la película lagrimal.

El dispositivo Medmont E300 cuenta con un módulo específico para analizar la calidad de la película lagrimal mediante el parámetro TFSQ (*Tear Film Surface Quality*) en función de la ruptura de la misma sobre la superficie ocular o sobre la superficie de la lente de contacto. Los resultados pueden expresarse en función de la media del valor

TFSQ o con el valor del área TFSQ, donde se muestra el porcentaje de la superficie ocular o de la superficie de la lente de contacto dentro de la zona de los 7 mm centrales donde se ha alcanzado el nivel umbral del TFSQ predefinido. La fiabilidad y repetibilidad de esta técnica han sido descritas previamente en la literatura científica (Szczesna et al., 2010) así como su capacidad para la evaluación de la deshumectación de diferentes materiales de lentes de contacto *in vivo*.



Figura III.9.- Topógrafo corneal Medmont E300 (Medmont International, Melbourne, Australia)

Después de instruir al paciente para que parpadeara 2 veces consecutivas, se tomó una topografía dinámica durante 20 segundos con el objetivo de registrar una medida previa antes de la instilación de ambas soluciones. A continuación, el paciente rellenó el cuestionario VAS para valorar subjetivamente la calidad de la visión y la comodidad en condiciones basales. Además, se realizó una valoración de la agudeza visual para diferentes niveles de contraste con el test ETDRS; alto contraste (100%) y

bajo contraste (10%) en condiciones fotópicas siguiendo el mismo método descrito en el apartado **2.2.1.6.** con el objetivo de detectar cambios en la función visual justo después de la instilación de las soluciones con más sensibilidad.

Tras rellenar el test, se instiló la solución humectante en cada ojo y se realizaron medidas con el topógrafo en los minutos 1, 3, 5, 10, 20 y 30 después de la instilación. Los participantes fueron instruidos para centrar el enfoque en el objetivo de fijación central, parpadearon dos veces suavemente y luego suprimieron el parpadeo durante el período de captura.

Con una velocidad de dos fotogramas por segundo (2 Hz) se capturó un video de una duración predeterminada de 20 segundos. Durante los tiempos libres entre cada una de las medidas se aconsejó a los participantes que parpadearan con normalidad.

Una vez finalizada cada una de las medidas establecidas después de la instilación, cada sujeto realizó de nuevo el cuestionario VAS y se volvió a evaluar la agudeza visual de alto y bajo contraste.

2.2.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOLUCIÓN BASADA EN *ALOE VERA* E HPMC SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE MOLÉCULAS PRO-INFLAMATORIAS EN LA PELÍCULA LAGRIMAL

2.2.3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Tras la evaluación de la seguridad y eficacia de la solución en fase de investigación, se puso en marcha una investigación clínica experimental, doble enmascarada y aleatorizada con el objetivo de valorar la influencia de su uso sobre la concentración de marcadores inflamatorios en la superficie ocular.

Al igual que el estudio de seguridad y eficacia, esta investigación se realizó de acuerdo a la guía de buenas prácticas clínicas UNE - EN ISO 14155: 2011 Investigación clínica de productos sanitarios para humanos – Buenas prácticas clínicas (UNE-EN ISO 14155, 2011) y los principios de la Declaración de Helsinki (Tognoni, 2009). El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos de

Madrid antes del comienzo del estudio y la realización del mismo fue notificada a las autoridades sanitarias correspondientes (AEMPS).

Del mismo modo que en el estudio de seguridad y eficacia, se aseguró el cumplimiento de la ley 14/2007 de Investigación Biomédica (Agencia estatal BOE 159, 2007). Todas las muestras recogidas en el presente estudio se utilizaron exclusivamente para fines científicos y una vez finalizada la investigación fueron destruidas de acuerdo a las pautas legales.

Todos los pacientes incluidos participaron voluntariamente en el estudio. El reclutamiento al igual que en el resto de estudios incluidos en la fase *in vivo* se realizó en la Clínica de Optometría de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid. Una vez explicada la naturaleza, los procedimientos utilizados y los riesgos potenciales derivados de la investigación clínica se obtuvo la firma del consentimiento informado de cada uno de los pacientes antes del comienzo de la investigación. Además, todos ellos fueron informados de la posibilidad de abandonar el estudio en cualquier momento y sin necesidad de justificación.

Como criterios de inclusión en el estudio se establecieron los siguientes:

- Puntuación mayor de 13 en el cuestionario McMonnies (McMonnies et al., 1998).
- Entender y firmar el consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Diagnóstico previo de patologías de la superficie ocular que pudieran interferir con sintomatología de sequedad ocular como queratocono, distrofias corneales, etc...
- Embarazadas o mujeres en período de lactancia.
- Sujetos menores de 18 y mayores de 70 años.

- Pacientes con tratamiento previo con ciclosporina A tópica o que usasen en el momento del reclutamiento alguna lágrima artificial basada en hialuronato sódico.
- Pacientes con tratamiento con fármacos sistémicos con efectos adversos secundarios relacionados con sequedad ocular: antihistamínicos, antidepresivos, anticonceptivos etc...

El número total de sujetos incluidos en el estudio fue de 20. Dentro de un rango de edad de 38 a 66 años y con una media de $51,9 \pm 8,4$ años. El ratio mujer/hombre fue de 60/40 respectivamente. Todos los pacientes reclutados completaron el estudio. Todas las medidas se realizaron en ambos ojos antes de la instilación y tras 1 mes y 3 meses utilizando la solución en fase de investigación y la solución control. Se seleccionó aleatoriamente que ojo se trataba con la solución humectante y que ojo con la solución control.

El producto en investigación fue suministrado como solución estéril sin conservantes en formato monodosis, conteniendo *Aloe vera* al 1.0% e HPMC al 0.2% (Avizor S.A., Madrid, España). Todos los pacientes recibieron solución fisiológica sin conservantes (NaCl 0.9%) en formato monodosis en el ojo contralateral. Ambas soluciones fueron suministradas con el mismo material de acondicionamiento (aproximadamente 0.4 ml por ampolla monodosis) para garantizar la aleatorización y el enmascaramiento doble de la investigación. Los pacientes fueron instruidos para instilarse entre 4 - 6 gotas diariamente. Se les asignó el tratamiento aleatoriamente designando un código para cada uno de los productos. El cumplimiento del tratamiento fue confirmado a través de la devolución de los productos de investigación por parte de todos los participantes.

Todas las medidas fueron realizadas en la Clínica de Optometría de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid. Al igual que para el resto de estudios *in vivo* con el objetivo de evitar posibles influencias diurnas en los

parámetros evaluados, todas las medidas fueron realizadas durante la misma franja horaria.

2.2.3.2 ENSAYOS

El resumen de las pruebas realizadas en el estudio sobre la evaluación del efecto sobre la concentración de moléculas pro-inflamatorias se encuentra recogido en la **tabla III.16.**

Tabla III.16.- Pruebas realizadas en cada una de las visitas del estudio de evaluación de la concentración de moléculas pro-inflamatorias.

	VISITA 1 PRE	VISITA 2 1 MES	VISITA 3 3 MESES
Consentimiento informado	▪		
Historia médica y ocular	▪		
Sintomatología (DEQ)	▪	▪	▪
Test de Schimer	▪	▪	▪
Tiempo de ruptura lagrimal (TFBUT)	▪	▪	▪
Biomicroscopía	▪	▪	▪
Concentración Interleuquina - 1 β	▪	▪	▪
Concentración Interleuquina - 6	▪	▪	▪
Concentración Metaloproteínasa de matriz - 9	▪	▪	▪

Con el objetivo de registrar los cambios en la sintomatología de sequedad ocular antes y después de la instilación de la solución en estudio, usamos el cuestionario DEQ (*Dry Eye Questionnaire*) (Begley et al., 2001). Como se ha descrito anteriormente este cuestionario revela la presencia de sintomatología de sequedad e irritación ocular, así como el grado y el momento del día en que los síntomas son más severos. Sus características se encuentran descritas en el apartado **2.2.1.6**. Fue completado en las tres visitas y cada uno de los participantes respondió individualmente y sin la intervención del investigador garantizando las pautas establecidas en el protocolo de investigación.

La evaluación de la estabilidad, del volumen lagrimal y de la integridad de la superficie ocular se realizó con el TFBUT, el test de Schirmer y mediante examen con

lámpara de hendidura siguiendo los mismos procedimientos descritos en el apartado **2.2.1.6.**

Para la evaluación de los niveles de las moléculas pro-inflamatorias MMP-9, IL-1 β e IL-6 en lágrima humana se utilizó la técnica ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). El volumen lagrimal utilizado en el ensayo fue el recogido con la propia tira de Schirmer durante un período de 5 minutos según el procedimiento descrito en el apartado **2.2.1.6.**

Una vez completada la prueba de Schirmer, las tiras se congelaron inmediatamente a -80 °C para el análisis posterior de cuantificación de proteínas pro-inflamatorias. Para la obtención de la muestra de lágrima recogida, las tiras de Schirmer se eluyeron con 500 μ L de tampón fosfato salino y tritón X-100 según el procedimiento descrito por Kramann y colaboradores (Kramann et al., 2011). El cálculo de la concentración total de MMP-9, IL-1 β e IL-6 se realizó con los siguientes kits comerciales ELISA: *Human MMP-9 Quantikine ELISA*, *Human IL-1 β Quantikine ELISA*, *Human IL-6 Quantikine ELISA*, todos ellos comercializados por R&D Systems (Vitro S.A. Madrid, España) teniendo en cuenta el volumen de lágrima recogido en cada uno de los pacientes en la prueba de Schirmer.

Dichos kits cuentan con una sensibilidad de 0.156 ng/ml, 1 pg/ml y 0.7 pg/ml respectivamente. Y con rangos de detección entre 0.3 – 20 ng/ml para MMP-9, 3.9 - 250 pg/ml para IL-1 β y 3.1 – 300 pg/ml para IL-6.

Estos inmunoensayos son ELISAs de fase sólida diseñados para medir MMP-9 (proformas de 92 kDa y formas activas de 82 kDa), IL-1 β e IL-6 (naturales y recombinantes) humanas en sobrenadantes de cultivos celulares, saliva, suero y plasma por medio de la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático en sándwich. La microplaca comercial de 96 pocillos se encuentra recubierta con anticuerpos específicos para MMP-9, IL-1 β e IL-6 humana en cada uno de los casos. Todos los ensayos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el propio fabricante. Los

reactivos y muestras se emplearon a temperatura ambiente y cada una de las muestras, estándares y controles fueron analizados por duplicado.

El primer paso del procedimiento consistió en añadir en cada uno de los pocillos 100 μ l del diluyente de ensayo incluido en los respectivos kits comerciales y 100 μ l de los estándares, controles y muestras para el ensayo de cuantificación de MMP-9 e IL-6, y 50 μ L del diluyente de ensayo y 200 μ l de los estándares, controles y muestras para la cuantificación de la IL-1 β ; con el objetivo de que cada uno de los marcadores inflamatorios se uniera específicamente a los anticuerpos inmovilizados en cada una de las microplacas. Cada una de ellas se cubrió con un sellador proporcionado en el propio kit comercial con el objetivo de ser incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador orbital en el caso de la MMP-9 y sin agitación para la IL-1 β e IL-6. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 4 lavados para eliminar las sustancias no unidas empleando 400 μ l del buffer de lavado en cada uno de ellos y se agregaron 200 μ l de conjugado con anticuerpos policlonales ligados a enzimas específicos para MMP-9, IL-1 β e IL-6 humanos respectivamente en cada una de las placas. Se establecieron de nuevo períodos de incubación de 1 hora para MMP-9 en el agitador orbital, 1 hora para IL-1 β (sin agitación) y 2 horas para IL-6 (sin agitación) en todos los casos a temperatura ambiente. Tras el periodo de incubación se realizaron otros cuatro lavados siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para eliminar el reactivo enzima - anticuerpo no unido. Se agregaron 200 μ l de solución sustrato a los pocillos y se incubaron cada una de las microplacas a temperatura ambiente y sin agitación durante 30 minutos (MMP-9) y 20 minutos (IL-1 β e IL-6) protegiéndolas de la exposición a la luz. Durante este período de incubación se desarrolla color en proporción a la cantidad de MMP-9, IL-1 β e IL-6 unidas en el paso inicial. El cambio en las soluciones se produce de un tono incoloro a diferentes gradaciones de azul tras 30 minutos. El último paso para todos los ensayos consistió en detener el desarrollo de

color agregando la solución “stop” (H_2SO_4 1M) en cada uno de los pocillos para parar la reacción.



Figura III.10.- Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Una vez terminado el proceso se procedió a leer la absorbancia a 450 nm en los primeros 30 minutos después de finalizar el ensayo en el lector de placas Gen 5 (Biotek, Winooski, VT, EEUU) ajustando la corrección de la longitud de onda a 540 o 570 nm. El cálculo de la concentración en la muestra se obtuvo a partir de la correlación lineal realizada con el antígeno estándar frente a la absorbancia.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en esta memoria se representan como la media aritmética \pm la desviación estándar (media \pm S.D) o como la media aritmética \pm error estándar de la media (media \pm S.E.M). Todos los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU).

Se utilizaron diferentes técnicas para el análisis en función de los grupos a analizar y del tipo de prueba realizada. Para evaluar si las muestras cumplían la normalidad se utilizó la prueba estadística de Kolmogorov- Smirnov.

Después de comprobar si las variables estudiadas cumplieron la normalidad, se realizaron diferentes comparaciones en función de los datos de origen. En el caso de

los ensayos de viabilidad celular realizados en la fase *in vitro*, se hizo una comparación entre grupos independientes, por lo que se realizó el test estadístico paramétrico t de Student para muestras independientes.

Para el caso del estudio de seguridad y eficacia realizado *in vivo*, se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas, y cuando se evaluaron los cambios con el tiempo, se realizó la prueba ANOVA para medidas repetidas.

Para los ensayos de humectación *in vivo* se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas con el objetivo de comparar cada tiempo con la medida basal y el test ANOVA de una vía para analizar la tendencia media del parámetro TFSQ.

Por último, la evaluación de las diferentes medidas del estudio de biomarcadores inflamatorios se realizó con el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras pareadas o bien el test t de Student para muestras pareadas.

En todos los ensayos *in vivo* se realizó el cálculo del tamaño muestral con el programa estadístico Granmo 6.0 asumiendo un riesgo alfa de 0.05, una potencia estadística del 80% y una relación 1:1 entre grupos.

Los niveles de significación establecidos para todos los ensayos han sido: (***) $p < 0.001$ (diferencia extremadamente significativa), (**) $p < 0.01$ (diferencia muy significativa), y (*) $p < 0.05$ (diferencia significativa). Todos los niveles superiores a 0.05 se han tomado como no significativos (ns).



RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIOS *IN VITRO*

1.1 EVALUACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON ALOE VERA E HPMC SOBRE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL MEDIANTE ENSAYOS MTT.

Tras la búsqueda de nuevos componentes para sustitutos lagrimales que tuvieran un efecto beneficioso sobre la superficie ocular, se seleccionó el *Aloe vera* en base a las propiedades descritas en la introducción.

Una vez elegido el componente, se establecieron una serie de experimentos para seleccionar la concentración que ofreciera un equilibrio entre seguridad y eficacia.

El primer experimento que se realizó fue el de determinar la concentración de *Aloe vera* que proporcionara un mayor efecto protector frente a la irritación. Para ello, se evaluó la viabilidad celular en células de epitelio corneal de conejo inmortalizadas (SIRC) incluyendo concentraciones crecientes de *Aloe vera* (0.5, 1, 2, 3 y 5%) en una fórmula base compuesta por tampón bórax-bórico, diferentes osmolitos y un 0.2% de HPMC. Como control se utilizó solución salina al 0.9% y la propia fórmula base. Todas las soluciones empleadas se caracterizaron por ser fórmulas libres de conservantes.

En la **figura IV.1** se muestran los resultados obtenidos en la viabilidad celular a los 10 minutos de exposición al agente irritante, normalizados frente a la lágrima control, es decir, la solución base sin *Aloe vera* y sin la irritación del DMSO. En ella se puede comprobar cómo esta fórmula base muestra un 7% más de viabilidad celular que una solución salina y cómo se reduce en torno al 10% la viabilidad de las células al añadir el irritante DMSO en ambas soluciones.

Al comparar los resultados observados para las distintas concentraciones de *Aloe vera* respecto a la lágrima control, la concentración del 1% muestra el mayor porcentaje de viabilidad celular. Se produce un aumento de un 15% y un 35% en la

viabilidad celular frente a la misma solución sin *Aloe vera*, en ausencia y en presencia del irritante DMSO respectivamente.

La concentración de *Aloe vera* del 2% también reportó una mejora sobre el control aunque no tan acusada como la obtenida para la concentración del 1%.

El resto de concentraciones de *Aloe vera* presentaron un comportamiento similar al del sustituto lagrimal sin *Aloe vera*. Los valores de viabilidad celular descendieron alrededor del 20% respecto a la fórmula base sin el agente irritante, a excepción del porcentaje del 0.5% con el que se observó una reducción del 40%.

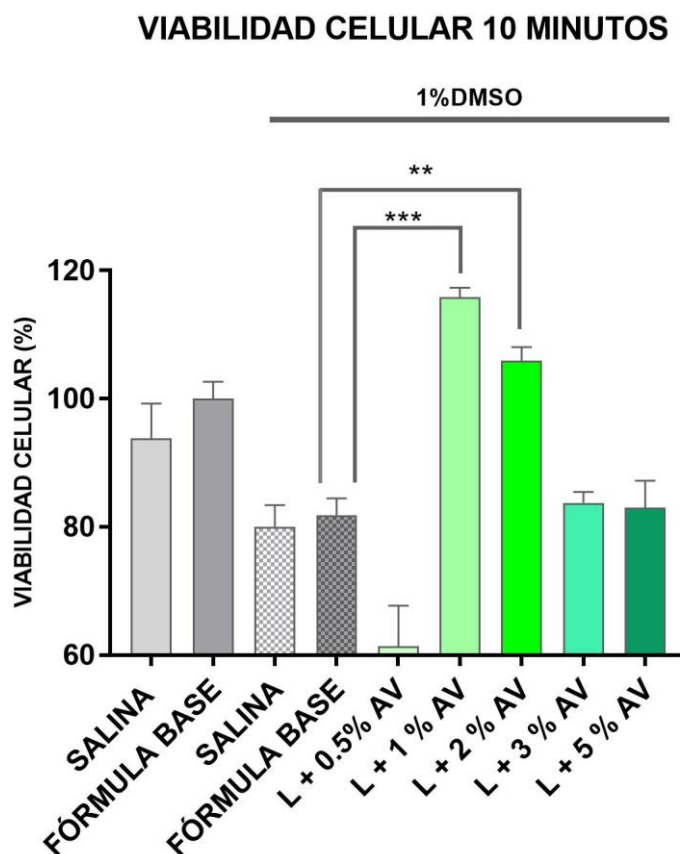


Figura IV 1.- Valores de viabilidad celular de distintas concentraciones de *Aloe vera* tras 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO.

El gráfico muestra la viabilidad celular de distintas concentraciones de *Aloe vera* añadidas a la base de un sustituto lagrimal y sus respectivos controles tras 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a la solución humectante control sin *Aloe vera* (fórmula base) (media \pm SD) ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. t de Student para muestras independientes.

El análisis de los resultados tras 60 minutos de exposición al agente irritante DMSO mostrado en la **figura IV.2**, refleja que se produce un efecto similar de reducción de la viabilidad celular con las soluciones control (fórmula base) y salina.

A diferencia de lo observado a los 10 minutos, la concentración del 1% de *Aloe vera* no muestra diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular si lo comparamos con la fórmula base después de una exposición de 60 minutos a DMSO.

El resto de concentraciones muestran peores resultados, reduciendo la viabilidad entre un 10% y un 40%.

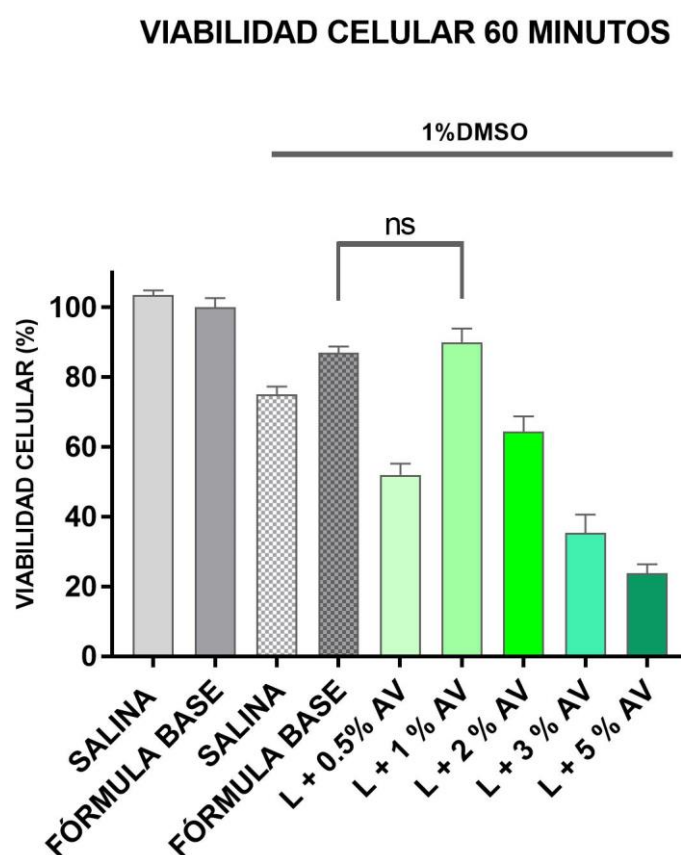


Figura IV.2.- Valores de viabilidad celular de distintas concentraciones de *Aloe vera* tras 60 minutos de exposición al agente irritante DMSO.

El gráfico muestra la viabilidad celular de distintas concentraciones de *Aloe vera* añadidas a la base de un sustituto lagrimal y sus respectivos controles tras 60 minutos de exposición al agente irritante DMSO. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a la solución humectante control sin *Aloe vera* (fórmula base) (media ± SD) ns (no significativo). t de Student para muestras independientes.

Tabla IV.1.- Valores de viabilidad celular de diferentes concentraciones de *Aloe vera* añadidas a un sustituto lagrimal y sus respectivos controles. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a la solución base sin *Aloe vera* (fórmula base) (media \pm SD).

Las comparaciones de efectividad, se realizan sobre la solución base expuesta al agente irritante DMSO (fórmula base + 1% DMSO)

	% VIABILIDAD CELULAR 10 MINUTOS (\pm SD)	P VALOR	% VIABILIDAD CELULAR 60 MINUTOS (\pm SD)	P VALOR
Salina	93.8 \pm 5.5	0.078	103.4 \pm 1.4	<0.001
Fórmula base	100.0 \pm 2.7	<0.05	100.0 \pm 2.6	<0.001
Salina + 1% DMSO	80.0 \pm 3.4	0.995	75.0 \pm 2.3	<0.01
Fórmula base + 1% DMSO	81.9 \pm 2.6	-----	87.0 \pm 1.8	-----
Fórmula base + 0.5% AV + 1% DMSO	61.4 \pm 6.3	<0.01	52.0 \pm 3.3	<0.001
Fórmula base + 1% AV + 1% DMSO	115.8 \pm 1.5	<0.05	89.9 \pm 4.0	0.835
Fórmula base + 2% AV + 1% DMSO	105.9 \pm 2.1	<0.01	64.4 \pm 4.4	<0.001
Fórmula base + 3% AV + 1% DMSO	83.8 \pm 1.7	0.998	35.4 \pm 5.2	<0.001
Fórmula base + 5% AV + 1% DMSO	83.0 \pm 4.2	0.999	23.9 \pm 2.6	<0.001

1.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL CON *ALOE VERA* E HPMC FRENTE AL DE DIFERENTES SUSTITUTOS LAGRIMALES DISPONIBLES EN EL MERCADO

Una vez determinada la concentración de *Aloe vera* más adecuada para la formulación de la solución humectante, se procedió a realizar una comparación frente a diferentes sustitutos lagrimales ya disponibles en el mercado con un uso previsto similar. Los parámetros físico - químicos de las soluciones comerciales utilizadas se encuentran recogidos en la **tabla IV.2.**

Para facilitar la lectura, a partir de este momento el sustituto lagrimal con *Aloe vera* al 1% e HPMC al 0.2% se citará de acuerdo al nombre Drop AV o como solución experimental.

Tabla IV.2.- Parámetros físico-químicos de la solución experimental y de las soluciones comerciales utilizadas en el estudio comparativo del papel protector sobre células de epitelio corneal de conejo de la línea SIRC.

NOMBRE COMERCIAL	COMPOSICIÓN	PH	OSMOLARIDAD	VISCOSIDAD
Drop AV® (AVIZOR)	ALOE VERA 1% + HPMC 0.2%	7.1	270	10
Acuolens® (ALCON)	HPMC 0.3%	7.1	295	7
Artific® (ANGELINI)	HPMC 0.32%	7.1	300	7
Viscofresh 0.5%® (ALLERGAN)	CMC 0.5%	7.4	290	4
Optava Fusion® (ALLERGAN)	HA 0.1% + CMC 0.5%	7.4	315	18
Opticalm Plus® (OMEGA PHARMA)	HA 0.2% + HPMC 0.2%	7.0	310	20
Hyabak® (THEA)	HA 0.15%	6.8	205	3
Lubristil® (ANGELINI)	HA 0.2%	7.2	225	8
Visaid 0.2%® (AVIZOR)	HA 0.2%	7.2	240	15
Visaid 0.3%® (AVIZOR)	HA 0.3%	7.2	200	50
Aquoral® (ESTEVE)	HA 0.4%	6.9	260	40
Systane hidratación® (ALCON)	HA + HP-GUAR + PEG 400 0.4% + PPG 0.3%	7.8	270	20
Systane Ultra® (ALCON)	HP-GUAR + PEG 400 0.4% + PPG 0.3%	7.8	280	10

HPMC – hidroxipropilmetilcelulosa; CMC – carboximetilcelulosa; HA hialuronato sódico; HP-GUAR – hidroxipropilguar; PEG- polietilenglicol; PPG- polipropilenglicol.

Como se puede observar en la **figura IV.3**, casi todos los sustitutos lagrimales presentan un efecto protector en el cultivo celular a los 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO, siendo Drop AV y Viscofresh 0.5%® las que proporcionan mejores resultados. Con ambas soluciones se produce un incremento estadísticamente significativo en los porcentajes de viabilidad celular incluso al realizar la comparación frente al control no irritado ($p < 0.05$).

En el caso de la solución humectante Drop AV el aumento de la viabilidad celular es superior al del resto de sustitutos lagrimales pero sin diferencias estadísticamente significativas frente a Viscofresh 0.5%® ($p > 0.05$). El sustituto lagrimal con el que se observó un peor comportamiento fue Artific®.

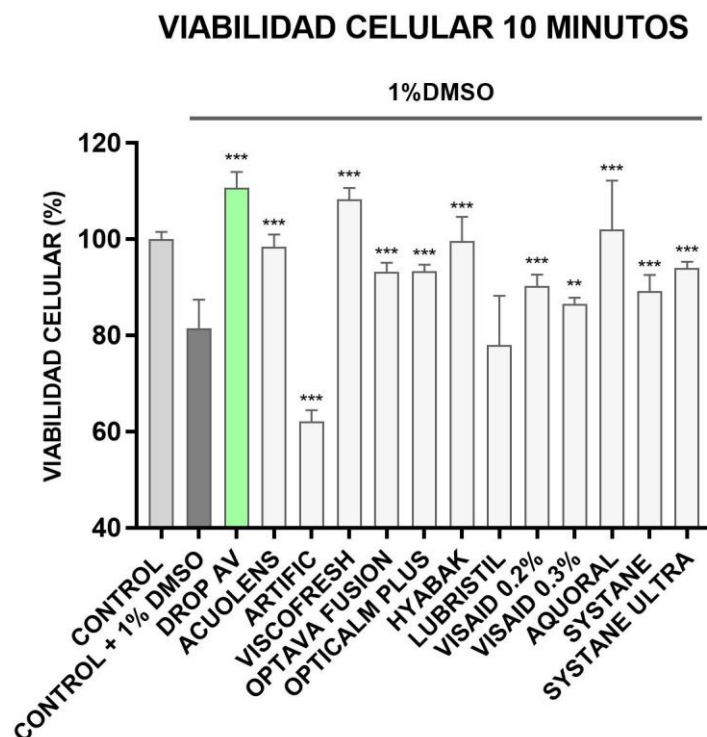


Figura IV.3.- Valores de viabilidad celular tras 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO para cada una de las soluciones comerciales.

El gráfico muestra la viabilidad celular de distintos sustitutos lagrimales comercializados, de la solución con 1% de *Aloe vera* + 0.2% HPMC y de sus respectivos controles tras 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a la solución control sin *Aloe vera* (p valor respecto a CONTROL+ 1% de DMSO) (media \pm SD) ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. t de Student para muestras independientes.

Los hallazgos tras 60 minutos de exposición al agente irritante DMSO, mostraron que Drop AV, Viscofresh 0.5% ® y Acuolens ® presentaban un efecto protector en el cultivo de células epiteliales corneales estadísticamente significativo con respecto al control irritado. En el caso de Drop AV y Viscofresh 0.5% ® se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) incluso al compararlos con el control no irritado. El resto de lágrimas tienen un peor comportamiento llegando incluso a presentar valores por debajo del control irritado como el caso de Artific ® con un porcentaje de viabilidad del 78,3%.

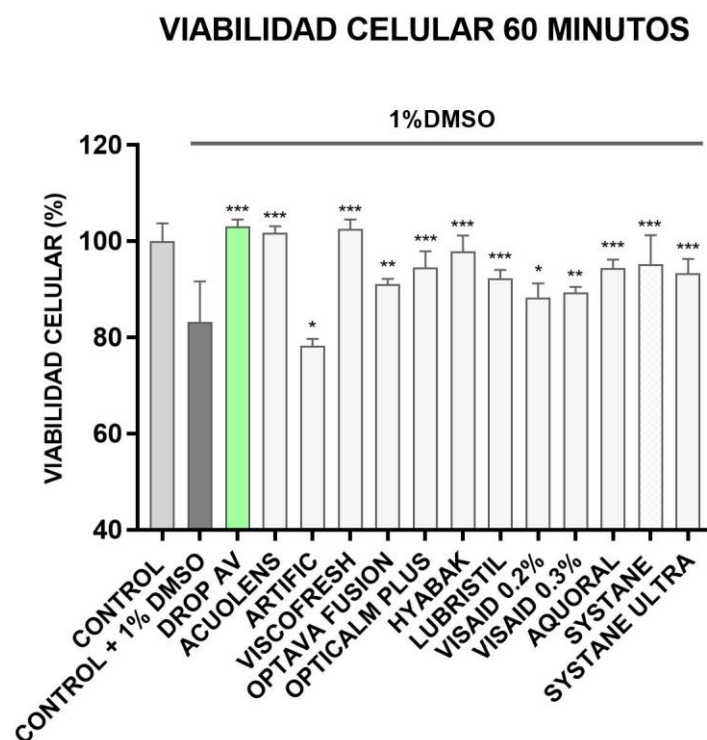


Figura IV.4.- Valores de viabilidad celular tras 60 minutos de exposición al agente irritante DMSO para cada una de las soluciones comerciales.

El gráfico muestra la viabilidad celular de distintos sustitutos lagrimales comercializados, de la solución con 1% de *Aloe vera* + 0.2% HPMC y de sus respectivos controles tras 60 minutos de exposición al agente irritante DMSO. Los valores se expresan como porcentajes con respecto a la solución control sin *Aloe vera* (p valor respecto a CONTROL+ 1% de DMSO) (media ± SD) * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. t de Student para muestras independientes.

Tabla IV.3.- Valores de viabilidad celular a los 10 y 60 minutos para cada una de las soluciones comerciales (p valor respecto a CONTROL + 1% DMSO) (media \pm SD).

NOMBRE COMERCIAL	COMPOSICIÓN	VIABILIDAD 10 MINUTOS (%)	P VALOR	VIABILIDAD 60 MINUTOS (%)	P VALOR
CONTROL	MEM	100 \pm 1.5	-----	100 \pm 3.7	-----
CONTROL + 1% DMSO	MEM + 1% DMSO	81.4 \pm 6.0	-----	83.3 \pm 8.4	-----
Drop AV (AVIZOR)	ALOE VERA 1% + HPMC 0.2%	110.7 \pm 3.3	<0.001	103.1 \pm 1.4	<0.001
Acuolens® (ALCON)	HPMC 0.3%	98.4 \pm 2.5	<0.001	101.7 \pm 1.4	<0.001
Artific® (ANGELINI)	HPMC 0.32%	62.1 \pm 2.4	<0.001	78.3 \pm 1.4	0.026
Viscofresh 0.5%® (ALLERGAN)	CMC 0.5%	108.2 \pm 2.4	<0.001	102.6 \pm 1.9	<0.001
Optava Fusion® (ALLERGAN)	HA 0.1% + CMC 0.5%	93.2 \pm 1.9	<0.001	91.1 \pm 1.1	0.001
Opticalm Plus® (OMEGA PHARMA)	HA 0.2% + HPMC 0.2%	93.3 \pm 1.4	<0.001	94.5 \pm 3.4	<0.001
Hyabak® (THEA)	HA 0.15%	99.7 \pm 5.0	<0.001	97.9 \pm 3.3	<0.001
Lubristil® (ANGELINI)	HA 0.2%	78.0 \pm 10.3	0.245	92.3 \pm 1.7	<0.001
Visaid 0.2%® (AVIZOR)	HA 0.2%	90.3 \pm 2.3	<0.001	88.3 \pm 2.9	0.030
Visaid 0.3%® (AVIZOR)	HA 0.3%	86.6 \pm 1.3	0.002	89.3 \pm 1.2	0.008
Aquoral® (ESTEVE)	HA 0.4%	102.0 \pm 10.2	<0.001	94.4 \pm 1.7	<0.001
Systane hidratación® (ALCON)	HA + HP-GUAR + PEG 400 0.4% + PPG 0.3%	89.3 \pm 3.3	<0.001	95.2 \pm 6.1	<0.001
Systane Ultra® (ALCON)	HP-GUAR + PEG 400 0.4% + PPG 0.3%	94.0 \pm 1.4	<0.001	93.3 \pm 3.0	<0.001

HPMC – hidroxipropilmetilcelulosa; CMC – carboximetilcelulosa; HA hialuronato sódico; HP-GUAR – hidroxipropilguar; PEG- polietilenglicol; PPG- polipropilenglicol.

2. ESTUDIOS *IN VIVO*

2.1 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el estudio de seguridad y eficacia del sustituto lagrimal Drop AV, en el que fueron incluidos un total de 36 pacientes que cumplieron todos los criterios de inclusión mencionados en el apartado de métodos **2.2.1.2**.

2.1.1 FASE I: ESTUDIO DE SEGURIDAD Y EFICACIA A CORTO PLAZO

Todos los resultados obtenidos durante la fase I del estudio de seguridad y eficacia se encuentran resumidos en la **tabla IV.4**.

En términos de comodidad subjetiva (test VAS), el uso de la solución experimental mejoró significativamente los valores de confort 120 minutos después de la instilación.

El incremento observado fue desde valores medios de 69.9 ± 23.2 después de la instilación del agente irritante a 82.9 ± 16.5 tras la instilación de la solución experimental ($p=0.009$). La instilación de la solución control no implicó mejoras estadísticamente significativas ($p=0.130$) en las puntuaciones del test VAS con valores de $66,1 \pm 23,7$ al inicio y de $73,6 \pm 18,0$ tras el uso de la solución.

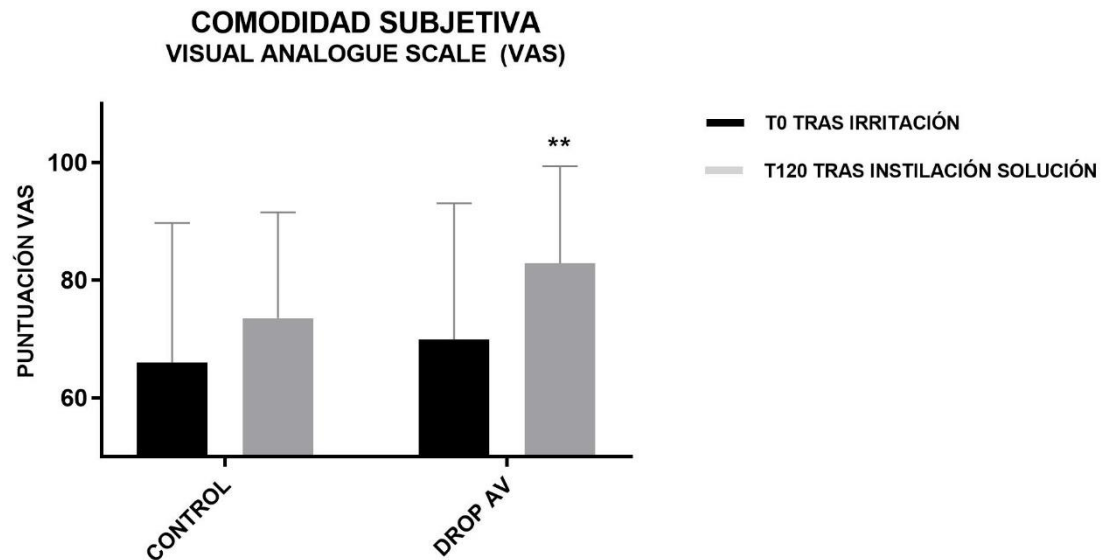
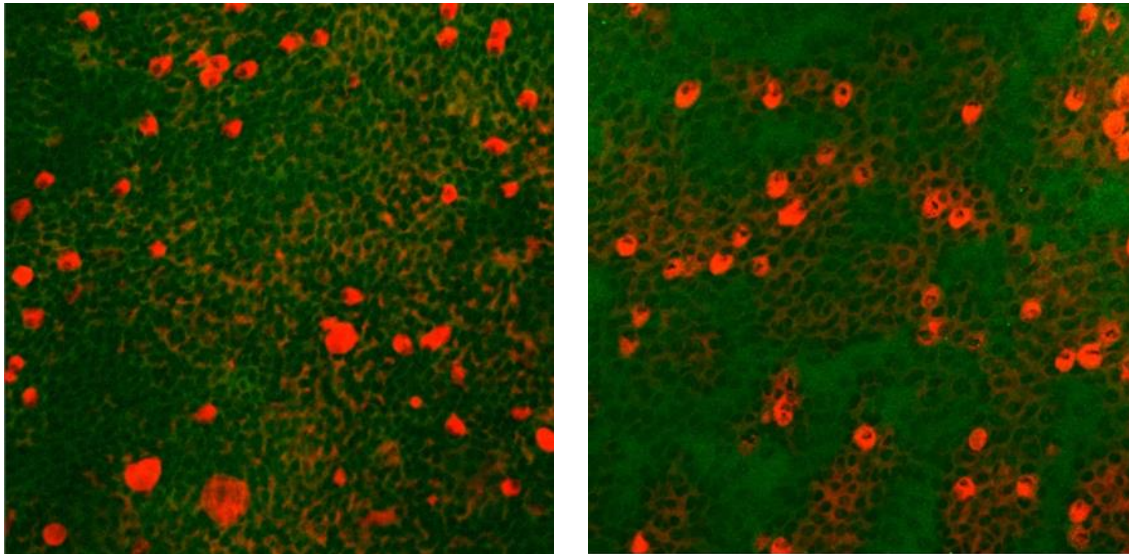


Figura IV.5.- Puntuación de la valoración de la comodidad subjetiva con el test VAS (Visual Analogue Scale).

El gráfico muestra la puntuación del test VAS tras inducir la irritación y 120 minutos después de la instilación de las soluciones control y experimental. ** $p < 0.01$; t de student para muestras pareadas.

Al evaluar la hiperemia conjuntival tras inducir la irritación, no se produjeron variaciones estadísticamente significativas con el uso de ninguna de las soluciones.

Con respecto al análisis de las células caliciformes conjuntivales (células Goblet), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad y espesor celular entre la medida inicial y la medida 120 minutos después de la instilación de ambas soluciones (de 135.8 ± 83.9 cél/mm² a 113.9 ± 63.8 cél/mm² para la solución control y de 171.0 ± 118.2 cél/mm² a 151.3 ± 130.8 cél/mm² para la solución Drop AV).



(a) T=0 tras inducir irritación

(b) 120 minutos tras instilación de la solución experimental

Figura IV.6.- Densidad de células Goblet obtenida con microscopía láser confocal magnificación 20x.

Sin embargo, al evaluar la altura de la nube de mucina, sí se encontró un descenso estadísticamente significativo después de inducir la irritación y de instilar la solución experimental (de $2.7 \pm 1.6 \mu\text{m}$ a $2.4 \pm 1.3 \mu\text{m}$ para la solución control y de $3.0 \pm 1.9 \mu\text{m}$ a $2.1 \pm 1.1 \mu\text{m}$ para la solución Drop AV).

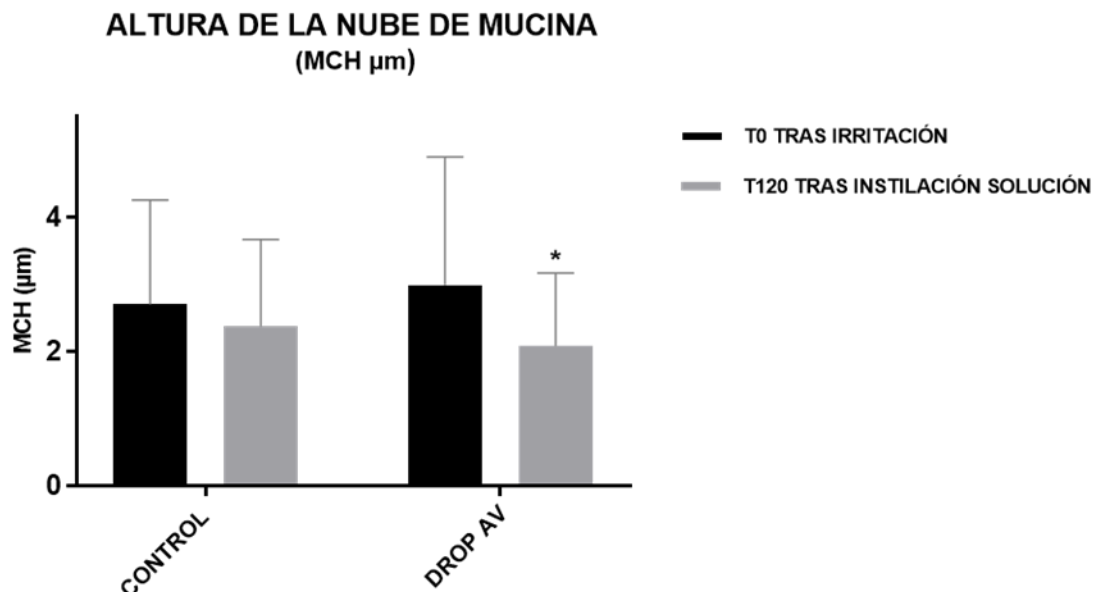


Figura IV.7.- Valores de altura de la nube de mucina (MCH).

El gráfico representa los valores de altura de la nube de mucina (MCH) en μm en la visita previa y después de la irritación una vez transcurridos 120 minutos desde la instilación de ambas soluciones.

* $p < 0.05$. t de student para muestras pareadas.

Al realizar la comparación de los valores de PIO se observó una disminución estadísticamente significativa con la solución control ($p=0.028$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas tras la instilación de la solución experimental ($p=0.217$).

Por otro lado, la extensión de las tinciones corneales mejoró significativamente de valores de 2.4 ± 1.8 a 1.5 ± 1.3 después de la instilación de la solución control y de 2.2 ± 2.0 a 1.4 ± 1.1 después de la instilación de la solución experimental ($p=0.004$ y $p=0.012$ respectivamente).

Para el resto de parámetros evaluados (AV, TFBUT, FO, test de Schirmer y puntuaciones de tinción conjuntival) no se observaron variaciones estadísticamente significativas. Ninguno de los pacientes reportó efectos adversos durante esta fase.

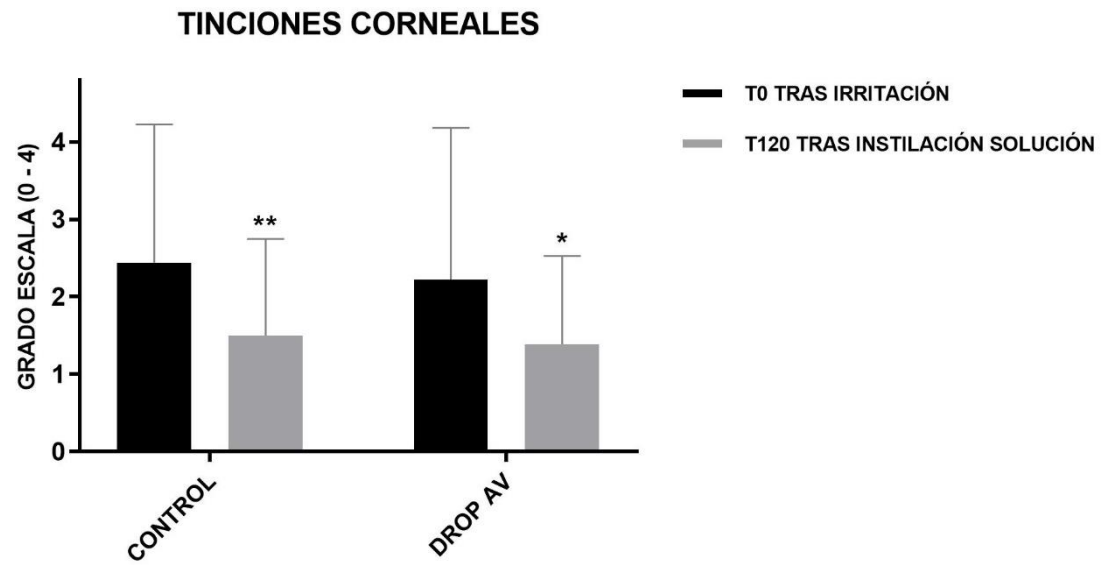


Figura IV.8.- Grado de tinciones corneales.

El gráfico muestra el grado de tinciones corneales en una escala de 0 a 4 (Escala de Efron) tras la irritación y una vez transcurridos 120 minutos desde la instilación de ambas soluciones. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. t de Student para muestras pareadas.

Tabla IV.4.- Resumen de los resultados obtenidos en la Fase I del estudio de seguridad y eficacia (media ± SD).

	VARIABLE	TEST	SOLUCIÓN DROP AV	SOLUCIÓN CONTROL
EFICACIA	Comodidad subjetiva ; (VAS) (unidades; 0 - 100)	Tras irritación	69.9 ± 23.2	66.1 ± 23.7
		Tras instilación solución	82.9 ± 16.5	73.6 ± 18.0
			p=0.009	p=0.130
	Hiperemia conjuntival (unidades; 0 - 4)	H. Bulbar tras irritación	0.8 ± 0.7	0.9 ± 0.6
		H. Bulbar 120 min tras solución	0.6 ± 0.6	0.7 ± 0.6
			p=0.105	p=0.056
		H. Tarsal tras irritación	1.4 ± 0.9	1.3 ± 0.6
		H. Tarsal 120 min tras solución	1.3 ± 0.9	1.2 ± 0.7
		p=0.163	p=0.083	
	Citologías de impresión conjuntival: ▪ Densidad células Globet (GCD) (cel/mm ²) ▪ Altura nube mucina (MCH) (µm) ▪ Espesor de células Goblet (GCT) (µm)	GCD previa	171.0 ± 118.2	135.8 ± 83.9
		GCD 120 min tras solución	151.3 ± 130.8	113.9 ± 63.8
			p=0.498	p=0.230
		MCH previa	3.0 ± 1.9	2.7 ± 1.6
		MCH 120 min tras solución	2.1 ± 1.1	2.4 ± 1.3
			p=0.025	p=0.537
GCT previo		4.9 ± 2.2	4.8 ± 2.2	
GCT 120 minutos tras solución	4.1 ± 1.4	4.7 ± 2.4		
	p=0.123	p=0.974		
SEGURIDAD	Agudeza visual (logMAR)	Tras irritación	-0.05 ± 0.09	-0.02 ± 0.17
		120 min tras solución	-0.04 ± 0.11	-0.03 ± 0.17
			p=0.712	p=0.598
	Presión intraocular (PIO) (mmHg)	Previa	10.6 ± 3.0	12.1 ± 3.9
		120 min tras solución	9.6 ± 2.8	10.9 ± 4.6
			p=0.164	p=0.039
	Tiempo de ruptura lagrimal (TFBUT) (sec)	Tras irritación	7.1 ± 4.7	6.7 ± 4.8
		60 min tras solución	5.8 ± 4.4	5.3 ± 3.4
			p=0.118	p=0.087
		120 min tras solución	5.2 ± 2.5	4.6 ± 1.6
		p=0.060	p=0.068	
	Volumen lagrimal (test de Schirmer) (mm)	Tras irritación	11.7 ± 10.7	15.1 ± 12.0
		120 min tras solución	13.0 ± 10.7	12.4 ± 9.4
			p=0.293	p=0.108
	Tinciones conjuntivales (unidades; 0 - 4)	Tras irritación	1.5 ± 1.6	1.1 ± 1.5
		60 min tras solución	1.4 ± 1.7	0.8 ± 1.2
			p=0.651	p=0.331
		120 min tras solución	1.1 ± 1.4	0.7 ± 1.2
		p=0.119	p=0.210	
	Tinciones corneales (unidades; 0 - 4)	Tras irritación	2.2 ± 2.0	2.4 ± 1.8
		60 min tras solución	1.5 ± 1.3	2.1 ± 1.3
		p=0.008	p=0.202	
120 min tras solución		1.4 ± 1.1	1.5 ± 1.3	
	p=0.012	p= 0.004		

2.1.2 FASE II: ESTUDIO DE SEGURIDAD Y EFICACIA A MEDIO PLAZO

2.1.2.1 VARIABLE PRINCIPAL DE EFICACIA

La variable principal de eficacia de esta fase del estudio fue la variación en la puntuación del test DEQ de las preguntas relacionadas con irritación ocular.

Se observó un descenso estadísticamente significativo en la frecuencia de irritación reportada por los pacientes tras el uso de ambas soluciones durante 1 mes con variaciones de 2.1 ± 0.7 a 1.7 ± 0.9 puntos para la solución control ($p=0.021$) y de 2.0 ± 0.8 a 1.6 ± 0.9 puntos para la solución experimental ($p=0.045$).

Si se desglosa esta intensidad de irritación según el momento del día, se puede observar como no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la pregunta relativa a la intensidad de la irritación durante la mañana para ninguna de las dos soluciones ($p=0.461$ y $p=0.487$ respectivamente).

Sin embargo si se observó un descenso significativo en la puntuación sobre la intensidad de la irritación durante la tarde del DEQ con la solución experimental siendo 2.9 ± 1.0 al inicio y 2.2 ± 1.2 tras un mes de uso ($p=0.045$). En los pacientes que utilizaron la solución control no se encontraron variaciones significativas tras 1 mes de uso con valores de 2.7 ± 1.0 a 2.3 ± 1.4 ($p=0.121$).

El análisis de los resultados antes y después del uso de la solución experimental también mostró un descenso significativo en la valoración del grado de molestia de irritación reportada por los pacientes antes y después del uso de la solución Drop AV con puntuaciones de 3.0 ± 1.3 a 2.5 ± 1.4 ($p=0.045$). En cambio, para la solución control no se observaron diferencias estadísticamente significativas con puntuaciones de 2.9 ± 1.0 a 2.5 ± 1.6 ($p=0.138$).

2.1.2.2 EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DE SEGURIDAD

Los resultados de la medida de las variables de seguridad se encuentran recogidos en la **tabla IV.5**. Las diferencias fueron estadísticamente significativas para la agudeza visual y sensibilidad al contraste para las frecuencias espaciales altas (18 cpg), mejorando ligeramente los resultados después del uso de la solución experimental. Las variaciones en la agudeza visual fueron de -0.04 ± 0.13 al inicio a -0.07 ± 0.14 LogMAR a los 30 días ($p=0.008$) y para la sensibilidad al contraste de 6.8 ± 1.8 a 7.3 ± 1.3 cpg ($p=0.011$).

El volumen y la calidad de la película lagrimal fueron evaluados con el test de Schirmer y a través de la valoración del tiempo de ruptura lagrimal (TFBUT). No se observaron variaciones estadísticamente significativas en el volumen lagrimal con ninguna de las dos soluciones. Sin embargo, los resultados del TFBUT reflejaron un descenso significativo después de 1 mes de uso de la solución experimental, pasando de 6.1 ± 4.6 a 4.9 ± 4.1 segundos ($p=0.038$).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el grado de tinción corneal y conjuntival entre la visita inicial y la final para ninguno de los tratamientos. Al analizar estadísticamente los valores obtenidos para la PIO, se verificó cómo aumentó significativamente de 10.7 ± 3.3 mmHg en la visita inicial a 12.3 ± 4.0 mmHg después de un mes de uso de la solución control ($p=0.042$), sin embargo no se observaron variaciones significativas en los sujetos que utilizaron la solución experimental ($p=0.245$).

La evaluación oftalmoscópica antes y después de un mes utilizando las dos soluciones no reflejó variaciones relevantes. Además no se reportaron efectos adversos durante esta fase.

Tabla IV.5.- Resumen de los resultados obtenidos en la Fase II del estudio de seguridad y eficacia (media ± SD).

	VARIABLE	VISITA INICIAL	VISITA 1 MES	P VALOR	
SOLUCIÓN CONTROL	AV (LogMAR)	-0.06 ± 0.11	-0.07 ± 0.11	p=0.704	
	PIO (mmHg)	10.7 ± 3.3	12.3 ± 4.0	p=0.042	
	VAS (unidades; 0-100)	67.2 ± 22.1	69.8 ± 17.9	p=0.322	
	TFBUT (segundos)	5.6 ± 4.5	5.5 ± 4.7	p=0.730	
	Schirmer (mm)	15.0 ± 9.8	14.9 ± 10.7	p=0.876	
	Tinción conjuntival (unidades; 0-4),	0.7 ± 2.0	0.8 ± 1.3	p=0.716	
	Tinción corneal (unidades; 0-4),	1.4 ± 1.3	0.9 ± 1.0	p=0.147	
	Sensibilidad al contraste	3 cpg	6.1 ± 1.0	6.4 ± 1.2	p=0.360
		6 cpg	6.6 ± 1.2	6.7 ± 1.0	p=0.822
		12 cpg	6.9 ± 1.3	7.2 ± 1.0	p=0.257
18 cpg		6.9 ± 1.2	7.3 ± 1.3	p=0.148	
DROP AV	AV (LogMAR)	-0.04 ± 0.13	-0.07 ± 0.14	p=0.008	
	PIO (mmHg)	11.6 ± 4.1	12.3 ± 3.4	p=0.245	
	VAS (unidades; 0-100)	70.0 ± 22.0	74.4 ± 17.9	p=0.111	
	TFBUT (segundos)	6.1 ± 4.6	4.9 ± 4.1	p=0.038	
	Schirmer (mm)	14.5 ± 10.5	14.6 ± 10.2	p=0.964	
	Tinción conjuntival (unidades; 0-4)	0.9 ± 1.3	1.4 ± 1.3	p=0.209	
	Tinción corneal (unidades; 0-4)	1.8 ± 1.7	1.4 ± 1.3	p=0.189	
	Sensibilidad al contraste	3 cpg	6.1 ± 1.2	6.1 ± 1.0	p=0.917
		6 cpg	6.7 ± 1.3	6.9 ± 1.1	p=0.316
		12 cpg	7.2 ± 1.4	7.3 ± 1.2	p=0.734
18 cpg		6.8 ± 1.8	7.3 ± 1.3	p=0.011	

2.2 EVALUACIÓN DE LA HUMECTACIÓN *IN VIVO* DE LA SUPERFICIE DE LENTES DE CONTACTO

Tras evaluar la seguridad y eficacia del producto, se propuso realizar un estudio comparativo del efecto de la solución experimental frente al de la solución control sobre la humectación de la superficie de lentes de contacto hidrofílicas.

2.2.1 EVALUACIÓN DEL PARÁMETRO TFSQ

2.2.1.1 MEDIA TFSQ

Los valores de la media TFSQ y la desviación estándar con respecto a la medida previa antes de instilar cada una de las soluciones se encuentran representados gráficamente en las **figuras IV.9 y IV.10**.

Se produjo un descenso estadísticamente significativo durante el primer minuto en la media TFSQ para la solución de estudio, tanto con la lente de contacto de hidrogel (ocufilcon D) (**Figura IV.9**) como con la lente de contacto de hidrogel silicona (somofilcon A) ($p < 0.001$) (**Figura IV.10**).

En cambio, cuando se evaluó este mismo parámetro después de la instilación de la solución control, los resultados mostraron el efecto contrario. Se observó una tendencia a la deshumectación de la superficie de la lente de contacto, siendo significativa hasta los 5 minutos ($p = 0.001$) y entre los 20 y los 30 minutos en el caso de la lente de hidrogel ($p < 0.001$) (**Figura IV.9**). En el caso de la lente de hidrogel silicona durante los primeros 3 minutos no se vieron variaciones relevantes, sólo se observó una mejora estadísticamente significativa a los 5 y a los 30 minutos ($p=0.028$ y $p=0.002$ respectivamente) (**Figura IV.10**).

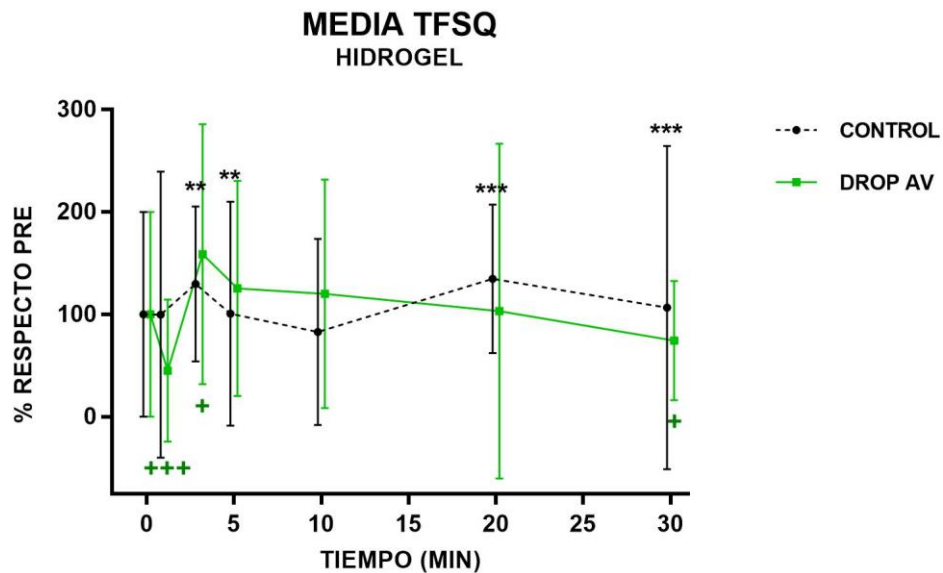


Figura IV.9.- Representación del % de la media TFSQ para la lente de contacto de hidrogel.

El gráfico muestra el % de la media TFSQ para la lente de contacto de hidrogel en cada uno de los tiempos con respecto a los valores basales (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t-Student para muestras pareadas con el objetivo de comparar cada tiempo con la medida basal, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. ** p valor < 0.01; *** p valor < 0.001 para solución control; + p valor < 0.05; +++ p valor < 0.001 para solución Drop AV.

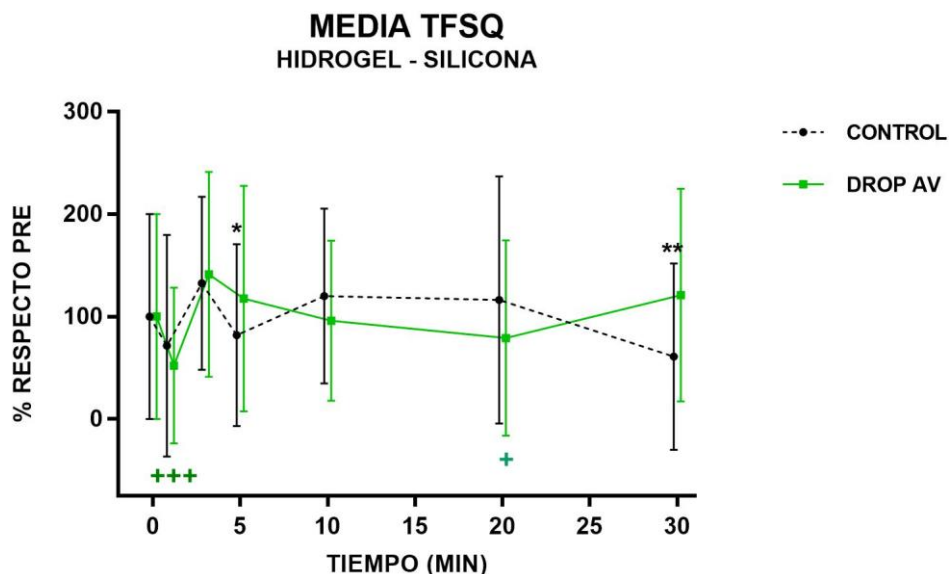


Figura IV.10.- Representación del % de la media TFSQ para la lente de contacto de hidrogel silicona.

El gráfico muestra el % de la media TFSQ para la lente de contacto de hidrogel silicona en cada uno de los tiempos con respecto a los valores basales (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t- Student para muestras pareadas con el objetivo de comparar cada tiempo con la medida basal, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05; ** p valor < 0.01 para solución control; + p valor < 0.05; +++ p valor < 0.001 para solución Drop AV.

2.2.1.2 AREA TFSQ

La valoración del parámetro Área TFSQ y la desviación estándar con respecto a la medida basal antes de instilar cada una de las soluciones se encuentran representados gráficamente en las **figuras IV.11 y IV.12**.

Se observó un descenso estadísticamente significativo en el primer minuto en el parámetro área TFSQ para la solución de estudio, tanto con la lente de contacto de hidrogel (ocufilcon D) (**Figura IV.11**) como con la lente de contacto de hidrogel silicona (somofilcon A) ($p < 0.001$) (**Figura IV.12**).

Cuando se evaluó el efecto sobre este parámetro de la instilación de la solución control, los resultados mostraron una tendencia al aumento del área deshumectada en la lente de hidrogel con diferencias estadísticamente significativas a los 3, 5, 20 y 30 minutos ($p=0.048$; $p=0.001$; $p=0.001$; $p < 0.001$ respectivamente) (**Figura IV.11**). En el

caso de la lente de contacto de hidrogel silicona el efecto de la solución control fue más similar al observado para la solución de estudio, observando únicamente a los 20 minutos pérdida de humectación ($p=0.024$) (Figura IV.12).

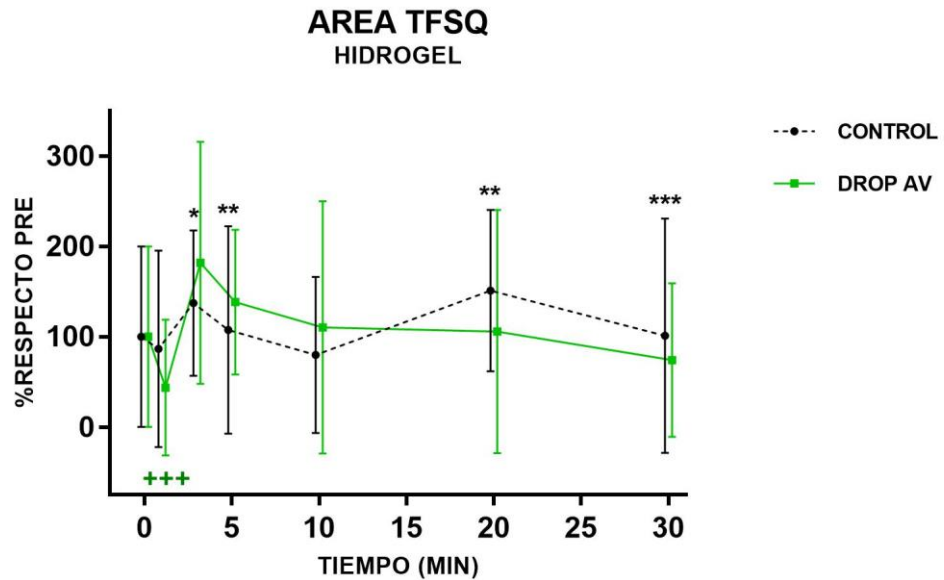


Figura IV.11.- Representación del % de la Área TFSQ para la lente de contacto de hidrogel.

El gráfico muestra el % del Área TFSQ para la lente de contacto de hidrogel en cada uno de los tiempos con respecto a los valores basales (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t- Student para muestras pareadas con el objetivo de comparar cada tiempo con la medida basal, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05; ** p valor < 0.01; *** p valor < 0.001 para solución control; + p valor < 0.05; +++ p valor < 0.001 para solución Drop AV.

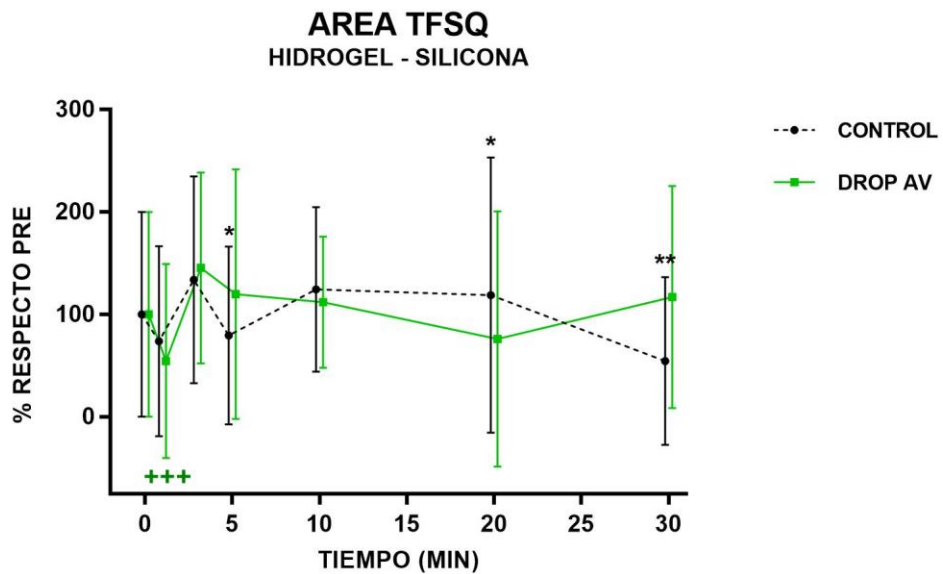


Figura IV.12.- Representación del % del Área TFSQ para la lente de contacto de hidrogel silicona.

El gráfico muestra el % del Área TFSQ para la lente de contacto de hidrogel silicona en cada uno de los tiempos con respecto a los valores basales (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t-Student para muestras pareadas con el objetivo de comparar cada tiempo con la medida basal, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05; ** p valor < 0.01 para solución control; +++ p valor < 0.001 para solución Drop AV.

Los mapas colorimétricos obtenidos durante la valoración de la humectación *in vivo* de la superficie de los dos tipos de lentes de contacto hidrofílicas se encuentran recogidos en la **figura IV.13**.

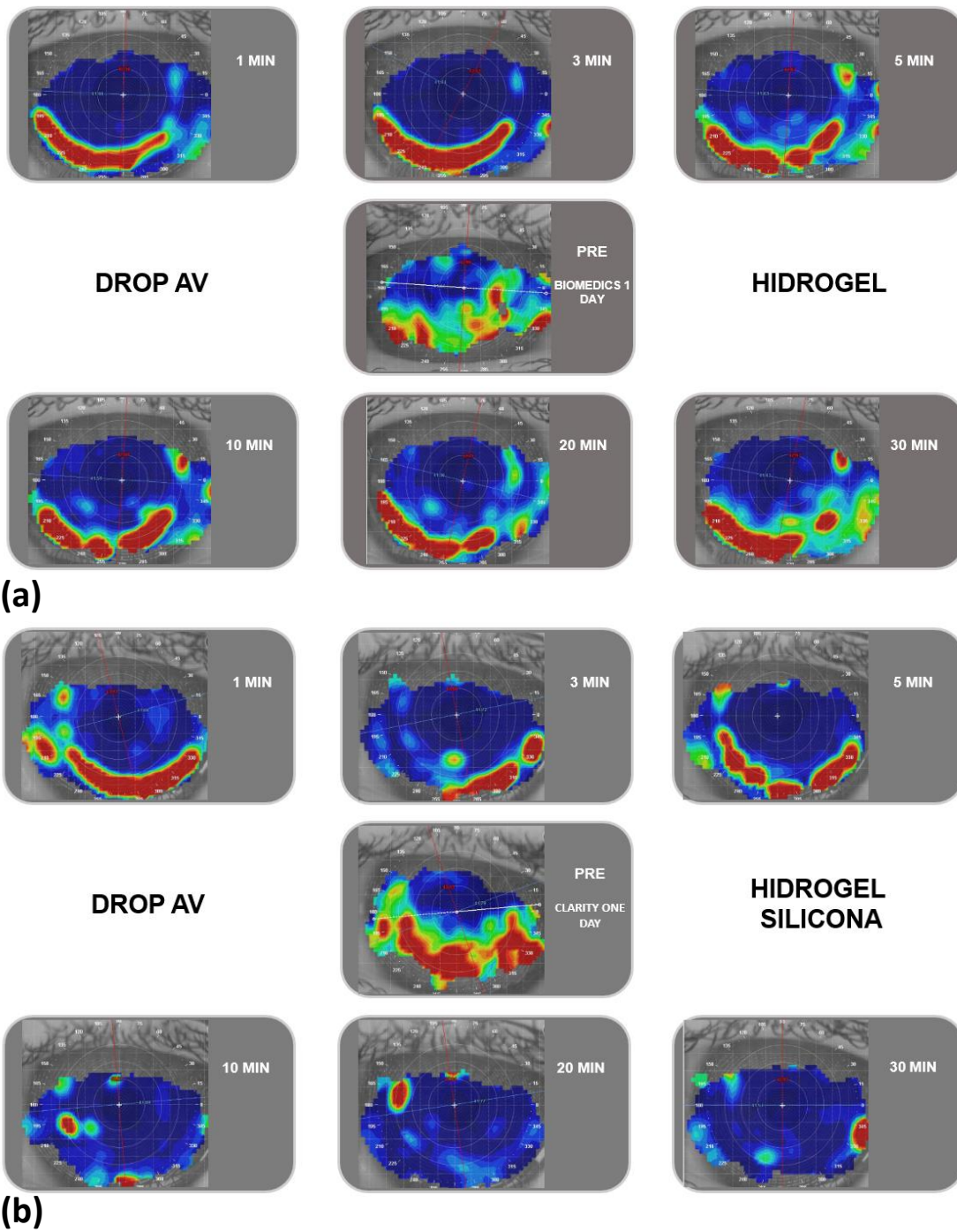


Figura IV.13.- Mapas de color de índice TFSQ tomados en cada uno de los tiempos de análisis con la lente de contacto de hidrogel (a) e hidrogel silicona (b).

2.2.1.3 CUESTIONARIO VAS

La valoración del confort con el test VAS tras la instilación de la solución experimental mostró una mejora estadísticamente significativa desde los 3 hasta los 30 minutos ($p=0.038$; $p=0.049$; $p=0.010$ y $p=0.049$ respectivamente) con la lente de contacto de hidrogel (**Figura IV.14**). Aunque también se observó una tendencia a la mejora con la lente de contacto de hidrogel silicona respecto a los valores previos antes de instilar la solución, la variación sólo fue estadísticamente significativa a los 30 minutos (**Figura IV.15**).

Por el contrario, los resultados tras la instilación de la solución control mostraron un descenso significativo de la comodidad percibida por el paciente entre los 5 y los 20 minutos para la lente de contacto de hidrogel (ocufilcon D) ($p=0.015$; $p=0.031$; $p=0.040$) (**Figura IV.14**) y a los 3 y 10 minutos con la lente de contacto de hidrogel silicona (somofilcon A) ($p=0.026$; $p=0.016$ respectivamente) (**Figura IV.15**).

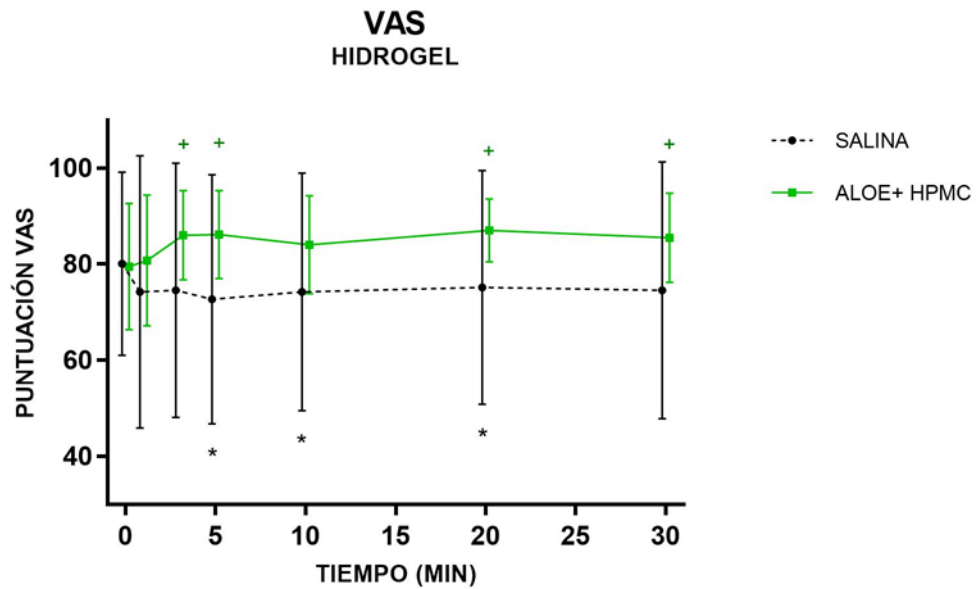


Figura IV.14.- Representación de la puntuación del test VAS para la lente de contacto de hidrogel.

El gráfico representa la puntuación del test VAS antes y después de la instilación de la solución control y de la solución experimental en la lente de contacto de hidrogel (ocufilcon D) (media ± SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t de student para muestras pareadas con el objetivo de comparar la puntuación en cada tiempo con respecto a los valores basales, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05; para solución control; + p valor < 0.05 para solución Drop AV.

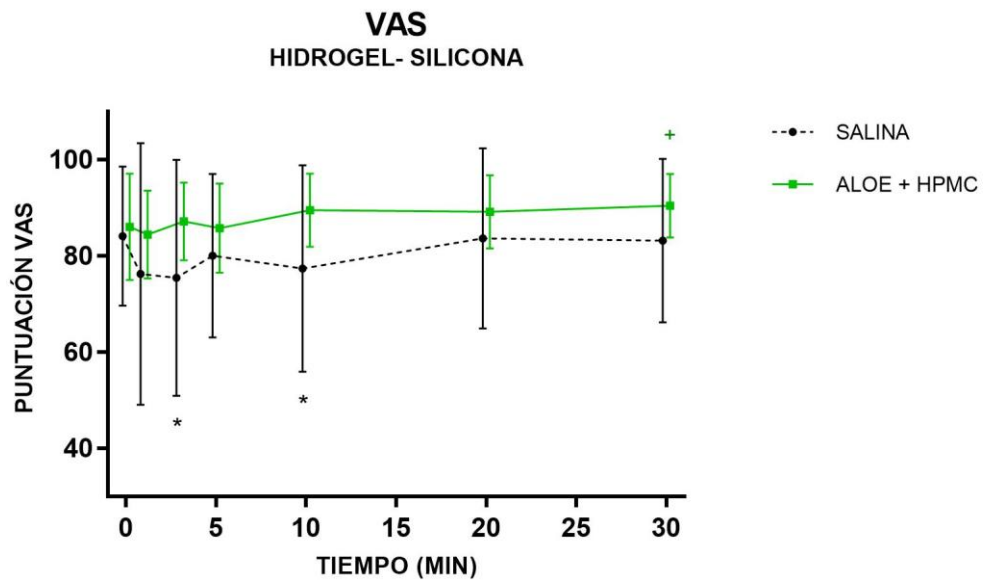


Figura IV.15.- Representación de la puntuación del test VAS para la lente de contacto de hidrogel silicona.

El gráfico representa la puntuación del test VAS antes y después de la instilación de la solución control y de la solución experimental en la lente de contacto de hidrogel silicona (somofilcon A) (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t de student para muestras pareadas con el objetivo de comparar la puntuación en cada tiempo con respecto a los valores basales, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05; para solución control; + p valor < 0.05 para solución Drop AV.

2.2.1.4 AGUDEZA VISUAL

2.2.1.4.1 AGUDEZA VISUAL DE ALTO CONTRASTE

Los resultados de la valoración de la agudeza visual de alto contraste después de la instilación de la solución control mostraron un empeoramiento significativo con la lente de contacto de hidrogel desde los 3 hasta los 20 minutos ($p=0.046$; $p=0.009$; $p=0.001$; $p=0.001$ respectivamente). Sin embargo, no se observaron variaciones estadísticamente significativas tras la instilación de la solución de estudio para ninguno de los tiempos (**Figura IV.16**).

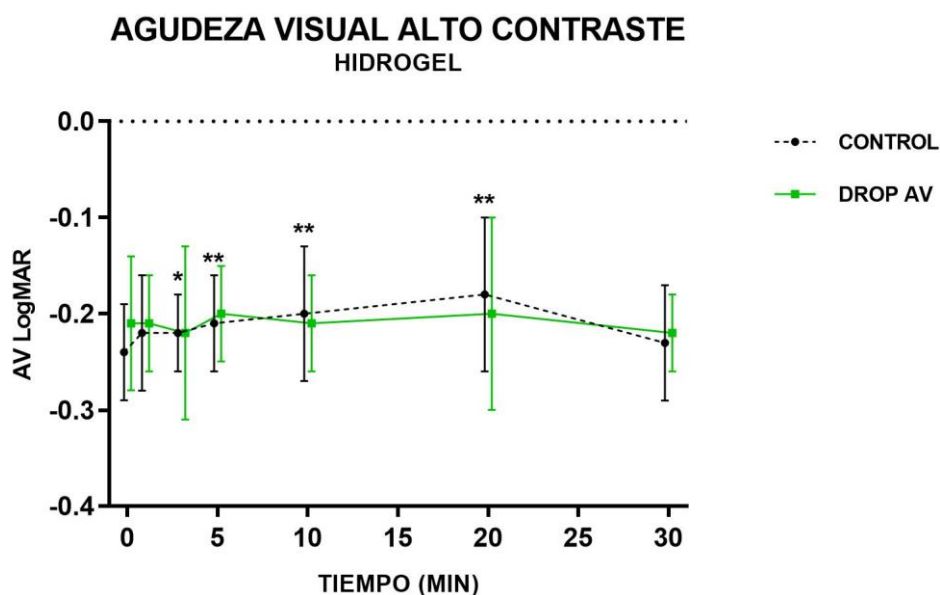


Figura IV.16.- Representación de los valores de agudeza visual de alto contraste para la lente de contacto de hidrogel.

El gráfico muestra los valores de agudeza visual de alto contraste antes y después de la instilación de la solución control y de la solución experimental en la lente de contacto de hidrogel (ocufilcon D) (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t de student para muestras pareadas con el objetivo de comparar los valores en cada tiempo con respecto a los valores basales, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05; ** p valor < 0.01 para solución control; + p valor < 0.05 para solución Drop AV.

En el caso de la lente de contacto de hidrogel silicona aunque si se observó la misma tendencia al empeoramiento tras la instilación de la solución control, las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas a los 30 minutos ($p=0.014$). Cuando se realizó la instilación de la solución experimental sí se observó una ligera mejora en la agudeza visual de alto contraste en los primeros minutos siendo estadísticamente significativa a los 3 minutos ($p=0.011$) (**Figura IV.17**).

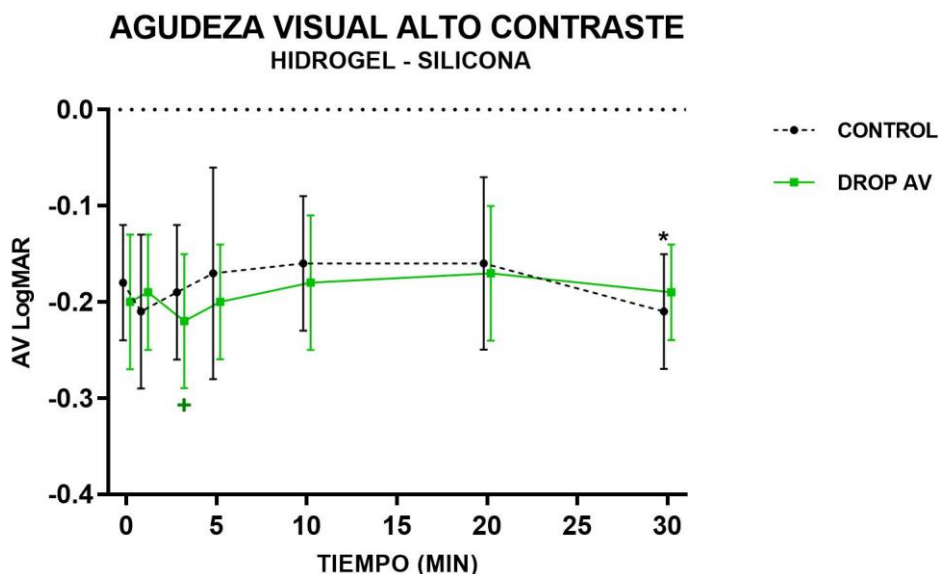


Figura IV.17.- Representación de los valores de agudeza visual de alto contraste para la lente de contacto de hidrogel silicona.

El gráfico representa los valores de agudeza visual de alto contraste antes y después de la instilación de la solución control y de la solución experimental en la lente de contacto de hidrogel silicona (somofilcon A) (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t de student para muestras pareadas con el propósito de comparar los valores en cada tiempo con respecto a los valores basales, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05 para solución control; + p valor < 0.05 para solución Drop AV.

2.2.1.4.2 AGUDEZA VISUAL DE BAJO CONTRASTE

En el caso de la evaluación de los valores de agudeza visual de bajo contraste a diferencia de lo ocurrido para alto contraste, se observó un empeoramiento significativo durante los primeros 5 minutos tras la instilación de la solución experimental con la lente de contacto de hidrogel ($p < 0.001$) (**Figura IV.18**). El comportamiento fue similar para la lente de contacto de hidrogel silicona donde se observaron diferencias estadísticamente significativas tras un minuto ($p = 0.008$) y entre los 10 y 30 minutos ($p = 0.003$; $p = 0.042$; $p < 0.001$) (**Figura IV.19**). En el caso de la solución control sólo se observó un empeoramiento significativo a los 10 minutos para la lente de contacto de hidrogel ($p = 0.019$) (**Figura IV.18**). Y al contrario de lo esperado, tuvo lugar una mejora al minuto y a los 5 minutos de la instilación sobre la lente de contacto de hidrogel silicona ($p = 0.007$; $p = 0.003$ respectivamente) (**Figura IV.19**).

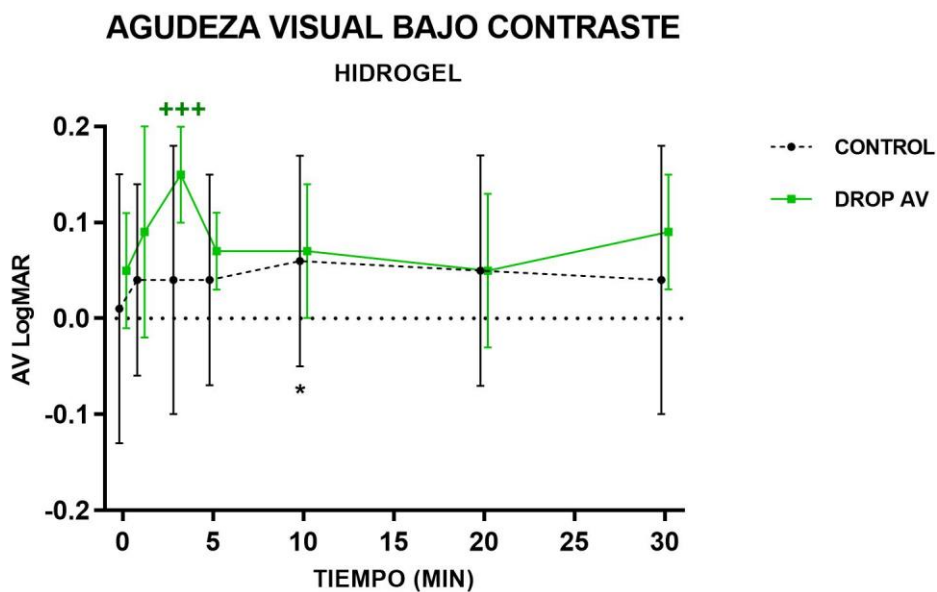


Figura IV.18.- Representación de los valores de agudeza visual de bajo contraste para la lente de contacto de hidrogel.

El gráfico muestra los valores de agudeza visual de bajo contraste antes y después de la instilación de la solución control y de la solución experimental en la lente de contacto de hidrogel (ocufilcon D) (media \pm SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t de student para muestras pareadas con el propósito de comparar los valores en cada tiempo con respecto a los valores basales, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. * p valor < 0.05 para solución control; +++ p valor < 0.001 para solución Drop AV.

AGUDEZA VISUAL BAJO CONTRASTE
HIDROGEL - SILICONA

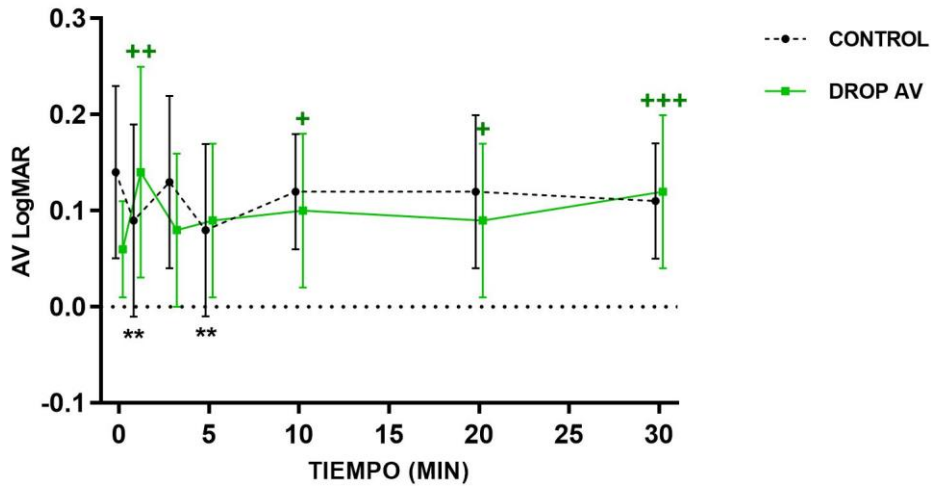


Figura IV.19.- Representación de los valores de agudeza visual de bajo contraste para la lente de contacto de hidrogel silicona.

El gráfico muestra los valores de agudeza visual de bajo contraste antes y después de la instilación de la solución control y de la solución experimental en la lente de contacto de hidrogel silicona (somofilcon A) (media ± SD). Para el cálculo del p valor, se realizó el test t de student para muestras pareadas con el propósito de comparar los valores en cada tiempo con respecto a los valores basales, así como el test ANOVA de una vía para la evaluación de la tendencia en el tiempo para cada solución. ** p valor < 0.01 para solución control; + p valor < 0.05; ++ p valor < 0.01; +++ p valor < 0.001 para solución Drop AV.

2.3 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN LA PELÍCULA LAGRIMAL

Un total de 20 pacientes con sintomatología de sequedad e irritación ocular participaron voluntariamente en el estudio del efecto de la solución experimental sobre la concentración de moléculas pro-inflamatorias en la superficie ocular.

Como se recoge en la **tabla IV.6**, los ojos que fueron tratados con la solución experimental mostraron menos frecuencia en la sensación de irritación y de sequedad después de 1 y 3 meses de tratamiento que los ojos tratados con la solución control ($p < 0.05$).

Tabla IV.6.- Cambios en la frecuencia e intensidad en la sintomatología de sequedad e irritación durante 3 meses de tratamiento con la solución control y la solución experimental. Media \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

PARÁMETRO	SOLUCIÓN	PRE	1 MES	3 MESES	P VALOR
Frecuencia sequedad	Control	2.1 \pm 0.7	2.0 \pm 0.9	1.8 \pm 0.9	p=0.190
	Drop AV	2.4 \pm 0.7	1.9 \pm 0.9	1.6 \pm 0.9	p=0.005
Intensidad sequedad (mañana)	Control	1.7 \pm 1.4	2.1 \pm 1.0	1.8 \pm 1.3	p=0.168
	Drop AV	1.6 \pm 1.2	2.1 \pm 0.9	1.6 \pm 1.1	p=0.557
Intensidad sequedad (tarde)	Control	2.2 \pm 1.4	2.4 \pm 1.3	2.0 \pm 1.2	p=0.246
	Drop AV	2.4 \pm 1.4	2.2 \pm 1.1	1.9 \pm 1.2	p=0.067
Frecuencia irritación	Control	2.1 \pm 1.6	1.8 \pm 0.7	1.7 \pm 0.8	p=0.197
	Drop AV	2.0 \pm 0.8	1.4 \pm 0.7	1.3 \pm 0.7	p=0.01
Intensidad irritación (mañana)	Control	1.2 \pm 0.9	1.9 \pm 1.2	1.9 \pm 1.1	p=0.003
	Drop AV	1.3 \pm 0.8	1.6 \pm 1.2	1.7 \pm 0.9	p=0.127
Intensidad irritación (tarde)	Control	1.7 \pm 1.2	2.3 \pm 1.2	1.8 \pm 1.1	p=0.135
	Drop AV	1.8 \pm 1.1	2.2 \pm 1.0	1.8 \pm 1.1	p=0.479

Tras evaluar los resultados obtenidos para el test de Schirmer no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, si se registró un incremento estadísticamente significativo en el valor del TFBUT de 6.7 ± 2.4 segundos en la visita inicial a 10.5 ± 4.9 segundos en la visita final para el ojo tratado con la solución experimental ($p = 0.002$) (Tabla IV.7).

Tabla IV.7.- Resultados del volumen y estabilidad lagrimal valorados con el test de Schirmer y con el TFBUT para la solución control y la solución experimental (media \pm SD).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

PARÁMETRO	SOLUCIÓN	PRE	1 MES	3 MESES	P VALOR
Test de Schirmer (mm)	Control	15.2 ± 10.8	15.4 ± 9.4	17.4 ± 9.8	0.277
	Drop AV	14.1 ± 9.1	15.0 ± 10.8	15.9 ± 11.4	0.432
TFBUT (segundos)	Control	7.1 ± 1.7	7.5 ± 3.7	8.3 ± 3.2	0.237
	Drop AV	6.7 ± 2.4	8.0 ± 2.4	10.5 ± 4.9	0.002

Finalmente, la evaluación del efecto de las diferentes soluciones sobre la concentración de moléculas pro-inflamatorias MMP-9, IL-1 β e IL-6 en la película lagrimal mostró una disminución estadísticamente significativa para la MMP-9 de 29.9 ± 23.2 a 11.4 ± 13.1 ng/ml ($p=0.002$) después de 1 mes y a 18.2 ± 22.4 ng/ml ($p=0.04$) en la visita final a los 3 meses, en los ojos que recibieron la solución experimental (Figura IV.20). No se observaron cambios significativos para la solución control ($p=0.636$ y $p=0.430$ al mes y a los 3 meses respectivamente).

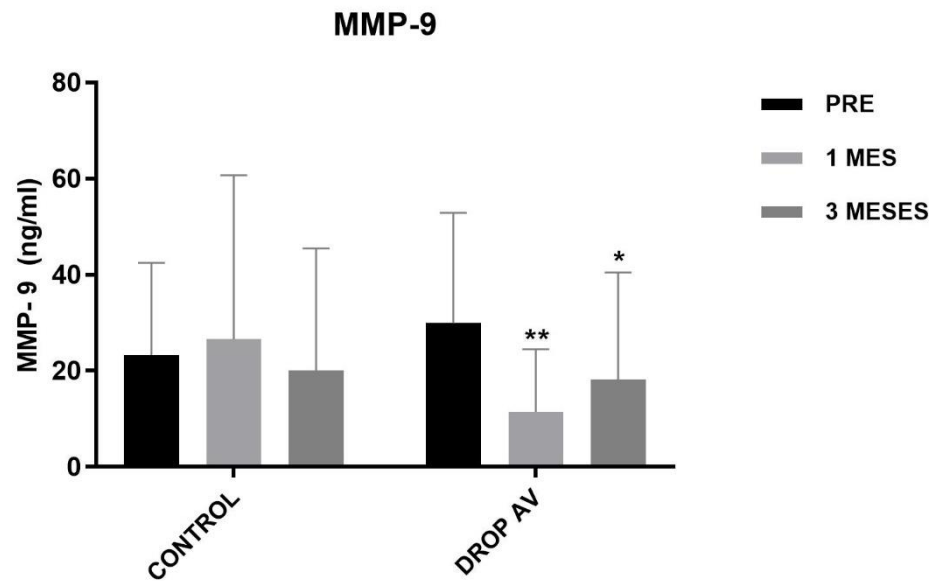


Figura IV.20.- Niveles de metaproteasa de matriz - 9 (MMP-9).

El gráfico muestra los niveles de MMP-9, al inicio, al mes y a los tres meses para la solución control y la solución experimental respectivamente (media \pm SD); * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$. t de Student para muestras pareadas.

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en los niveles de interleuquina -1 β después de cualquiera de los tratamientos en ninguna de las visitas realizadas (visita 1 mes $p = 0.587$ y $p=0.699$; visita 3 meses $p=0.605$ y $p=0.783$ solución experimental y control respectivamente) (**Figura IV.21**).

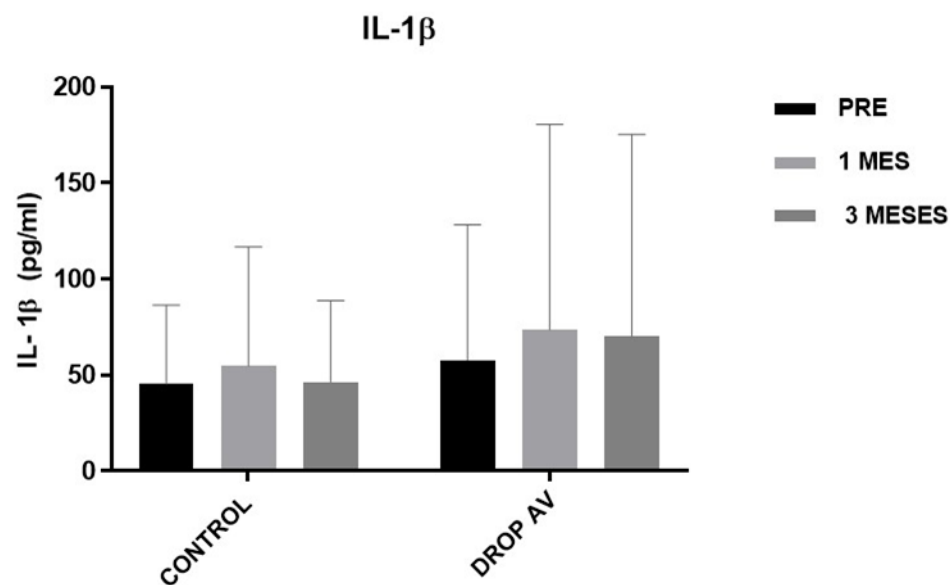


Figura IV.21.- Niveles de interleuquina -1 β (IL-1 β).

El gráfico muestra los niveles de IL-1 β , en la visita inicial, al mes y a los tres meses en la visita final para la solución control y la solución experimental respectivamente (media \pm SD); t de student para muestras pareadas.

Sin embargo, al analizar los niveles medios en la película lagrimal de la interleuquina – 6 se observó un descenso significativo en la visita final para la solución experimental con variaciones de 11.9 ± 13.7 pg/ml a 10.78 ± 10.0 pg/ml después de 1 mes ($p=0.784$) y 4.7 ± 4.4 pg/ml a los 3 meses ($p=0.003$) (**Figura IV.22**).

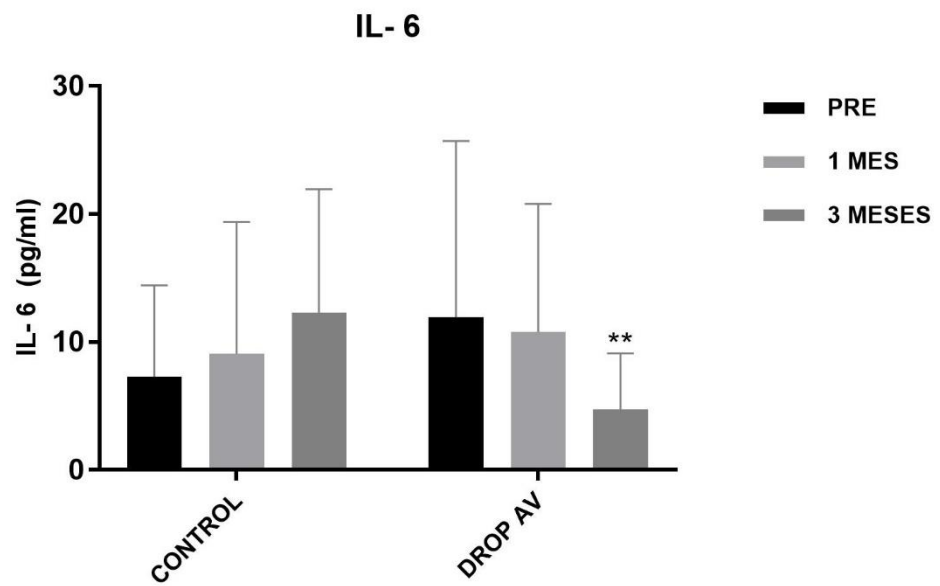


Figura IV.22.- Niveles de interleuquina - 6 (IL-6).

El gráfico representa los niveles de IL-6, en la visita inicial, al mes y a los tres meses para la solución control y la solución experimental respectivamente (media \pm SD);** $p < 0.01$ t de student para muestras pareadas.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El principal objetivo de la presente tesis doctoral ha sido el desarrollo y la evaluación de la seguridad y eficacia de un sustituto lagrimal basado en *Aloe vera* e HPMC. En ella se describen los diferentes estudios realizados *in vitro* con el objetivo de determinar la concentración más efectiva de *Aloe vera* para la protección frente a la irritación ocular e *in vivo* con el objetivo de evaluar la seguridad y eficacia y para la inclusión de nuevas aplicaciones en el uso previsto del producto.

1. ESTUDIOS *IN VITRO*

1.1 EVALUACIÓN DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL BASADO EN ALOE VERA E HPMC SOBRE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL DE LA LÍNEA SIRC

Se diseñaron varias etapas, siendo la primera la valoración de la viabilidad de un cultivo de células de epitelio corneal de la línea SIRC después de añadir soluciones con diferentes concentraciones de extracto de *Aloe vera* y 0.2% de HPMC, para la evaluación del posible efecto protector frente a la irritación ocular. Este ensayo se realizó simulando la instilación de una fórmula base control de características similares a las de sustitutos lagrimales ya comercializados e incorporando concentraciones crecientes de extracto de *Aloe vera*. Una vez añadidas las diferentes fórmulas en los cultivos, se procedió a inducir irritación adicionando una concentración conocida del agente irritante DMSO.

Como se ha descrito con anterioridad, una de las pruebas más extendidas para la evaluación de la citotoxicidad en cultivos celulares es el ensayo colorimétrico MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difenil tetrazolio bromuro. Esta prueba consiste en la evaluación de la viabilidad de un cultivo celular a través de la cuantificación de su actividad metabólica, siendo la señal generada directamente proporcional al número de células viables presentes en el cultivo. Entre los riesgos potenciales en este tipo de ensayos está la falta de correlación entre los resultados observados *in vitro* y lo que

sucede en los modelos *in vivo*. Por tanto para la obtención de una evaluación apropiada uno de los requerimientos fue una selección adecuada de la línea celular a utilizar.

Para la realización de este estudio se seleccionó la línea celular corneal epitelial inmortalizada SIRC. Esta línea celular se utiliza con frecuencia en la realización de ensayos de irritación ocular *in vitro* por su capacidad de perpetuarse indefinidamente (Ayaki et al., 2011; Takahashi et al., 2010, 2008). Además, su uso también ha sido descrito en el estudio de diferentes modelos de cicatrización del epitelio corneal (Mediero et al., 2011).

Las características del epitelio corneal de conejo son muy similares a las del epitelio corneal humano y por tanto la línea celular SIRC es un modelo muy adecuado para extrapolar los resultados observados a lo que sucedería en la superficie ocular de los usuarios después de instilar la solución experimental (Berry and Easty, 1993; Gilbard et al., 1984). Tanto el epitelio corneal de conejo como el epitelio corneal humano están formados por entre 6 y 8 capas de células diferenciadas en tres estratos principales: el más superficial formado por entre 2 y 3 capas de células totalmente diferenciadas, que se encuentran en contacto directo con el fluido lagrimal y son denominadas células superficiales o escamosas, un estrato intermedio con una bicapa de células aladas, denominadas así por las prolongaciones que presentan; y finalmente la monocapa basal o de anclaje que constituye el estrato de metabolismo más activo y está formada por células de morfología columnar en constante división.

En la presente investigación, se evaluó la viabilidad celular con un sustituto lagrimal con diferentes concentraciones de *Aloe vera* tras una exposición al agente irritante DMSO durante 10 y 60 minutos. Los resultados observados confirman lo reportado en investigaciones previas sobre el efecto favorable del *Aloe vera* en la superficie ocular (Mandal et al., 2017; Pinto-Fraga et al., 2015).

El tiempo de residencia de los sustitutos lagrimales en el ojo es limitado debido al continuo intercambio lagrimal que tiene lugar en la superficie ocular. La acción cíclica del parpadeo es el mecanismo principal que facilita el drenaje de la película lagrimal

hacia los canalículos lagrimales (Doane, 1981). Cuando la solución humectante que instilamos tiene una viscosidad similar a la de la película lagrimal, aproximadamente entre 1 – 2 cP (Zhu and Chauhan, 2008), el tiempo de permanencia estimado en la superficie ocular no supera los 5 minutos. Por tanto, los ingredientes incluidos en las formulaciones presentan un tiempo de contacto limitado con las células del epitelio corneal y conjuntival. La inclusión de agentes viscosizantes en la fórmula aumenta ligeramente la viscosidad proporcionando un mayor tiempo de residencia de la solución en la superficie ocular. A fin de incrementar el confort y evitar molestias como la borrosidad, cuando se busca un alivio de la sintomatología de sequedad e irritación leve o moderada, se proponen valores de viscosidad ligeramente superiores a los de la película lagrimal para la mayoría de estos productos.

Para la solución objeto de este estudio se propuso una viscosidad aproximada de 10 cP, por lo que se estimó que el tiempo de permanencia del sustituto lagrimal en la superficie ocular estaría en torno a 10 minutos. Teniendo en cuenta esta información, se consideró que para evaluar la citotoxicidad de la solución simulando un modelo lo más reproducible posible a lo que sucedería en la superficie ocular debíamos observar el efecto a corto plazo justo después de instilar la solución y el efecto a largo plazo, teniendo en cuenta el tiempo máximo de permanencia de restos de ingredientes de la solución en la superficie ocular.

Muchas de las soluciones humectantes presentes en el mercado también están destinadas a ser instiladas en presencia de lentes de contacto. Cuando se instila la solución en la superficie ocular para facilitar la inserción o durante el porte de lentes de contacto de materiales hidrofílicos, la lente actúa como reservorio reteniendo gran parte del volumen entre la cara interna de la lente y la superficie ocular y absorbiendo una parte de la solución instilada. Algunos autores han descrito que las características y el contenido en agua de la lente hacen que el recambio completo de la solución que absorbe se produzca en aproximadamente una hora por lo que el tiempo de residencia en la superficie ocular podría ser más prolongado en este tipo de usuarios (Mann and

Tighe, 2013; Muntz et al., 2015; Paugh et al., 2011). Teniendo en cuenta este fenómeno, se propuso la medida de la viabilidad del cultivo celular a los 60 minutos de exposición para contemplar lo que sucedería cuando el tiempo de residencia de la solución en la superficie ocular es prolongado.

Tras el ensayo, salvo la solución con 0.5% de *Aloe vera*, el resto de concentraciones testadas, mostraron porcentajes de viabilidad celular superiores, en el caso del 1% y 2%, o similares, para el 3% y el 5%, a los que se obtuvieron con el control con el agente irritante DMSO al 1%. Estos resultados indican que a los 10 minutos el porcentaje de *Aloe vera* del 1%, no solo impide la pérdida de viabilidad celular, sino que proporciona un factor de protección, al mejorar la actividad metabólica de las células epiteliales.

Sin embargo, al evaluar la viabilidad celular a los 60 minutos de exposición, los resultados variaron considerablemente. Aunque el patrón de comportamiento fue similar, los porcentajes de viabilidad celular disminuyeron considerablemente para todas las concentraciones ensayadas. En el caso de la concentración del 1% aunque se observó un ligero incremento en torno al 3%, $89.9\% \pm 4.0\%$ frente a $87.0\% \pm 1.8\%$ de viabilidad celular, las diferencias no fueron estadísticamente significativas con respecto a las observadas para la lágrima con 1% de DMSO. Para el resto de concentraciones ensayadas la viabilidad celular disminuyó considerablemente con respecto a lo obtenido para la lágrima sin *Aloe vera* con un 1% de DMSO, con valores por debajo del 65% y alcanzando incluso el 23% de viabilidad celular para la concentración del 5% de *Aloe vera*. Este efecto puede deberse a la ausencia de los componentes básicos de un medio de cultivo necesarios para la supervivencia de las células o a las características que le confiere a la solución la adición de concentraciones superiores del propio extracto. Parece que la concentración del 1% de *Aloe vera* pierde su capacidad protectora a los 60 minutos pero no produce más efectos adversos que la lágrima que no lo incluye.

Como se ha demostrado en estudios previos, el *Aloe vera* no es citóxico para células epiteliales corneales (Green et al., 1996). Si comparamos los resultados

obtenidos con los de otros investigadores, previamente Curto y colaboradores evaluaron el efecto *in vitro* sobre la viabilidad de células epiteliales corneales de diferentes concentraciones de *Aloe vera* así como en la cicatrización y en la modulación de la actividad de la colagenasa. El extracto de *Aloe vera* usado en su estudio es de características similares al utilizado en la fórmula experimental. En dicho estudio, los porcentajes de viabilidad celular reportados fueron desde el 92% al 162% con una media del 110% después de una hora de exposición a las diferentes soluciones con *Aloe vera*. Las concentraciones seleccionadas estuvieron comprendidas en un intervalo entre 0 y 2000 µg/ml, incluyendo valores similares a los que se han utilizado en este estudio. Los valores de viabilidad celular reportados por estos autores permanecieron por encima del 90% después de la incubación con solución de *Aloe vera* en concentraciones de hasta 250 µg/ml lo que está en línea con los resultados reportados en esta investigación (Curto et al., 2014). Por otro lado, investigaciones realizadas por Wozniak y colaboradores no encontraron efectos citotóxicos del *Aloe vera* tras una exposición de 24 horas a extractos fabricados con diferentes alcoholes (etanol, acetato de etilo y heptano). Aunque el tiempo de exposición y el método utilizado para la fabricación del extracto guarda diferencias considerables con el del extracto de *Aloe vera* empleado en este estudio, para todos los casos los porcentajes de viabilidad celular fueron superiores al 85% con concentraciones entre 25 y 125 µg/ml, valores muy similares a los utilizados en la presente investigación (Woźniak and Paduch, 2012).

Además, nuestros resultados están en línea con lo observado en estudios previos realizados por el grupo de investigación, donde se evaluó el efecto citotóxico de soluciones destinadas al mantenimiento de lentes de contacto enriquecidas con diferentes concentraciones de *Aloe vera*, buscando un posible efecto protector sobre la superficie corneal frente a los agentes conservantes (Pintor et al., 2014). Al igual que en esta investigación el estudio reveló que incorporando un 1% de *Aloe vera* a la solución de mantenimiento de lentes de contacto, se produce un incremento significativo en la viabilidad de las células epiteliales corneales sobre los valores sin ningún tratamiento.

A diferencia de lo evaluado en esta investigación, los resultados obtenidos únicamente representan el efecto a los 60 minutos de exposición. Además sólo se observaron efectos citotóxicos tras este período con la concentración del 5% de *Aloe vera*, registrando porcentajes de viabilidad en torno al 60%, muy por debajo de los valores obtenidos para el resto de concentraciones.

Al contrario de lo que ocurre con los sustitutos lagrimales, en las soluciones destinadas al mantenimiento lentes de contacto es necesario que esté presente un agente que actúe como conservante y desinfectante. La toxicidad en este tipo de soluciones suele estar asociada al mecanismo de acción de estos compuestos, que interaccionan con lípidos, proteínas y glucoproteínas presentes en la membrana celular de los microorganismos, pero también sobre las membranas de las células epiteliales humanas (Baudouin et al., 2010b).

Factores como las características físico-químicas del producto, la presencia o ausencia de agentes conservantes y el tiempo de exposición a la formulación intervienen y son clave para evaluar los resultados de citotoxicidad en formulaciones oftálmicas. A diferencia de lo que ocurre en la superficie ocular de los usuarios finales, donde intervienen factores como el sistema de drenaje nasolagrimal, las vías de absorción sistémica y la dilución de los ingredientes de la fórmula con la película lagrimal, en la experimentación *in vitro*, con el uso de cultivos celulares, se elimina la intervención de todos estos procesos simplificando el modelo. Algunos autores consideran que la ausencia de estos elementos en los ensayos *in vitro* puede conducir a una sobreestimación de la toxicidad que se produciría *in vivo*. Por tanto, a pesar de las posibles diferencias entre ambos modelos, los resultados obtenidos *in vitro* constituyen una buena herramienta para predecir la posible toxicidad y garantizar que puede continuar el desarrollo del producto con la comprobación de la seguridad en una investigación clínica con pacientes (Saarinen-Savolainen et al., 1998).

Por otro lado, es necesario resaltar que el modelo que mejor predice lo que ocurre realmente en la superficie ocular está más relacionado con los resultados

obtenidos a los 10 minutos de exposición a las soluciones de estudio que con los resultados observados a los 60 minutos. Si tenemos en cuenta el tiempo de residencia de las soluciones oftálmicas en la superficie ocular del usuario final, en ningún caso, va a sobrepasar los 60 minutos de exposición sin sufrir fenómenos de dilución de los componentes o de drenaje, incluso durante el porte de lentes de contacto. El análisis del efecto a los 60 minutos ha servido para exagerar el contacto de la solución con el tejido de la superficie ocular y obtener un máximo de citotoxicidad en el peor de los casos, es decir, simulando la ausencia de intercambio lagrimal.

De esta forma, los resultados de viabilidad celular al agregar diferentes concentraciones de *Aloe vera* y la aplicación de extracto de *Aloe vera* en la fabricación de soluciones de mantenimiento para lentes de contacto respaldan la tolerancia y el uso de este extracto así como sus propiedades protectoras y anti-irritantes en la superficie ocular. Basándonos en los resultados descritos en este ensayo y en las investigaciones anteriores, se propuso incorporar la concentración de *Aloe vera* del 1% al sustituto lagrimal.

1.2 ESTUDIO COMPARATIVO DEL PAPEL PROTECTOR DE UN SUSTITUTO LAGRIMAL BASADO EN ALOE VERA E HPMC FRENTE AL DE DIFERENTES SUSTITUTOS LAGRIMALES DISPONIBLES EN EL MERCADO

Una vez definida la composición de la solución se planteó como segunda etapa la evaluación comparativa de la viabilidad celular con sustitutos lagrimales ya comercializados. Para ello se seleccionó una muestra representativa de productos con los ingredientes más comunes y un amplio rango de viscosidades y valores de tonicidad. Del mismo modo que en el primer ensayo, para este segundo estudio se planteó la evaluación de la viabilidad celular con la misma línea de células de epitelio corneal de conejo SIRC previamente irritadas con el agente DMSO al 1% y con los mismos tiempos de exposición, 10 y 60 minutos.

En este caso, todos los sustitutos lagrimales, salvo el producto Artific® (con 0.32% de HPMC) y Lubristil® (con hialuronato sódico al 0.2%) presentaron un efecto

protector en el cultivo celular tras 10 minutos de exposición. La solución objeto de este estudio basada en *Aloe vera* al 1% e HPMC al 0.2% y la solución con CMC al 0.5% como ingrediente activo fueron las que obtuvieron mejores resultados.

En línea con estos hallazgos, un estudio previo comparativo en el que se utilizaron soluciones con diferentes concentraciones de hialuronato sódico (entre 0.3% y 0.1%) frente a una solución con la misma concentración de CMC que la empleada en esta investigación (0.5%) han mostrado la baja toxicidad de ambos compuestos pero han puesto de manifiesto la superioridad de la CMC cuando se evalúa su efecto sobre la cicatrización y la viabilidad en células epiteliales corneales humanas (Lee et al., 2015). Este efecto puede estar relacionado con la alta concentración y/o el peso molecular de los ingredientes incluidos en ambas soluciones.

Además de los ingredientes activos principales incluidos en la fórmula, los sustitutos lagrimales, contienen varias sustancias que actúan como excipientes, algunas de las cuales pueden producir efectos adversos sobre la superficie ocular, como conservantes, agentes quelantes o componentes del sistema utilizado como *buffer* (Sanchez et al., 2010). Al ser la solución en fase de investigación un producto libre de conservantes, para evitar posibles sesgos en este aspecto, todos los sustitutos lagrimales incluidos en el estudio comparativo, fueron seleccionados teniendo en cuenta esta característica. Investigaciones previas de Geerling y colaboradores analizaron el efecto de sustitutos lagrimales con concentraciones de 0.3% de HPMC con y sin conservantes sobre cultivos primarios de células de epitelio corneal. Sus resultados mostraron que las soluciones de HPMC con conservantes producían una toxicidad mayor que el mismo producto libre de conservantes (Geerling et al., 2001). Sin embargo, no sólo son importantes factores como las propiedades de los polímeros o la presencia o no de conservantes en las soluciones. Otro de los aspectos a tener en cuenta de la fórmula de sustitutos lagrimales son los agentes incluidos para fijar el valor de tonicidad en la solución (Sanchez et al., 2010). La inclusión de electrolitos esenciales en las

formulaciones, con el objetivo de mimetizar la composición de la película lagrimal humana tiene un impacto relevante sobre la función de las células de la superficie ocular.

La presencia de resultados tan dispares entre soluciones con concentraciones similares de agentes humectantes puede deberse a varios motivos. Por un lado, aunque la concentración indicada del ingrediente activo sea la misma, es muy probable que existan variaciones considerables en el peso molecular de los biopolímeros usados en cada una de las soluciones. Esta característica es de especial relevancia y no suele estar indicada en la información disponible de este tipo de productos, sino que son más comunes las referencias a la concentración. Variaciones en el peso molecular de los ingredientes activos manteniendo la misma concentración pueden producir efectos muy diferentes en la viscosidad en función de la solución testada. Por otro lado, la tendencia a la fragmentación de las moléculas de mucopolisacáridos como el hialuronato sódico con el tiempo es mucho más común que en derivados de la celulosa como la HPMC o la CMC. Aunque la literatura científica muestra mejores propiedades mucomiméticas y bioadhesivas para el hialuronato sódico, la estabilidad en el tiempo y la firmeza de las biopelículas que forma este ingrediente sobre la superficie ocular es menor que la de polímeros como la HPMC o la CMC (Bielory and Wagle, 2017; Johnson et al., 2006).

Al igual que la solución en fase de investigación, tanto la fórmula de HPMC al 0.3% (Acuolens®) como el otro producto incluido en el estudio con un porcentaje de 0.2% de hialuronato sódico (Visaid 0.2%®) mostraron valores de viabilidad celular superiores a los de Artific® y Lubristil® pese a tener concentraciones similares de ingredientes activos. Este efecto puede deberse, como hemos descrito anteriormente a diferencias en el peso molecular de los biopolímeros y/o a la inclusión de iones como Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^{+} , Zn^{+2} en las fórmulas con mejores resultados, al ser necesaria su presencia para el correcto desarrollo de los procesos metabólicos de las células del epitelio corneal (Bachman and Wilson, 1985; O'leary et al., 1985; Wilson et al., 1986).

Nuestros resultados están en línea con los obtenidos previamente por Corrales y colaboradores sobre la toxicidad de sustitutos lagrimales sin conservantes en cultivos

de células epiteliales conjuntivales. Sus hallazgos también han mostrado que aquellas formulaciones que contienen un balance electrolítico óptimo con iones como Ca^{+2} , Mg^{+2} y K^{+} además de NaCl producen menos toxicidad que las que solo incluyen NaCl independientemente del ingrediente activo utilizado (Corrales et al., 2001).

Los sustitutos lagrimales a menudo son empleados como la primera opción para el tratamiento para la sintomatología de sequedad e irritación ocular (Gayton, 2009; Jones et al., 2017). Estas preparaciones están destinadas a ser administradas varias veces al día con el objetivo de suavizar los síntomas por lo que a la hora de proponer una fórmula para este fin es necesario tener en cuenta una serie de características que garanticen su eficacia y seguridad en el tejido ocular del usuario final (Versura et al., 1989).

Un sustituto lagrimal ideal debe poder distribuirse de forma rápida y eficiente sobre la superficie ocular y debe minimizar la fricción entre la conjuntiva palpebral y los epitelios corneal y conjuntival (Kessing, 1967). Además es necesario que contenga ingredientes biocompatibles con el tejido al que están destinados.

Existe un amplio abanico de ingredientes activos o macromoléculas incluidas en las formulaciones de sustitutos lagrimales que pueden ejercer estas funciones, actuando como agentes mucomiméticos, lubricantes y/o humectantes.

Los ensayos realizados *in vitro* en la presente tesis doctoral, han puesto de manifiesto que la adición de un porcentaje del 1% de *Aloe vera* sobre una base de 0.2% de HPMC es la más eficaz en el mantenimiento de los valores de viabilidad celular, después de inducir irritación en un cultivo de células epiteliales corneales de la línea SIRC. Estos resultados respaldan la buena tolerancia de la solución de estudio en el epitelio corneal en condiciones simuladas de irritación, e incluso ponen de manifiesto efecto protector, al reflejar valores de viabilidad celular a los 10 minutos, por encima de los controles sin irritar.

Previamente Wozniak y colaboradores, con el propósito de evaluar la utilidad de un extracto de *Aloe vera*, incluido en soluciones oftálmicas analizaron *in vitro* la

morfología, funcionalidad y viabilidad de una capa celular corneal expuesta a estrés químico. Sus experimentos revelaron que este extracto no resultaba tóxico incluso a concentraciones elevadas por lo que en línea con nuestros resultados, expusieron que su uso podría ser seguro en pacientes. Es necesario tener en cuenta que el extracto de *Aloe vera* incluido en la solución experimental presenta características diferentes a las de los extractos utilizados en el estudio de estos autores. Mientras que la obtención de la materia prima incluida en nuestra fórmula, se realiza con métodos de deshidratación a baja temperatura, para los diferentes extractos empleados por Wozniak y colaboradores se utilizaron métodos de extracción en los que se incluyeron otro tipo de solventes (Woźniak and Paduch, 2012). El uso de diferentes procesos de extracción para el *Aloe vera*, hace que los ingredientes utilizados en los diferentes estudios puedan presentar perfiles de composición muy diversos. Éste ha sido uno de los principales motivos para plantear la evaluación del comportamiento *in vitro* tras la instilación de la solución experimental. Además otros estudios como el de Burgalassi y colaboradores también han señalado que soluciones oftálmicas en las que se incluye *Aloe vera*, serían apropiadas para aliviar la sintomatología de sequedad ocular (Burgalassi et al., 2005).

2. ESTUDIOS *IN VIVO*

2.1 EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y EFICACIA

Teniendo en cuenta lo descrito y una vez comprobada la tolerancia *in vitro* de la solución de estudio, se planteó la realización de ensayos *in vivo* para monitorizar el comportamiento de la fórmula en pacientes. En este sentido el objetivo del siguiente estudio fue la evaluación de la seguridad y eficacia de la solución de *Aloe vera* e HPMC en pacientes con sintomatología de sequedad e irritación ocular. Entre los propósitos planteados además de la confirmación del perfil de seguridad de la solución cuando fue instilada en pacientes, estuvo la valoración de un posible efecto protector de la superficie ocular frente a la irritación y a la desecación, así como un posible alivio de la sintomatología reportada en este tipo de pacientes.

Las propiedades humectantes de los extractos de *Aloe vera* han sido ampliamente descritas en la literatura científica (Surjushe et al., 2008). La mayor parte de su actividad biológica está atribuida a la presencia de mono y polisacáridos como el Acemanano, poco frecuente en otras especies de plantas y con propiedades higroscópicas (Dal’Belo et al., 2006). Se ha descrito que estos compuestos podrían ser los responsables de un incremento en la síntesis de colágeno y de la estimulación de una mayor tasa de reepitelización. Estos efectos, unidos a las propiedades anti-inflamatorias, antimicrobianas e inmunomoduladoras del *Aloe vera*, lo convierten en un ingrediente muy interesante para este propósito.

La fórmula propuesta incluye además HPMC, una macromolécula hidrofílica con alta capacidad de hidratación y propiedades viscosizantes y mucomiméticas, empleada tradicionalmente en la formulación de soluciones oftálmicas para aumentar la biodisponibilidad de principios activos en la superficie ocular. Además del uso de este compuesto en soluciones oftálmicas, también se ha descrito su eficacia como terapia convencional para estabilizar la película lagrimal y prolongar el tiempo de ruptura cuando se incorpora en la composición de insertos oftálmicos para el tratamiento de la sequedad ocular (Nguyen and Latkany, 2011).

Un tiempo de permanencia elevado de la solución depende entre otros factores de la viscosidad, lo que va ligado en gran medida a la concentración incluida en la fórmula de este polímero. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el incremento de los valores de viscosidad en las soluciones oftálmicas puede disminuir la tolerancia de los usuarios, causando molestias e interferencias en la visión. Estudios realizados *in vitro* han descrito que concentraciones entre 0.2% y 0.4% de HPMC proporcionan una viscosidad adecuada para soluciones destinadas al alivio de la sintomatología de sequedad ocular (Liu et al., 2009). Cuando los usuarios presentan sequedad ocular moderada – severa como puede ser el caso de la asociada a síndrome de Sjögren, la concentración eficaz propuesta para conseguir una cobertura de larga duración se eleva hasta el 0.5% de HPMC según investigaciones previas (Toda et al., 1996). Y es en estos

casos, en los que el grado de afectación de la superficie ocular y los síntomas son más severos, en los cuales los pacientes suelen reportar mejor tolerancia a viscosidades más elevadas.

Otra de las ventajas descritas de la HPMC es que la medida de los parámetros biofísicos de las soluciones que contienen este compuesto como ingrediente principal revela mejor estabilidad que las que contienen hialuronato sódico cuando se analizan después de un tiempo de almacenamiento. Este efecto, puede deberse a naturaleza semisintética de estos compuestos frente a la tendencia natural de las moléculas de hialuronato sódico a descomponerse en fragmentos más pequeños, conduciendo a pérdida de la viscosidad y por tanto de la efectividad de las soluciones.

Con el objetivo de evaluar la seguridad y eficacia en usuarios finales del sustituto lagrimal basado en *Aloe vera* e HPMC, se planteó una investigación clínica aleatorizada, doble enmascarada y cruzada de 3 meses de duración. En una primera fase del estudio se observó el comportamiento de las soluciones a corto plazo después de inducir irritación y en una segunda fase los pacientes utilizaron durante 30 días ambas soluciones estableciendo un periodo de lavado de al menos 15 días entre el uso de cada una de ellas.

Los datos obtenidos en esta investigación sugieren que la solución de estudio presenta un perfil de seguridad muy similar al de la solución control seleccionada. Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio reportó efectos adversos graves ni se observaron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las variables de seguridad con respecto a los valores obtenidos con la solución control.

No se esperaban variaciones en los valores de presión intraocular tras el uso de ninguna de las dos soluciones. Sin embargo, aunque no fueron clínicamente relevantes por encontrarse dentro de valores normales, si se observaron variaciones significativas con el uso de la solución control que no se produjeron con la solución experimental en ambas fases del estudio. Este resultado, más que con un efecto de la solución control, podría tener que ver con la propia variabilidad diurna de la presión intraocular y por lo

tanto con la hora del día en que se realizó la medida (Jaén-Díaz et al., 2007; Wilensky, 1991).

La técnica de citología de impresión conjuntival empleada se seleccionó porque proporciona un método mínimamente invasivo, que permite valorar de forma muy exhaustiva la aparición de trastornos del epitelio conjuntival. Investigaciones previas han demostrado la sensibilidad de la población de células Goblet conjuntivales como indicador prematuro en alteraciones de la superficie ocular (Adams et al., 1988; Albietz and Bruce, 2001; Kinoshita et al., 1983). Por esta razón se ha convertido en uno de los parámetros más importantes para la monitorización de los efectos de diferentes tratamientos.

Durante la fase I del estudio de seguridad y eficacia, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad y espesor de las células Goblet conjuntivales después de la instilación de la solución de estudio, lo que se encuentra en línea con los hallazgos de estudios anteriores. Previamente Lester y Orsoni mostraron una mejora significativa en las puntuaciones de los parámetros evaluados mediante citología de impresión para los usuarios que utilizaron hialuronato sódico al 0.4% pero no observaron cambios cuando se utilizó HPMC al 0.3% (Lester et al., 2000).

Por otro lado Pflugfelder y colaboradores mostraron que el efecto de un sustituto lagrimal libre de conservantes, con un contenido en electrolitos esenciales similar y un agente viscosizante de la familia de los derivados de la celulosa, como el incluido en la solución experimental tampoco produjo variaciones en la densidad de las células caliciformes conjuntivales (Pflugfelder et al., 2008). Aunque el porcentaje del ingrediente utilizado como viscosizante fue mayor que el de la solución utilizada en este estudio características como la ausencia de conservantes en la fórmula fueron comunes en ambos productos. Los hallazgos observados tanto por estos autores como en la presente investigación, sugieren que para poder observar una mejora sería necesario un tratamiento capaz de inhibir los mecanismos patológicos involucrados en la

disminución de la densidad de células Goblet. El uso exclusivo de sustitutos lagrimales en pacientes que muestran un perfil alterado de las células mucosecretoras, podría ser insuficiente para recuperar valores normales, pero serviría para evitar más pérdida celular bajo condiciones de irritación.

Se ha descrito que la presencia de conservantes en los sustitutos lagrimales produce una exacerbación de la pérdida de células Goblet y puede generar procesos inflamatorios asociados a su toxicidad. En los últimos años, la evolución en este tipo de tratamientos ha ido dirigida hacia la búsqueda de compuestos de baja toxicidad o a su total eliminación (Jee et al., 2014; Jones et al., 2017).

En este sentido, la selección de estrategias terapéuticas en pacientes con sintomatología de sequedad y/o irritación ocular debe centrarse en formatos libres de conservantes como el utilizado en la solución experimental, que garanticen el control de los procesos inflamatorios y el mantenimiento de las células mucosecretoras evitando una desestabilización mayor de la película lagrimal. No se han observado efectos adversos significativos asociados a la instilación de tratamientos tópicos sin conservantes tanto con pautas de dosificación moderadas como con instilaciones más reiteradas (Adams et al., 1992; Berdy et al., 1992). Investigaciones como la Albietz y Bruce han mostrado que la aplicación de sustitutos lagrimales sin conservantes no produce cambios significativos en la densidad de células Goblet. Sin embargo, cuando estos mismos autores utilizaron soluciones formuladas con estos compuestos si observaron un empeoramiento en el contaje. Entre las principales conclusiones de su estudio establecen que las formulaciones sin conservantes serían la mejor alternativa incluso en casos de sequedad ocular leve-moderada (Albietz and Bruce, 2001). El motivo que exponen va asociado a que el efecto de una instilación reiterada de conservantes podría provocar una progresión en la enfermedad de los casos más leves y ser contraproducente.

Teniendo en cuenta lo descrito y con el objetivo de evitar todas las complicaciones asociadas a una instilación reiterada, uno de los primeros

planteamientos para la solución de estudio fue la ausencia de conservantes en la fórmula. Y como se esperaba, el efecto a corto plazo después de la instilación resultó totalmente inocuo.

La presente investigación, no tuvo como objetivo conseguir ni se esperaba encontrar una mejora significativa en los valores de densidad y espesor de las células caliciformes, sino que se utilizó esta prueba para monitorizar y asegurar la compatibilidad con el tejido justo después de inducir irritación y de instilar la solución experimental. El hallazgo de una disminución significativa de la altura de la nube de mucina tras la instilación de la solución experimental puede deberse a mecanismos compensatorios. Al ser una solución con mayor viscosidad que la de la película lagrimal y presentar propiedades mucomiméticas similares a las de las mucinas por la incorporación del *Aloe vera* y la HPMC a la fórmula, el anclaje de la lágrima al epitelio puede favorecer que sea necesaria una menor secreción por parte de las células caliciformes. Son necesarios más estudios para esclarecer a qué se debe este resultado.

En términos de eficacia, nuestros hallazgos proporcionan suficiente evidencia del alivio de la sintomatología asociada a irritación ocular al instilar la solución de estudio. Para la evaluación de este aspecto, durante la Fase I, se indujo irritación a los pacientes y se evaluó la satisfacción y el estado de la superficie ocular de los usuarios dos horas después de la instilación de ambas soluciones. Los resultados del cuestionario VAS mostraron un aumento estadísticamente significativo de la puntuación con la solución experimental basada en *Aloe vera* e HPMC.

La evaluación del grado de tinción corneal, una vez inducida la irritación y tras la instilación de ambas soluciones reveló un descenso en ambos grupos, que fue significativo a los 60 y a los 120 minutos después de la instilación de *Aloe vera* e HPMC y a los 120 minutos de la instilación de la solución control. La diferencia en el resultado puede estar relacionada con el efecto humectante del *Aloe vera* y la HPMC, mientras

que en la superficie ocular irritada de los pacientes que recibieron la solución control es necesario el doble de tiempo para observar un descenso significativo.

En línea con estudios previos realizados (Miyake et al., 2016), aunque se esperaba un incremento en la medida del volumen lagrimal con la prueba de Schirmer, los resultados no difirieron significativamente para ninguno de los grupos en ninguna de las 2 fases del estudio de seguridad y eficacia. El aumento del volumen lagrimal tras el uso de soluciones humectantes tiene lugar inmediatamente después de la instilación o después de un período corto de tiempo y está directamente relacionado con el tiempo de residencia de la solución en la superficie ocular. Aunque se esperaba una diferencia significativa, es posible que el aumento máximo para este parámetro tuviera lugar mucho antes de la medida establecida en la fase I a los 120 minutos. A pesar de no encontrar significancia en los resultados, sí se observó una ligera tendencia al aumento del volumen con la solución de estudio y una ligera tendencia al descenso con la solución control. Investigaciones previas de Carracedo y colaboradores no observaron variaciones significativas al evaluar el volumen lagrimal 30 minutos después de la instilación de sustitutos lagrimales con diferentes concentraciones de hialuronato sódico (Carracedo et al., 2019). Aunque las diferencias entre los ingredientes incluidos en las fórmulas de cada una de las investigaciones son notables, los valores de viscosidad de la solución empleada en este estudio se encontrarían en un punto intermedio entre los de las soluciones con 0.1 % y 0.2% de hialuronato sódico utilizadas en su investigación. Asumiendo esto podemos estimar que incluso las variaciones más importantes del volumen lagrimal con nuestra solución se habrían producido en los primeros 30 minutos después de la instilación.

Los resultados del presente estudio revelaron una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de la sintomatología de irritación tanto con la solución de estudio como con la solución control. Si bien no se observaron diferencias en lo reportado por los pacientes para las cuestiones relativas a la intensidad por las mañanas, cuando se evaluaron las respuestas para el grado de molestia e intensidad

de la sintomatología por las tardes si se obtuvieron mejores resultados con la solución experimental. Las variaciones diurnas descritas en la película lagrimal podrían ser las responsables de la fluctuación en las puntuaciones de sintomatología (Tomlinson and Khanal, 2005). Algunos autores sostienen que estos cambios a lo largo del día y su progresión podrían estar relacionados con condiciones de exposición acusada de la superficie ocular. Estudios experimentales previos (Begley et al., 2002) han mostrado que la sintomatología de irritación en pacientes con ojo seco acuodeficiente, valorada con el mismo cuestionario de sintomatología, es más acusada y a menudo incrementa su intensidad en las últimas horas del día. Este resultado se encuentra en línea con lo observado en esta memoria, dónde las mayores puntuaciones fueron las referidas a la intensidad de la irritación por la tarde.

Los sustitutos lagrimales están destinados a un alivio transitorio de los síntomas por lo que el mecanismo de acción está basado en la captación y retención de agua y en la formación de escudos protectores transitorios cuando tienen lugar alteraciones de la película lagrimal bien por ausencia en la secreción, por un incremento en la tasa de evaporación o por la exposición a agentes irritantes de todo tipo.

La mejora de la sintomatología durante las primeras horas del día, suele estar relacionada con la prescripción de tratamientos farmacológicos que consiguen un efecto prolongado, asociado a un incremento en la tasa de secreción lagrimal o a una reducción en la respuesta inflamatoria de la superficie ocular.

Una de las principales limitaciones de los sustitutos lagrimales es el breve tiempo de permanencia sobre la superficie ocular. Su acción está relacionada con mecanismos físicos de retención de agua, por lo que el efecto desaparece en cuanto se completa el drenaje de los componentes de la fórmula. El hecho de que solo se observaran diferencias estadísticamente significativas en el alivio de la sintomatología por la tarde puede deberse a la instilación reiterada de la solución a lo largo del día y por tanto a una sensación de alivio que se hace más evidente en las últimas horas.

Otro de los posibles beneficios de la instilación de sustitutos lagrimales es la influencia directa sobre la función visual (Berger et al., 2009). Investigaciones anteriores han resaltado la importancia de una película lagrimal precorneal estable para el mantenimiento de una buena calidad óptica (Rieger, 1993).

El uso del sustituto lagrimal evaluado en este estudio, ha demostrado un incremento estadísticamente significativo en los valores de agudeza visual y en la sensibilidad al contraste para las frecuencias espaciales altas de los pacientes, lo que evidencia una mejora en la función visual en cuanto a calidad y detalle de las imágenes. Estos resultados se ajustan a lo que cabría esperar de una solución humectante con una viscosidad ligeramente superior a la de la película lagrimal. Al aumentar el tiempo de permanencia en la superficie ocular los cambios en la función visual producidos por las alteraciones en la estabilidad de la lágrima no se hacen tan evidentes. Soluciones con rangos de viscosidad mayores sí pueden disminuir el rendimiento visual de los sujetos llegando a reportar empeoramiento en la calidad visual sobre todo justo después de la instilación (Ridder et al., 2005b).

En línea con lo observado en el presente estudio, más investigadores han descrito mejoras significativas en los valores de agudeza visual y sensibilidad al contraste tras la instilación de sustitutos lagrimales. En general han atribuido este efecto a una posible recuperación del daño existente en el epitelio corneal o a la compensación de alteraciones en la composición y en el grosor de la película lagrimal (Rieger, 1993; Rolando et al., 1998; Torok, 1985).

Este resultado podría haber estado relacionado con una recuperación en el grado de tinciones corneales y en el tiempo de ruptura lagrimal, sin embargo a diferencia de lo observado durante la fase I del estudio, no se obtuvieron mejoras estadísticamente significativas para ninguno de los dos parámetros en la fase II del estudio. La falta de correlación en este caso puede deberse a la leve afectación de la superficie ocular de los pacientes así como al tiempo transcurrido desde la última instilación.

Si bien el uso de HPMC en productos oftálmicos está ampliamente establecido, en lo referente a otras aplicaciones de extractos de *Aloe vera* a nivel ocular, la literatura científica revela un caso en el que se seleccionó como una de las modalidades de tratamiento primario para Neoplasia escamosa de la superficie ocular en el que no se reportaron efectos adversos (Damani et al., 2015). Aunque este tipo de condición no está estrictamente ligado a la irritación ocular, el uso seguro del *Aloe vera* en otras alteraciones de la superficie ocular avala los resultados de seguridad obtenidos en el presente estudio. En general tanto los hallazgos *in vitro* como lo observado *in vivo* respaldan nuestra hipótesis inicial de la seguridad de un sustituto lagrimal que incluye en su fórmula *Aloe vera* e HPMC.

Pinto – Fraga y colaboradores demostraron en estudios experimentales previos realizados en usuarios de lentes de contacto hidrofílicas la seguridad y eficacia de una solución de mantenimiento que incluyó el mismo porcentaje de *Aloe vera* que el incluido en la solución experimental. En este caso se combinó con polivinilpirrolidona, un polímero sintético con propiedades surfactantes, de baja viscosidad y con un tiempo de permanencia inferior al de mucílagos como la HPMC (Pinto-Fraga et al., 2015). Aunque el volumen, la forma en que alcanza la superficie ocular y el uso previsto de la solución investigada por estos autores es diferente a la del producto bajo investigación en esta memoria, en términos de seguridad del porcentaje de *Aloe vera* incluido en la solución experimental, sus hallazgos son consistentes con los resultados encontrados en este estudio. Las lentes hidrofílicas en general presentan un alto contenido en agua. Tras su colocación en la superficie ocular, la cantidad de solución de mantenimiento que ha absorbido durante el proceso de desinfección empieza a difundir y a ser reemplazada por la película lagrimal. De esta forma el volumen de solución, y por tanto de los ingredientes incluidos en ella, que alcanza la superficie ocular tras la colocación de la lente de contacto, es muy inferior a la que entra en contacto con el ojo cuando se realiza la instilación directa de un sustituto lagrimal. Además, la diferencia de los valores de viscosidad entre las soluciones de mantenimiento y los sustitutos lagrimales hace que

el tiempo de contacto con los ingredientes sea considerablemente mayor en este último caso.

La seguridad y eficacia reportada previamente en la literatura científica sobre las soluciones de HPMC en alteraciones de la superficie ocular también fueron básicas en esta investigación. Se ha descrito que el uso de soluciones oftálmicas basadas en HPMC en combinación con polisacáridos como el dextrano facilita la recuperación del daño de la superficie ocular y la irritación producida por los conservantes incluidos en fármacos anti-glaucomatosos (Prabhasawat et al., 2015).

En esta investigación, se ha demostrado que el sustituto lagrimal basado en *Aloe vera* e HPMC es bien tolerado y proporciona alivio en pacientes con sintomatología de sequedad e irritación ocular después de 30 días de uso continuado.

Entre las potenciales limitaciones de este estudio está la falta de subclasificación entre pacientes. Se incluyeron pacientes con sintomatología de sequedad e irritación ocular sin ninguna diferenciación en cuanto a la etiología de la alteración. Son necesarios más estudios para identificar si existen diferencias en términos de eficacia de la solución si consideramos orígenes diferentes de la sintomatología de irritación. Además es necesario resaltar que el efecto observado se debe a una acción combinada del producto final formulado con un extracto de *Aloe vera* y con el agente viscosizante HPMC. Por tanto los resultados mostrados sólo servirían para respaldar la seguridad y eficacia de un sustituto lagrimal con la combinación de estos dos ingredientes.

2.2 EVALUACIÓN DE LA HUMECTACIÓN *IN VIVO* DE LA SUPERFICIE DE LENTES DE CONTACTO

El porte de lentes de contacto es uno de los elementos con más influencia en la calidad de la película lagrimal. En el momento en que se inserta una lente en la superficie ocular, la película lagrimal se divide en dos fases bien diferenciadas, la película lagrimal pre-lente y la película lagrimal post-lente o pre-corneal (Chen et al., 2010; Craig et al., 2013a; Nichols and King-Smith, 2003).

Uno de los factores más críticos para el mantenimiento del confort durante el porte de lentes de contacto es la humectabilidad. Este parámetro depende esencialmente de la interacción de la película lagrimal pre-lente con el material de la lente de contacto (Guillon et al., 2016). La fase pre-lente es la más expuesta, al formar la interfaz entre el aire y la superficie anterior de la lente. Su menor espesor, en comparación con el de la película lagrimal post-lente, predispone al fluido lagrimal a una desestabilización más rápida. En este sentido, numerosos estudios han descrito un incremento en la tasa de evaporación y en la reducción del tiempo de ruptura lagrimal en usuarios de lentes de contacto (Guillon and Maissa, 2008; Sindt and Longmuir, 2007).

Aunque en los últimos años se han desarrollado diferentes tratamientos para la superficie de las lentes de contacto, con el objetivo de aumentar las propiedades hidrofílicas de los materiales, la ausencia de mucinas de anclaje en la fase pre-lente y su menor espesor con respecto al fluido lagrimal pre-corneal, provocan una desestabilización más rápida, favoreciendo la aparición temprana de zonas de ruptura o desecación (Berry et al., 2008; King-Smith et al., 2004).

La principal función de la película lagrimal tanto en presencia como en ausencia de lentes de contacto es favorecer la lubricación y disminuir las fuerzas de fricción durante el parpadeo, ya sea contra la superficie ocular o contra la superficie de las lentes. Por esta razón, la instilación de sustitutos lagrimales es una de las prácticas más habituales para incrementar la comodidad de los usuarios y evitar el daño en la superficie ocular producido por la ausencia o déficit de lubricación.

Con el objetivo de demostrar esta nueva aplicación del producto y de poder incluir en el uso previsto del sustituto lagrimal la humectación y lubricación de lentes de contacto, se planteó una investigación clínica post-comercialización para evaluar la humectación *in vivo* en usuarios de lentes de contacto hidrofílicas tras la instilación del sustituto lagrimal basado en *Aloe vera* e HPMC.

El método tradicional para la evaluación de la calidad de la película lagrimal es una prueba ampliamente establecida en la práctica clínica, basada en la instilación de

fluoresceína en la superficie ocular (Lemp, 1973). Sin embargo, algunos autores reflejan que entre sus limitaciones está su alta variabilidad y que no constituye una prueba totalmente libre de contacto (Elliott et al., 1998; Trees and Tomlinson, 1990). Se ha descrito que la instilación de fluoresceína, necesaria para realizar la prueba, produce un aumento del volumen total y por tanto podría alterar la estabilidad del fluido lagrimal y dar lugar a resultados sesgados (Johnson and Murphy, 2005). Además algunos estudios sostienen que antes de la aparición de las zonas de desecación visibles para el evaluador, la película lagrimal ya podría estar desestabilizada (Llorens-Quintana and Iskander, 2018).

Por otro lado, el uso de fluoresceína es apto para evaluar la calidad de la película lagrimal pre-lente con materiales rígidos permeables al gas pero la absorción del colorante por la matriz de los materiales hidrofílicos hace que no sea un método válido en este otro tipo de lentes de contacto.

Debido a estos inconvenientes, en los últimos años la tendencia ha ido dirigida hacia el uso de pruebas no invasivas, en las que no sea necesario el contacto o la instilación de compuestos en la superficie ocular. Entre las técnicas no invasivas descritas para la evaluación de la película lagrimal, está la valoración del parámetro TFSQ, un método basado en la videoqueratoscopia de alta velocidad que permite analizar alteraciones en el fluido lagrimal a través de los cambios observados en la calidad de imágenes videoqueratoscópicas (Iskander et al., 2005).

Esta técnica ha mostrado buenos resultados para la evaluación de la calidad de la película lagrimal pre-lente durante el uso de lentes de contacto (Szczesna et al., 2010). Tyagi y colaboradores han descrito la influencia negativa del uso de lentes de contacto en este parámetro, sin embargo, las diferencias observadas entre diferentes tipos y materiales no han sido significativas. Por consiguiente este efecto sería atribuible tanto al porte de lentes de contacto hidrofílicas como de lentes rígidas permeables al gas (Tyagi et al., 2012).

Hasta la fecha no se han reportado estudios sobre la humectación de la superficie de lentes de contacto tras la instilación de sustitutos lagrimales a través de la medida del parámetro TFSQ. En este sentido, el objetivo principal de esta investigación ha sido evaluar el efecto a corto plazo de la instilación de un sustituto lagrimal basado en *Aloe vera* e hidroxipropilmetilcelulosa sobre lentes de contacto hidrofílicas.

Los valores obtenidos del parámetro media TFSQ mostraron un descenso significativo en el minuto inicial con la solución experimental para ambos tipos de lentes de contacto hidrofílicas, que se mantuvo hasta los 3 minutos en el caso de la lente de hidrogel-silicona, mientras que se observó una tendencia a la deshumectación con el uso de la solución control. En el caso de la valoración del parámetro área TFSQ, también se observó un descenso inicial en el porcentaje del área deshumectada de la superficie de la lente de contacto tras la instilación de la solución experimental. Sin embargo, y a diferencia de lo observado con la media TFSQ, la valoración del área TFSQ en el material de hidrogel silicona, reflejó un efecto de la solución control muy similar al de la solución experimental.

Características como el contenido en agua y la carga iónica tienen una gran influencia en la deshidratación de los diferentes materiales de lentes de contacto (Ramamoorthy et al., 2010). Estudios previos han mostrado que los materiales de alto contenido en agua y carga iónica experimentan una mayor deshidratación cuando se comparan con los materiales de bajo contenido en agua no iónicos (Nichols and Sinnott, 2006; Wallace-Tucker, 2012). Además sostienen que la comodidad inicial observada en este tipo de lentes desciende con el tiempo por este efecto (Hall et al., 1999) (Lemp et al., 1999). Nuestros resultados se encuentran en línea con esta idea y han mostrado que la instilación de la solución experimental es especialmente beneficiosa cuando se realiza sobre lentes de contacto de hidrogel de estas características.

El análisis de la satisfacción del usuario antes y después de la instilación de la solución experimental mostró una tendencia a la mejora para ambos tipos de materiales, sin embargo, sólo fue significativa para el material de hidrogel. Por otro lado, y como se

esperaba, la instilación de la solución control reflejó una disminución significativa en ambos casos. Estos resultados coinciden con lo observado para el parámetro TFSQ y refuerzan la idea del efecto positivo de la instilación de la solución experimental principalmente en lentes de contacto de hidrogel.

Además de la valoración de la humectación y la satisfacción del usuario, en este estudio se analizó la influencia de la instilación de la solución humectante sobre la agudeza visual. Estudios previos han descrito que la reducción de la calidad óptica que tiene lugar en pacientes con sintomatología de sequedad ocular se debe a la estructura irregular de la propia película lagrimal, por lo que uno de los efectos esperados después de la instilación de soluciones humectantes es la mejora de la función visual (Montés-Micó, 2007).

La mayoría de los sustitutos lagrimales tienen como objetivo principal prolongar el alivio de la sintomatología y lo hacen gracias a valores de viscosidad más elevados que los de la película lagrimal. Sin embargo, si la viscosidad es demasiado alta, la instilación puede producir cierto grado de borrosidad y por tanto variaciones importantes en los valores de agudeza visual de los usuarios que deben quedar reflejados como advertencia en las instrucciones de uso del producto (Nilforoushan et al., 2005).

En esta investigación no se produjeron cambios significativos en la agudeza visual de alto contraste tras la instilación de la solución experimental sobre la lente de contacto de hidrogel. Solamente se registró una mejora significativa a los 3 minutos después de la instilación sobre la lente de contacto de hidrogel silicona. Al contrario de lo que ocurrió para alto contraste, cuando se evaluaron los cambios en la agudeza visual de bajo contraste, sí se detectó un empeoramiento inmediatamente después de la instilación, con una reducción significativa durante los 3 minutos iniciales con ambos tipos de lentes, respecto a lo observado para la solución control. Este empeoramiento fue transitorio, recuperando los valores iniciales previos a la instilación a los 5 minutos, y las variaciones tanto para la agudeza visual de alto como de bajo contraste no fueron muy marcadas estando en torno a 0.10 unidades de AV LogMAR.

Aunque algunos autores han descrito que la sensibilidad al contraste en pacientes con ojo seco mejora con el uso de sustitutos lagrimales, es necesario tener en cuenta que, características como la viscosidad de la solución y el tiempo que tarda en repartirse uniformemente sobre la superficie ocular, pueden producir al inicio el efecto contrario (Akin et al., 2006).

Lo observado en este estudio para la solución experimental coincide con lo descrito por investigaciones anteriores, donde se ha puesto de manifiesto que justo después de la instilación, los sustitutos lagrimales pueden afectar de forma negativa a la sensibilidad al contraste. Del mismo modo, estos estudios han descrito que la desaparición del efecto es gradual y relativamente rápida (Montés-Micó et al., 2010; Ridder et al., 2009, 2005a).

Huang y colaboradores estudiaron la influencia sobre la agudeza visual de alto contraste de un sustituto lagrimal con 0.32% de HPMC y a diferencia de lo observado en esta investigación, sólo vieron mejoras en la función visual en pacientes con la superficie ocular afectada (Huang et al., 2002). Los pacientes incluidos en este estudio fueron sujetos sin ningún tipo de alteración a nivel ocular, por lo que se espera que el efecto de la solución experimental en pacientes con la superficie ocular comprometida también produzca mejoras estadísticamente significativas.

Entre las principales limitaciones de este estudio está que la evaluación de la humectación tras la instilación de la solución experimental se realizó exclusivamente dentro de la primera hora de uso de las lentes de contacto. Estudios anteriores sostienen la existencia de cambios en la calidad de la película lagrimal y el incremento de la presencia de depósitos a medida que aumenta el tiempo de porte (Craig et al., 2013b).

La evaluación del parámetro TFSQ realizada en investigaciones previas en lentes de contacto de reemplazo diario, como las utilizadas en este estudio, no ha mostrado diferencias significativas entre las medidas al inicio y después de 8 horas de uso (Szczena-Iskander et al., 2012). No obstante, sería interesante valorar si el efecto

sobre la humectación es el mismo realizando la instilación de la solución experimental tras varias horas de porte.

Por otro lado, lentes de contacto con otros tipos de reemplazo, tienden a acumular más depósitos que las de uso diario empleadas en esta investigación. Es posible que la valoración tras varios días de uso de la misma lente sí refleje diferencias en la humectación (Ilhan et al., 1998). Además los sistemas de mantenimiento y limpieza asociados a estos tipos de reemplazo pueden tener una influencia importante en este parámetro y hacer necesario el uso de soluciones humectantes para paliar estos efectos.

2.3 EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES INFLAMATORIOS EN LA PELÍCULA LAGRIMAL

El último estudio planteado consistió en la evaluación del efecto de la solución experimental sobre la concentración en la película lagrimal de moléculas relacionadas con procesos inflamatorios de la superficie ocular.

Además de estos parámetros y al igual que en el estudio de seguridad y eficacia, los pacientes también se sometieron a la evaluación subjetiva de la sintomatología con el cuestionario DEQ, y a pruebas objetivas como el test de Schirmer y la medida del tiempo de ruptura lagrimal o TFBUT, para monitorizar el efecto de la solución experimental después de 3 meses de uso.

Begley y colaboradores manifestaron previamente que la medida de la frecuencia de los síntomas y la intensidad diurna proporcionada por el test de sintomatología DEQ, constituye una herramienta sensible y de gran utilidad para la evaluación de los síntomas de irritación asociados a sequedad ocular de origen acuodeficiente (Begley et al., 2002). Al igual que sucede con la mayoría de cuestionarios de sintomatología, no se ha encontrado correlación de los resultados de este test con otro tipo de pruebas objetivas, sin embargo, su uso permite la diferenciación del grado de afectación (Özcura et al., 2007; Ünlü et al., 2012).

La valoración de los resultados obtenidos con este cuestionario, tras el uso de la solución experimental reflejó mejoras estadísticamente significativas en las puntuaciones de las preguntas relacionadas con la frecuencia de la sensación de irritación y sequedad ocular. Sin embargo, aunque se documentó un ligero incremento con ambas soluciones para el test de Schirmer, en ninguno de los casos fue significativo.

Este efecto, está en línea con lo observado previamente y refuerza el concepto ya descrito de la dificultad de encontrar cualquier tipo de asociación entre las diferentes herramientas de monitorización, probablemente debido a disparidades en la etiología y a los diferentes criterios diagnósticos utilizados.(Onwubiko et al., 2016)

Una de las posibles causas de no haber observado diferencias significativas en el test de Schirmer es el hecho de que el incremento en el volumen lagrimal asociado al uso de sustitutos lagrimales es transitorio y sucede en los primeros minutos después de la instilación. Para evitar interferencias o fenómenos de dilución en la evaluación de la concentración de las moléculas pro-inflamatorias en la película lagrimal se indicó a los pacientes que no utilizaran ninguna de las dos soluciones el propio día de la visita. En este caso, y al igual que sucedió durante la evaluación de la seguridad y eficacia de la solución, la no obtención de diferencias estadísticamente significativas podría deberse al período transcurrido desde la última instilación hasta la realización de la prueba.

Algunos autores consideran que el test de Schirmer es más reproducible y constituye una buena elección en pacientes con sintomatología y grados de sequedad ocular severa (Nichols et al., 2004). Sin embargo, los datos disponibles muestran que la información que aporta en el diagnóstico y monitorización de pacientes con sintomatología de sequedad y/o irritación ocular leve a moderada, como es el caso de la muestra utilizada en este estudio, no es representativa y presenta gran variabilidad (Paulsen et al., 2014; Tsubota et al., 1996).

La aparición de inestabilidad de la película lagrimal constituye uno de los signos más comunes en pacientes con este tipo de sintomatología. Por esta razón la valoración del tiempo de ruptura lagrimal es una de las pruebas más realizadas en la práctica clínica

(Wolffsohn et al., 2017). A diferencia de lo observado en la evaluación de la seguridad y eficacia, en este estudio si se registró un aumento estadísticamente significativo a los tres meses de uso de la solución experimental en la puntuación del TFBUT. Esto sugiere que si bien la solución de estudio puede tener un efecto positivo sobre la estabilidad, éste no sería suficiente para llegar a producir un incremento significativo en parámetros como el volumen lagrimal.

Estudios previos de McCann y colaboradores, no reportaron diferencias estadísticamente significativas en el TFBUT después del uso de una solución con un porcentaje de HPMC del 0.3%. Una concentración superior a la de la solución de estudio (McCann et al., 2012). Este hallazgo, podría deberse a variaciones en el peso molecular del polímero utilizado en la fabricación de cada una de las soluciones o al propio efecto de la adición a la fórmula del extracto de *Aloe vera*.

Niveles elevados de MMP-9 revelan la presencia de procesos inflamatorios asociados a alteraciones que afectan al epitelio de la superficie ocular y son potencialmente responsables de la ralentización de procesos de cicatrización (Ollivier et al., 2007; Sivak and Fini, 2002). Su activación está estrechamente ligada a la de otras moléculas pro-inflamatorias, principalmente interleuquinas. Ha sido descrito que la IL-1 β es uno de los inductores más potentes de la síntesis de ARNm de la enzima MMP-9 (Pflugfelder et al., 2002) y hallazgos previos sugieren que ambas citoquinas junto con IL-6 están implicadas de forma directa en procesos inflamatorios, de degradación y de remodelación tisular como los producidos en respuesta a fenómenos de desecación e irritación ocular (Acera et al., 2008; Enríquez-de-Salamanca et al., 2010; Lam et al., 2009; Lee et al., 1994).

De acuerdo a investigaciones previas los valores normales de MMP-9 en la película lagrimal humana se encuentran en un intervalo de 3 a 40 ng/ml (Chan et al., 2016; Sambursky and OBrien, 2011; Smith et al., 2001). Mientras que valores por encima de 40 ng/ml revelarían grados más severos de afectación de la superficie ocular. Algunos autores sugieren que la MMP-9 es un buen biomarcador para grados severos

de sequedad ocular (Schargus et al., 2015) sin embargo, cuando el diagnóstico es de carácter leve o moderado, los niveles se pueden encontrar dentro de valores normales. Por tanto, las pruebas diagnósticas estandarizadas sólo servirían para clasificar sujetos con alteraciones muy avanzadas (Messmer et al., 2016). Además, este tipo de biomarcadores no son específicos para alteraciones relacionadas con la sequedad e irritación. Se pueden encontrar niveles elevados en otro tipo de patologías inflamatorias de la superficie ocular sin estar relacionadas necesariamente con alteraciones de la secreción y/o del aumento de la tasa de evaporación lagrimal, como queratoconjuntivitis alérgica, queratitis fúngica, ulceraciones corneales, pterigium y conjuntivocalasis (Acera et al., 2008; Dohlman et al., 2016).

Los pacientes incluidos en el presente estudio mostraron niveles de MMP-9 antes y después de 1 y 3 meses de uso de la solución de estudio dentro del intervalo de 3 a 40 ng/ml pero muy alejados del límite superior. Este hallazgo se traduce en que si bien los pacientes presentaban sintomatología de sequedad e irritación, el grado de afectación de la superficie ocular en la muestra no era severo ni en condiciones basales ni después del uso de la solución experimental, pese a haber observado una disminución estadísticamente significativa.

Los resultados de este estudio han corroborado los obtenidos por Burgalassi y colaboradores. Dichos autores demostraron que una solución oftálmica con *Aloe vera* podría ser adecuada para el alivio de la sintomatología de sequedad ocular (Burgalassi et al., 2005). Estudios *in vitro* previos de Wozniak y colaboradores observaron el efecto de un extracto de *Aloe vera* sobre células de epitelio corneal disminuyendo la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 después de añadir el extracto en el medio de cultivo (Woźniak and Paduch, 2012).

A diferencia de los resultados obtenidos en sus experimentos *in vitro*, el presente estudio no ha reflejado diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IL-1 β después del uso de la solución experimental. La sobreexpresión de esta interleuquina ha sido descrita principalmente en grados más severos de sequedad ocular asociados

a patologías sistémicas como es el caso del síndrome de Sjögren (Solomon et al., 2001). Aunque se ha especificado la interacción dinámica de ambas citoquinas en la superficie ocular, es posible que los niveles de MMP-9 encontrados no estén relacionados con variaciones significativas en la concentración de formas activas de IL-1 β .

Ninguno de los sujetos incluidos en esta investigación estaba diagnosticado de grado severo de sequedad ocular, como es el caso de esta enfermedad autoinmune. Esto sugiere que la no variación en los valores de este biomarcador puede ser debida a que los pacientes presentaban estadíos leves y moderados, y por tanto los niveles serían próximos a los valores normales de un paciente sano.

A diferencia de lo observado para la IL-1 β , los niveles de IL-6 si descendieron significativamente tras 3 meses de uso de la solución experimental. Estudios previos sostienen que valores elevados de este biomarcador están asociados con los resultados de la prueba de Schirmer y del tiempo de ruptura lagrimal (Fong et al., 2019). Sin embargo, los hallazgos de este estudio, como se ha descrito con anterioridad, solo reflejaron descenso en el TFBUT.

Este es el primer estudio en el que se investiga el efecto de una formulación oftálmica basada en un extracto de *Aloe vera* e HPMC sobre la concentración de moléculas pro-inflamatorias en pacientes con sintomatología de sequedad e irritación ocular.

La selección del ojo contralateral como control en este estudio se debe a la gran variabilidad en la concentración de moléculas pro-inflamatorias observada entre sujetos. El uso de la solución experimental en un ojo y de la solución control en el contralateral ha permitido la valoración al mismo tiempo del efecto sobre los niveles de las citoquinas evitando la posible influencia de condiciones ambientales diferentes.

Es necesario considerar que los resultados de este estudio no pueden atribuirse exclusivamente a un efecto aislado del extracto de *Aloe vera*. Deben ser analizados e interpretados como un efecto combinado de todos los ingredientes activos incluidos en la fórmula. No hay datos suficientes para atribuir si el efecto se debe a la presencia del

extracto de *Aloe vera* o de HPMC en la fórmula. Es necesaria más investigación para entender este efecto así como los posibles mecanismos involucrados en la disminución de la expresión de MMP-9 e IL-6.

Por otro lado, la irritación provocada por la propia tira de Schirmer durante la realización de la prueba puede haber producido un lagrimeo reflejo que enmascara valores más elevados de la concentración de citoquinas antes de la realización de la prueba (Holly, 1985; Ibrahim et al., 2011).

Otra de las limitaciones es el tamaño muestral empleado. Aunque fue suficiente para observar diferencias estadísticamente significativas, sería interesante realizar estudios incluyendo un mayor número de pacientes para confirmar estos resultados y el posible papel de esta solución humectante como tratamiento coadyuvante para procesos inflamatorios asociados a sequedad e irritación ocular.

El diseño y desarrollo de productos sanitarios implica la realización y la recopilación de información de un gran número de ensayos a nivel funcional y en el ámbito de la fabricación del producto.

Los estudios experimentales incluidos en la presente tesis doctoral tanto a nivel pre-clínico como a nivel clínico en los usuarios finales si bien han sido de especial importancia sólo han constituido una pequeña parte del proceso total necesario para la aprobación del producto por las entidades reguladoras y su posterior puesta en el mercado.

El desarrollo pre-clínico representado en la fase *in vitro* de este trabajo hace referencia al conjunto de estudios que se deben realizar en sistemas biológicos diferentes al ser humano para caracterizar la fórmula y la eficacia y seguridad del producto antes de testarlo en los usuarios finales. La presentación de la información obtenida en estos ensayos pre-clínicos ha facilitado el permiso por parte de las autoridades sanitarias para proceder a evaluar la seguridad y eficacia en los usuarios finales.

Dentro de la fase *in vivo* del presente trabajo se ha incluido la evaluación de la seguridad y eficacia necesaria para la aprobación de la comercialización y dos ensayos post-comercialización solicitados por el fabricante con el objetivo de buscar nuevas aplicaciones del producto.

La comercialización del producto sanitario en todo el espacio europeo fue autorizada inicialmente por el organismo notificado español 0318. Esta entidad reguladora lo categorizó como producto sanitario clase IIa al estar destinado al alivio de la irritación y/o de la sintomatología de sequedad ocular.

Una vez aprobada la comercialización del producto se planteó la evaluación de la humectación de la superficie de lentes de contacto hidrofílicas tras la instilación del sustituto lagrimal en usuarios. Aunque el producto ya ostentaba el marcado CE cuando se inició el estudio, al ser utilizado en una indicación diferente a la contemplada en el procedimiento de evaluación de la conformidad, se realizó, al igual que en el caso de la

evaluación de la seguridad y eficacia, de acuerdo a lo establecido para la realización de investigaciones clínicas con productos sanitarios. Los resultados obtenidos en este estudio fueron presentados a la autoridad regulatoria española como estudio post-comercialización con el objetivo de añadir en el uso previsto del producto la lubricación y humectación de lentes de contacto. La aprobación de esta nueva aplicación trajo consigo un cambio en la clasificación del producto sanitario a clase IIb por estar su uso previsto asociado a la utilización con lentes de contacto.

El último estudio realizado ha consistido en evaluar el efecto de la instilación del producto sobre la concentración de moléculas pro-inflamatorias en la película lagrimal de sujetos con sintomatología de irritación y/o sequedad ocular.

Entre los principales conflictos del uso de extractos herbales dentro del ámbito de los productos sanitarios está definir el mecanismo a través del cual ejercen su acción. El efecto del extracto de *Aloe vera* se encuentra en un limbo entre lo que estaría considerado como un efecto físico y lo que sería atribuible a mecanismos farmacológicos. La variedad de compuestos presentes en el extracto abre la posibilidad de atribuir el efecto final a varios mecanismos simultáneos. En este sentido, a la hora de realizar la evaluación de la documentación técnica y clínica, la gran mayoría de entidades certificadoras considera que los productos que contienen extractos herbales se encuentran en un límite dudoso entre lo que estaría definido como un producto sanitario y lo que sería un medicamento.

Los hallazgos de la evaluación de la concentración de moléculas pro-inflamatorias han mostrado un descenso en dos de los marcadores más importantes de la enfermedad de ojo seco. Este efecto podría estar relacionado con el propio mecanismo conjunto de captación de agua del *Aloe vera* y la HPMC, evitando la desecación y por tanto la evolución de la cascada inflamatoria asociada a la sintomatología de sequedad e irritación y por mecanismos simultáneos asociados a otras sustancias presentes en el extracto.

Las características de los productos sanitarios hacen que no sea posible utilizar efecto anti-inflamatorio como *claim*. Por esta razón este último estudio ha sido utilizado únicamente para respaldar un uso prolongado del producto y para conocer los posibles efectos que produce a nivel de la superficie ocular en este tipo de pacientes.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el desarrollo, la evaluación de la seguridad y eficacia y la búsqueda de nuevas aplicaciones de un sustituto lagrimal basado en *Aloe vera* e hidroxipropilmetilcelulosa. Por lo tanto, del presente trabajo experimental se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La inclusión de un porcentaje de 1% de *Aloe vera* sobre una fórmula base con 0.2% de HPMC presenta un efecto beneficioso sobre la viabilidad celular de un cultivo de células epiteliales corneales de la línea SIRC tras 10 minutos de exposición al agente irritante DMSO.
2. El análisis comparativo del efecto sobre la viabilidad celular de diferentes sustitutos lagrimales comercializados ha mostrado que la solución experimental y la solución con un 0.5% de carboximetilcelulosa son las que proporcionan mejores resultados tras la exposición al agente irritante DMSO.
3. La evaluación de la seguridad y eficacia ha mostrado que la solución experimental basada en *Aloe vera* e HPMC es igual de segura que la solución control y presenta mayor eficacia en el alivio de la sintomatología de irritación asociada a la enfermedad de ojo seco leve – moderada.
4. El análisis de la humectación *in vivo* de la superficie de lentes de contacto hidrofílicas ha mostrado mejoras estadísticamente significativas en la evaluación del parámetro TFSQ en los 3 minutos iniciales tras la instilación de la solución experimental, así como un aumento en la satisfacción del usuario y una disminución en la AV de bajo contraste.

CONCLUSIONES

5. El uso de la solución basada en *Aloe vera* e HPMC durante 3 meses proporciona alivio de la sintomatología de sequedad e irritación ocular y un descenso significativo en la concentración de las moléculas pro-inflamatorias MMP-9 e IL-6 en la película lagrimal de los usuarios.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abelson MB, Udell IJ, Weston JH. Normal human tear pH by direct measurement. *Arch Ophthalmol* 1981;99:301.

Acera A, Rocha G, Vecino E, Lema I, Durán JA. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res* 2008;40:315–21.

Acera A, Vecino E, Duran JA. Tear MMP-9 levels as a marker of ocular surface inflammation in conjunctivochalasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:8285–91.

Adams GGW, Dilly PN, Kirkness CM. Monitoring ocular disease by impression cytology. *Eye* 1988;2:506–16. <https://doi.org/10.1038/eye.1988.100>.

Adams J, Wilcox M, Trousdale M, Chien D, Shimizu R. Morphologic and Physiologic Effects of Artificial Tear Formulations on Corneal Epithelial Derived Cells. *Cornea* 1992;11:234–41.

Agencia estatal BOE 159. Ley 14/2007, del 3 de Julio de 2007, de Investigación Biomédica. Boletín Oficial del Estado, 159, del 4 de Julio de 2007. 2007:28826–48.

Aho H, Saari K, Kallajoki M, Nevalainen T. Synthesis of Group II Phospholipase A2 and Lysozyme in Lacrimal Glands. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1826–32.

Akin T, Karadayi K, Aykan U, Certel I, Bilge AH. The effects of artificial tear application on contrast sensitivity in dry and normal eyes. *Eur J Ophthalmol* 2006;16:785–90.

Albietz JM, Bruce AS. The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: Effect of preserved and non-preserved topical treatments. *Curr Eye Res* 2001;22:8–18.

Andueza I, Avila G, Attias D. Caracterización reológica de hidroxipropilmetilcelulosa con potencial aplicación oftalmológica. *J Mex Chem Soc* 2000;44:229–32.

Anwar Z, Wellik SR, Galora A. Glaucoma therapy and ocular surface disease: Current literature and recommendations. *Curr Opin Ophthalmol* 2013;24:136–43.

Argüeso P, Spurr-Michaud S, Russo CL, Tisdale A, Gipson IK. MUC16 mucin is expressed by the human ocular surface epithelia and carries the H185 carbohydrate epitope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:2487–95.

Avisar R, Menaché R, Shaked P, Rubinstein J, Machtey I, Savir H. Lysozyme content of tears in patients with Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Am J Ophthalmol* 1979;87:148–51.

Ayaki M, Iwasawa A, Yaguchi S, Koide R. In vitro assessment of the cytotoxicity of anti-allergic eye drops using 5 cultured corneal and conjunctival cell lines. *J Oleo Sci* 2011;60:139–44.

Bachman WG, Wilson G. Essential ions for maintenance of the corneal epithelial surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:1484–8.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066–71.

Baudouin C. The pathology of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45:211–20.

Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 2010a;29:312–34.

- Baudouin C, Labbé A, Liang H, Pauly A, Brignole-Baudouin F. Preservatives in eyedrops: The good, the bad and the ugly. *Prog Retin Eye Res* 2010b;29:312–34.
- Begley CG, Caffery B, Chalmers RL, Mitchell GL. Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye. *Cornea* 2002;21:664–70.
- Begley CG, Chalmers RL, Mitchell GL, Nichols KK, Caffery B, Simpson T, et al. Characterization of ocular surface symptoms from optometric practices in North America. *Cornea* 2001;20:610–8.
- Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, et al. TFOS DEWS II pain and sensation report. *Ocul Surf* 2017;15:404–37.
- Berdy GJ, Abelson MB, Smith LM, George MA. Preservative-Free Artificial Tear Preparations: Assessment of Corneal Epithelial Toxic Effects. *Arch Ophthalmol* 1992;110:528–32.
- Berger JS, Head KR, Salmon TO. Comparison of two artificial tear formulations using aberrometry. *Clin Exp Optom* 2009;92:206–11.
- Berridge M V., Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005;11:127–52.
- Berridge M V., Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993;303:474–82.
- Berry M, Easty DL. Isolated human and rabbit eye: Models of corneal toxicity. *Toxicol Vitro* 1993;7:461–4.
- Berry M, Ellingham RB, Corfield AP. Human preocular mucins reflect changes in surface physiology. *Brit J Ophthalmol* 2004;88:377–83.
- Berry M, Pult H, Purslow C, Murphy PJ. Mucins and ocular signs in symptomatic and asymptomatic contact lens wear. *Optom Vis Sci* 2008;85:E930–8.
- Bielory L, Wagle P. Ocular surface lubricants. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2017;17:382–9.
- Van Bijsterveld OP. Diagnostic Tests in the Sicca Syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969;82:10–4.
- Blalock TD, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Heimer SR, Gilmore MS, Ramesh V, et al. Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4509–18.
- Blanxart AF. NTP341 Exposición a cloro en piscinas cubiertas. *Minist Trab y Asuntos Soc España* n.d. https://www.insst.es/documents/94886/326827/ntp_341.pdf/7af0d487-75d8-4fd4-a4e9-19147328a6f5 (accessed September 2, 2020).
- Bobek LA, Situ H. MUC7 20-mer: Investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:643–52.
- Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7725–30.
- Borges-Argáez R, Chan-Balan R, Cetina-Montejo L, Ayora-Talavera G, Sansores-Peraza P, Gómez-Carballo J, et al. In vitro evaluation of anthraquinones from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) roots and several derivatives against strains of influenza virus. *Ind Crop Prod* 2019;132:468–75.

- Botelho SY. Tears and the lacrimal gland. *Sci Am* 1964;211:78–86.
- Botelho SY, Martinez E V. Electrolytes in lacrimal gland fluid and in tears at various flow rates in the rabbit. *Am J Physiol* 1973;225:606–9. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1973.225.3.606>.
- Boudreau MD, Beland FA. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. *J Env Sci Heal C Env Carcinog Ecotoxicol Rev* 2006;24:103–54.
- Bradley JL, Stillman IÖ, Pivneva I, Guerin A, Evans AM, Dana R. Dry eye disease ranking among common reasons for seeking eye care in a large US claims database. *Clin Ophthalmol* 2019;13:225–32.
- Breyer-Brandwijk JWM. *The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa*. Second edi. Edinburgh.: Livingstone; 1962.
- Bron AJ, de Paiva CS, Chauhan SK, Bonini S, Gabison EE, Jain S, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul Surf* 2017;15:438–510.
- Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 2004;78:347–60.
- Brown SHJ, Kunnen CME, Duchoslav E, Dolla NK, Kelso MJ, Papas EB, et al. A comparison of patient matched meibum and tear lipidomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:7417–24.
- Burgalassi S, Sommani C, Monti D, Najarro M, Chetoni P. Ophthalmic formulations based on *Aloe vera*: Characterisation and In vivo evaluation in animal model. 8th Congr. Int. Soc. Dacriology Dry Eye. Abstr., 2005.
- Butovich IA. Tear film lipids. *Exp Eye Res* 2013;117:4–27.
- Butovich IA. On the lipid composition of human meibum and tears: Comparative analysis of nonpolar lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3779–89.
- Byeon SW, Pelley RP, Ullrich SE, Waller TA, Bucana CD, Strickland FM. *Aloe barbadensis* extracts reduce the production of interleukin-10 after exposure to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* 1998;110:811–7.
- Carracedo G, Martin-Gil A, Fonseca B, Pintor J. Effect of overnight orthokeratology on conjunctival goblet cells. *Cont Lens Anterior Eye* 2016;39:266–9.
- Carracedo G, Pastrana C, Serramito M, Rodriguez-Pomar C. Evaluation of tear meniscus by optical coherence tomography after different sodium hyaluronate eyedrops instillation. *Acta Ophthalmol* 2019;97:e162–9.
- Cataldi V, Di Bartolomeo S, Di Campli E, Nostro A, Cellini L, Di Giulio M. In vitro activity of *Aloe vera* inner gel against microorganisms grown in planktonic and sessile phases. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2015;28:595–602.
- Chalmers RL, Begley CG, Moody K, Hickson-Curran SB. Contact Lens Dry Eye Questionnaire-8 (CLDEQ-8) and opinion of contact lens performance. *Optom Vis Sci* 2012;89:1435–42.
- Chan TCY, Ye C, Chan KP, Chu KO, Jhanji V. Evaluation of point-of-care test for elevated tear matrix metalloproteinase 9 in post-LASIK dry eyes. *Brit J Ophthalmol* 2016;100:1188–91.
- Chen Q, Wang J, Tao A, Shen M, Jiao S, Lu F. Ultrahigh-resolution measurement by optical coherence tomography of dynamic tear film changes on contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1988–93.
- Chen W, Zhang Z, Hu J, Xie H, Pan J, Dong N, et al. Changes in rabbit corneal

- innervation induced by the topical application of benzalkonium chloride. *Cornea* 2013;32:1599–606.
- Cher I. A new look at lubrication of the ocular surface: fluid mechanics behind the blinking eyelids. *Ocul Surf* 2008;6:79–86.
- Choi SW, Son BW, Son YS, Park YI, Lee SK, Chung MH. The wound-healing effect of a glycoprotein fraction isolated from aloe vera. *Brit J Dermatol* 2001;145:535–45.
- Chotikavanich S, de Paiva CS, de Quan Li, Chen JJ, Bian F, Farley WJ, et al. Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3203–9.
- Chu C-C, Zhao S-Z. Pathophysiological role and drug modulation of Calcium transport in ocular surface cells. *Curr Med Chem* 2019.
- Corrales R, Diebold Y, Callejo S, Calonge M, Herreras J, Sáez V, et al. [In vitro toxicity of non-preserved artificial-tear formulations]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2001;76:613–9.
- Craig JP, Nelson JD, Azar DT, Belmonte C, Bron AJ, Chauhan SK, et al. TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul Surf* 2017a;15:802–12.
- Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf* 2017b;15:276–83.
- Craig JP, Simmons PA, Patel S, Tomlinson A. Refractive index and osmolality of human tears. *Optom Vis Sci* 1995;72:718–24.
- Craig JP, Willcox MDP, Argüeso P, Maissa C, Stahl U, Tomlinson A, et al. The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: Report of the contact lens interactions with the tear film subcommittee. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2013a;54.
- Craig JP, Willcox MDP, Argüeso P, Maissa C, Stahl U, Tomlinson A, et al. The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: Report of the contact lens interactions with the tear film subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013b;54:TFOS123-56.
- Criterio clasificación directiva de productos sanitarios. Classification criteria (Annex IX of Directive 93/42/ECC) 2010.
- Curto EM, Labelle A, Chandler HL. Aloe vera: An in vitro study of effects on corneal wound closure and collagenase activity. *Vet Ophthalmol* 2014;17:403–10.
- Dal’Belo SE, Rigo Gaspar L, Maia Campos PMBG. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Ski Res Technol* 2006;12:241–6.
- Damani MR, Shah AR, Karp CL, Orlin SE. Treatment of ocular surface squamous neoplasia with topical Aloe vera drops. *Cornea* 2015;34:87–9.
- Darbà J, Ascanio M. Economic impact of dry eye disease in Spain: A multicentre retrospective insurance claims database analysis. *Eur J Ophthalmol* 2020.
- Dartt D, Willcox M. Complexity of the tear film: importance in homeostasis and dysfunction during disease. *Exp Eye Res* 2013;117:1–3.
- Dartt DA. Tear lipocalin: Structure and function. *Ocul Surf* 2011;9:126–38.
- Das S, Mishra B, Gill K, Ashraf MS, Singh AK, Sinha M, et al. Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel. *Int J Biol Macromol* 2011;48:38–43.

- Dat AD, Poon F, Pham KB, Doust J. Aloe vera for treating acute and chronic wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;15.
- Davis RH, Donato JJ, Hartman GM, Haas RC. Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. *J Am Pod Med Assoc* 1994;84:77–81.
- DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011;37:588–98.
- Desseyn JL, Aubert JP, Porchet N, Laine A. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. *Mol Biol Evol* 2000;17:1175–84.
- Diebold Y, Ríos JD, Hodges RR, Rawe I, Dartt DA. Presence of nerves and their receptors in mouse and human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2270–82.
- Dilly PN. Structure and function of the tear film. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:239–47.
- Directiva para Productos sanitarios. Council Directive 93/42/EEC of June 1993 concerning Medical Devices 1993.
- Doane MG. Abnormalities of the structure of the superficial lipid layer on the in vivo dry-eye tear film. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 350, 1994, p. 489–93.
- Doane MG. Blinking and the Mechanics of the Lacrimal Drainage System. *Ophthalmol* 1981;88:844–51.
- Dogru M, Nakamura M, Shimazaki J, Tsubota K. Changing trends in the treatment of dry-eye disease. *Exp Opin Investig Drugs* 2013;22:1581–601.
- Dohlman TH, Ciralsky JB, Lai EC. Tear film assessments for the diagnosis of dry eye. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016;16:487–91.
- Du TL, Van Der Westhuizen FH, Botes L. Aloe ferox leaf gel phytochemical content, antioxidant capacity, and possible health benefits. *J Agric Food Chem* 2007;55:6891–6.
- Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmol* 2013;120:1778–85.
- Duansak D, Somboonwong J, Patumraj S. Effects of Aloe vera on leukocyte adhesion and TNF- α and IL-6 levels in burn wounded rats. *Clin Hemorheol Microcir* 2003;29:239–46.
- Efron N. Grading scales for contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998;18:182–6.
- Efron N, Morgan PB, Katsara SS. Validation of grading scales for contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt* 2001;21:17–29.
- Elliott M, Fandrich H, Simpson T, Fonn D. Analysis of the repeatability of tear break-up time measurement techniques on asymptomatic subjects before, during and after contact lens wear. *Cont Lens Anterior Eye* 1998;21:98–103.
- Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern M, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, et al. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862–73.
- Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin - A multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40:395–405.
- Fischer FH, Wiederholt M. Human precorneal tear film pH measured by microelectrodes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1982;218:168–70.
- Fleiszig SM, Zaidi TS, Ramphal R, Pier GB. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* adherence to the corneal surface by mucus. *Infect Immun* 1994;62:1799–804.

- Fong P, Shih K, Lam P, Chan T, Jhanji V, Tong L. Role of tear film biomarkers in the diagnosis and management of dry eye disease. *Taiwan J Ophthalmol* 2019;9:150–9.
- Fraunfelder FT, Sciubba JJ, Mathers WD. The role of medications in causing dry eye. *J Ophthalmol* 2012;2012.
- Galor A, Levitt RC, Felix ER, Martin ER, Sarantopoulos CD. Neuropathic ocular pain: An important yet underevaluated feature of dry eye. *Eye* 2015;29:301–12.
- Galor A, Small L, Feuer W, Levitt RC, Sarantopoulos KD, Yosipovitch G. The relationship between ocular itch, ocular pain, and dry eye symptoms (an american ophthalmological society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc* 2018;17:T5-1-T5-13.
- Gangrede N, Gaddipati N, Ganesan M. Topical ophthalmic formulations: basic considerations. In: IK R, editor. *Ocul. Ther. drug Deliv. a multi-disciplinary approach*, Lancaster, Pennsylvania: 1996, p. 377–403.
- García-Posadas L, Contreras-Ruiz L, Soriano-Romaní L, Dartt DA, Diebold Y. Conjunctival Goblet Cell Function: Effect of Contact Lens Wear and Cytokines. *Eye Contact Lens* 2016;42:83–90.
- Gayton JL. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol* 2009;3:405–12.
- Geerling G, Daniels J, Dart J, Cree I, Khaw P. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:97.
- Gelderman MP, Lefkowitz DL, Lefkowitz SS, Bollen A, Moguilevsky N. Exposure of macrophages to an enzymatically inactive macrophage mannose receptor ligand augments killing of *Candida albicans*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:81–8.
- Georgiev GA, Eftimov P, Yokoi N. Structure-function relationship of tear film lipid layer: A contemporary perspective. *Exp Eye Res* 2017;163:17–28.
- Gerlier D, Thomasset N. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1986;94:57–63.
- Gibson BL, Reif-Lehrer L. Mg²⁺ reduces N-Methyl-d-aspartate neurotoxicity in embryonic chick neural retina in vitro. *Neurosci Lett* 1985;57:13–8.
- Gilbard JP, Carter JB, Sang DN, Refojo MF, Hanninen LA, Kenyon KR. Morphologic Effect of Hyperosmolarity on Rabbit Corneal Epithelium. *Ophthalmol* 1984;91:1205–12.
- Gilbard JP, Rossi SR. Changes in tear ion concentrations in dry-eye disorders. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:529–33.
- Gipson I, Joyce N, Zieske J. The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus, conjunctiva and adnexa. In: Thoft's S and, editor. *cornea Sci. Found. Clin. Pract.* 4th ed., Philadelphia: 2005, p. 2–3.
- Gipson IK. Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. *Prog Retin Eye Res* 2016;54:49–63.
- Gipson IK. The ocular surface: The challenge to enable and protect vision. The Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 48, 2007, p. 4391–8.
- Gipson IK, Argüeso P. Role of Mucins in the Function of the Corneal and Conjunctival Epithelia. *Int Rev Cytol* 2003;231:1–49.
- Glasgow B, Marshall G, Gasymov O, Abduragimov A, Yusifov T, Knobler C. Tear Lipocalins: Potential Lipid Scavengers for the Corneal Surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

1999;40:3100–7.

Glasgow BJ, Gasyimov OK. Focus on Molecules: Tear lipocalin. *Exp Eye Res* 2011;92:242–3.

Gong H, Takami Y, Kitaoka T, Amemiya T. Corneal changes in magnesium-deficient rats. *Cornea* 2003;22:448–56.

Gouveia SM, Tiffany JM. Human tear viscosity: An interactive role for proteins and lipids. *Biochim Biophys Acta* 2005;1753:155–63.

Green K, MacKeen DL, Slagle T, Cheeks L. Tear potassium contributes to maintenance of corneal thickness. *Ophthalmic Res* 1992;24:99–102.

Green K, Tsai J, Luxenberg MN. Effect of aloe vera on corneal epithelial wound healing. *J Toxicol - Cutan Ocul Toxicol* 1996;15:301–4.

Grindlay D, Reynolds T. The Aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J Ethnopharmacol* 1986;16:117–51.

Grubbs JR, Tolleson-Rinehart S, Huynh K, Davis RM. A review of quality of life measures in dry eye questionnaires. *Cornea* 2014;33:215–8.

Guillon M, Dumbleton KA, Theodoratos P, Wong S, Patel K, Banks G, et al. Association between contact lens discomfort and pre-lens tear film kinetics. *Optom Vis Sci* 2016;93:881–91.

Guillon M, Maissa C. Contact lens wear affects tear film evaporation. *Eye Contact Lens* 2008;34:326–30.

Guthoff RF, Wiens H, Hahnel C, Wree A. Epithelial innervation of human cornea: A three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2005;24:608–13.

Guzman-Aranguez A, Argüeso P. Structure and biological roles of mucin-

type O-glycans at the ocular surface. *Ocul Surf* 2010;8:8–17.

Haddad P, Amouzgar-Hashemi F, Samsami S, Chinichian S, Oghabian MA. Aloe vera for prevention of radiation-induced dermatitis: A self-controlled clinical trial. *Curr Oncol* 2013;20:345–8.

Hajhashemi V, Ghannadi A, Heidari AH. Anti-inflammatory and wound healing activities of *Aloe littoralis* in rats. *Res Pharm Sci* 2012;7:73–8.

Hall B, Jones S, Young G, Coleman S. The on-eye dehydration of proclear compatibles lenses. *CLAO J* 1999;25:233–7.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989;119:203–10.

Hashemi SA, Madani SA, Abediankenari S. The Review on Properties of Aloe Vera in Healing of Cutaneous Wounds. *Biomed Res Int* 2015;2015:6.

Henry R. An updated review of Aloe vera. *Cosmet Toilet* 1979;94:42–50.

Heś M, Dziedzic K, Górecka D, Jędrusek-Golińska A, Gujska E. Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants – A Review. *Plant Foods Hum Nutr* 2019;74:255–65.

Holly F. Physical chemistry of the normal and disordered tear film. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1985;104:374–80.

Huang FC, Tseng SH, Shih MH, Chen FK. Effect of artificial tears on corneal surface regularity, contrast sensitivity, and glare disability in dry eyes. *Ophthalmology* 2002;109:1934–40.

Hutter JA, Salman M, Stavinoha WB, Satsangi N, Williams RF, Streeper RT, et al. Antiinflammatory C-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. *J Nat*

Prod 1996;59:541–3.

Ibrahim OMA, Dogru M, Ward SK, Matsumoto Y, Wakamatsu TH, Ishida K, et al. The efficacy, sensitivity, and specificity of strip meniscometry in conjunction with tear function tests in the assessment of tear meniscus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:2194–8.

Iester M, Orsoni GJ, Gamba G, Taffara M, Mangiafico P, Giuffrida S, et al. Improvement of the ocular surface using hypotonic 0.4% hyaluronic acid drops in keratoconjunctivitis sicca. *Eye* 2000;14:892–8.

Ilhan B, Irkeç M, Orhan M, Celik H. Surface deposits on frequent replacement and conventional daily wear soft contact lenses: a scanning electron microscopic study. *CLAO J* 1998;24:232–5.

Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Gipson I. Human Corneal and Conjunctival Epithelia Express MUC1 Mucin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1818–27.

Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Zhan Q, Feldman ST, Gipson IK. Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1684–92.

Iskander DR, Collins MJ, Davis B. Evaluating tear film stability in the human eye with high-speed videokeratometry. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005;52:1939–49.

Ito S, Teradaira R, Beppu H, Obata M, Nagatsu T, Fujita K. Properties and pharmacological activity of carboxypeptidase in *Aloe arborescens* Mill var, *natalensis* Berger. *Phytother Res* 1993;7:26–9.

Jaén-Díaz JI, Cordero-García B, López-De-Castro F, De-Castro-Mesa C, Castilla-López-Madrídejos F, Berciano-Martínez F. Diurnal variability in intraocular pressure. *Arch Soc Esp*

Oftalmol 2007;82:675–9.

Jäger K, Wu G, Sel S, Garreis F, Bräuer L, Paulsen FP. MUC16 in the lacrimal apparatus. *Histochem Cell Biol* 2007;127:433–8.

Jain S, Rathod N, Nagi R, Sur J, Laheji A, Gupta N, et al. Antibacterial Effect of Aloe Vera Gel against Oral Pathogens: An In-vitro Study. *J Clin Diagn Res* 2016;10:ZC41–4.

Janssen PT van BO. Origin and Biosynthesis of Human Tear Fluid Proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:623–30.

Jee D, Park SH, Kim MS, Kim EC. Antioxidant and inflammatory cytokine in tears of patients with dry eye syndrome treated with preservative-free versus preserved eye drops. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:5081–9.

Jester J V., Nicolaidis N, Smith RE. Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981;20:537–47.

Ji Y, Jia J. Ultraviolet light absorption of an ophthalmic formulation with Aloe extracts. *Nat Prod Commun* 2009;4:1231–3.

Johnson ME, Murphy PJ. The effect of instilled fluorescein solution volume on the values and repeatability of TBUT measurements. *Cornea* 2005;24:811–7.

Johnson ME, Murphy PJ, Boulton M. Effectiveness of sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:109–12.

Jones L, Downie LE, Korb D, Benitez-del-Castillo JM, Dana R, Deng SX, et al. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul Surf* 2017;15:575–628.

Jones L, Powell CH. Uptake and release phenomena in contact lens care by

silicone hydrogel lenses. *Eye Contact Lens* 2013;39:29–36.

Jumblatt MM, McKenzie RW, Steele PS, Emberts CG, Jumblatt JE. MUC7 expression in the human lacrimal gland and conjunctiva. *Cornea* 2003;22:41–5.

Kaiser P. Prospective evaluation of visual acuity assessment: a comparison of snellen versus ETDRS charts in clinical practice (An AOS Thesis). *Trans Am Ophthalmol* 2009;107:311–24.

Kang MC, Kim SY, Kim YT, Kim EA, Lee SH, Ko SC, et al. In vitro and in vivo antioxidant activities of polysaccharide purified from aloe vera (*Aloe barbadensis*) gel. *Carbohydr Polym* 2014;99:365–71.

Kaufman P, Alm A. *Adler's Physiology of the Eye: Clinical Application*. Tenth Edit. St Louis, Missouri: 2004.

Kautto L, Nguyen-Khuong T, Everest-Dass A, Leong A, Zhao Z, Willcox MDP, et al. Glycan involvement in the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to tears. *Exp Eye Res* 2016;145:278–88.

Kessing S V. Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. *Acta Ophthalmol* 1968:Suppl 95:1+.

Kessing SV. A new division of the conjunctiva on the basis of x-ray examination. *Acta Ophthalmol* 1967;45:680–3.

Khorasani G, Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Zamani A, Mahdavi MR. Aloe versus silver sulfadiazine creams for second-degree burns: A randomized controlled study. *SurgToday* 2009;39:587–91.

Kijlstra A, Jeurissen SHM, Koning KM. Lactoferrin levels in normal human tears. *Br J Ophthalmol* 1983;67:199–202.

Kijlstra A, Kuizenga A. Analysis and function of the human tear proteins. *Adv*

Exp Med Biol 1994;350:299–308.

Kim J, Lee I seok, Park S, Choue R. Effects of *Scutellariae radix* and *Aloe vera* gel extracts on immunoglobulin E and cytokine levels in atopic dermatitis NC/Nga mice. *J Ethnopharmacol* 2010;132:529–32.

King-Smith PE, Fink BA, Hill RM, Koelling KW, Tiffany JM. The thickness of the tear film. *Curr Eye Res* 2004;29:357–68.

King-Smith PE, Nichols JJ, Nichols KK, Fink BA, Braun RJ. Contributions of evaporation and other mechanisms to tear film thinning and break-up. *Optom Vis Sci* 2008;85:623–30.

Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J, Thoft RA. Goblet Cell Density in Ocular Surface Disease: A Better Indicator than Tear Mucin. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1284–7.

Klingler C, Kniesel U, Bamforth SD, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors. *Histochem Cell Biol* 2000;113:349–61.

Klyce S. *Corneal Physiology*. In: Foster S, Azar D, Dohlman M, editors. *Cornea Sci. Found. Clin. Pract.* 4th ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004, p. 37–59.

Knop E, Knop N, Zhivov A, Kraak R, Korb DR, Blackie C, et al. The lid wiper and muco-cutaneous junction anatomy of the human eyelid margins: An in vivo confocal and histological study. *J Anat* 2011;218:449–61.

Koefoed VF, Baste V, Roumes C, Høvdning G. Contrast sensitivity measured by two different test methods in healthy, young adults with normal visual acuity. *Acta Ophthalmol* 2015;93:154–61.

Kojima T. Contact lens-associated dry

- eye disease: Recent advances worldwide and in Japan. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59:DES102–8.
- Korb DR, Herman JP, Finnemore VM, Exford JM, Blackie CA. An evaluation of the efficacy of fluorescein, rose bengal, lissamine green, and a new dye mixture for ocular surface staining. *Eye Contact Lens* 2008;34:61–4.
- Korkina L, Suprun M, Petrova A, Mikhal'chik E, Luci A, De Luca C. The protective and healing effects of a natural antioxidant formulation based on ubiquinol and Aloe vera against dextran sulfate-induced ulcerative colitis in rats. *BioFactors* 2003;18:255–64.
- Kramann C, Boehm N, Lorenz K, Wehrwein N, Stoffelns BM, Pfeiffer N, et al. Effect of contact lenses on the protein composition in tear film: A ProteinChip study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:233–43.
- Kshirsagar AD, Panchal P V., Harle UN, Nanda RK, Shaikh HM. Anti-Inflammatory and Antiarthritic Activity of Anthraquinone Derivatives in Rodents. *Int J Inflamm* 2014;2014:690596.
- Lagali N, Germundsson J, Fagerholm P. The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: A prospective study using in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:4192–8.
- Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear Cytokine Profiles in Dysfunctional Tear Syndrome. *Am J Ophthalmol* 2009;147:198–205.
- Lam SM, Tong L, Duan X, Petznick A, Wenk MR, Shui G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles. *J Lipid Res* 2014;55:289–98.
- Lamblin G, Degroote S, Perini JM, Delmotte P, Scharfman A, Davril M, et al. Human airway mucin glycosylation: A combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconj J* 2001;18:661–84.
- Lawless J, Allan J. The clinical composition of Aloe vera. *Aloe vera Nat. wonder cure*, London, United Kingdom: Thorsons Publishing Ltd; 2000, p. 161–71.
- Lawrence R, Tripathi P, E. Jeyakumar. Isolation, Purification and Evaluation of Antibacterial Agents From Aloe Vera. *Braz J Microbiol* 2009;40.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994;372:739–46.
- Lee LS, Lee SU, Che CY, Lee JE. Comparison of cytotoxicity and wound healing effect of carboxymethylcellulose and hyaluronic acid on human corneal epithelial cells. *Int J Ophthalmol* 2015;8:215–21.
- Lemp M, Caffery B, Lebow K, Lembach R, Park J, Foulks G, et al. Omaficon A (Proclear) soft contact lenses in a dry eye population - PubMed. *CLAO J* 1999;25:40–7.
- Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995;21:221–32.
- Lemp MA. Breakup of the tear film. *Int Ophthalmol Clin* 1973;13:97–102.
- Lemp MA, Baudouin C, Baum J, Dogru M, Foulks GN, Kinoshita S, et al. The definition and classification of dry eye disease: Report of the definition and classification subcommittee of the international Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75–92.
- Li D, Chen Z, Song X, Luo L, Pflugfelder S. Stimulation of matrix

metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4302–11.

Li D, Cheng Z, Song X, Farley W, Pflugfelder S. Hyperosmolarity Stimulates Production of MMP-9, IL-1 β and TNF- by Human Corneal Epithelial Cells Via a c-Jun NH2-terminal Kinase Pathway | IOVS | ARVO Journals. ARVO Annu Meet Abstr 2002.

Liesegang TJ. Viscoelastic substances in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 1990;34:268–93.

Lin Z, He Huan, Zhou T, Liu X, Wang Y, He Hui, et al. A mouse model of limbal stem cell deficiency induced by topical medication with the preservative benzalkonium chloride. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:6314–25.

Liu C, Cui Y, Pi F, Cheng Y, Guo Y, Qian H. Extraction, purification, structural characteristics, biological activities and pharmacological applications of acemannan, a polysaccharide from aloe vera: A review. *Molecules* 2019;24:1554.

Liu L, Tiffany J, Dang Z, Dart JKG, Watson SL, Daniels JT, et al. Nourish and nurture: Development of a nutrient ocular lubricant. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2932–9.

Llorens-Quintana C, Iskander DR. Assessment of Tear Film Using Videokeratometry Based on Fractal Dimension. *Optom Vis Sci* 2018;95:32–42.

Lucini L, Pellizzoni M, Pellegrino R, Molinari G, Pietro, Colla G. Phytochemical constituents and in vitro radical scavenging activity of different Aloe species. *Food Chem* 2015;170:501–7.

Mandal P, Khan MA, Shah S. Drugs – Do we need them? Applications of non-pharmaceutical therapy in anterior eye

disease: A review. *Cont Lens Anterior Eye* 2017;40:360–6.

Mann A, Tighe B. Contact lens interactions with the tear film. *Exp Eye Res* 2013;117:88–98.

Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2008;8:477–83.

Mantelli F, Tranchina L, Lambiase A, Bonini S. Ocular surface damage by ophthalmic compounds. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:464–70.

Markoulli M, Kolanu S. Contact lens wear and dry eyes: Challenges and solutions. *Clin Optom* 2017;9:41–8.

Marshall J. Aloe vera Gel What Is the Evidence. *Pharm J* 1990;24:360–2.

Maurice D. The Charles Prentice award lecture 1989: the physiology of tears. *Optom Vis Sci Off Publ Am Acad Optom* 1990;67:391–9.

McCann LC, Tomlinson A, Pearce EI, Papa V. Effectiveness of artificial tears in the management of evaporative dry eye. *Cornea* 2012;31:1–5.

McClellan BH, Whitney CR, Newman LP, Allansmith MR. Immunoglobulins in tears. *Am J Ophthalmol* 1973;76:89–101.

McCulley JP, Shine WE. Meibomian gland function and the tear lipid layer. *Ocul Surf* 2003;1:97–106.

McDermott AM. Antimicrobial compounds in tears. *Exp Eye Res* 2013;117:53–61.

McKenzie R, Jumblatt J, Jumblatt M. Quantification of MUC2 and MUC5AC Transcripts in Human Conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:703–8.

McMonnies C, Ho A, Wakefield D. Optimum dry eye classification using

questionnaire responses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 438, 1998, p. 835–8.

MEDDEV 2.4/1 rev 9. European Commission. Classification of medical devices (MEDDEV 2.4/1 Rev.9) 2010.

Mediero A, Crooke A, Guzmán-Aránguez A, Pintor J. Phospholipase C/protein kinase C pathway is essential for corneal re-epithelialization induced by Ap 4A. *Curr Eye Res* 2011;36:1108–15.

Messmer EM, von Lindenfels V, Garbe A, Kampik A. Matrix Metalloproteinase 9 Testing in Dry Eye Disease Using a Commercially Available Point-of-Care Immunoassay. *Ophthalmol* 2016;123:2300–8.

Miano F, Calcara M, Millar TJ, Enea V. Insertion of tear proteins into a meibomian lipids film. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;44:49–55.

Miljanović B, Dana R, Sullivan DA, Schaumberg DA. Impact of Dry Eye Syndrome on Vision-Related Quality of Life. *Am J Ophthalmol* 2007;143:409–15.

Miller RB. Tear concentrations of sodium and potassium during adaptation to contact lenses. II. Potassium observations. *Am J Optom Arch Am Acad Optom* 1970;47:773–9.

Mircheff AK. Lacrimal fluid and electrolyte secretion: A review. *Curr Eye Res* 1989;8:607–17.

Misawa E, Tanaka M, Saito M, Nabeshima K, Yao R, Yamauchi K, et al. Protective effects of Aloe sterols against UVB-induced photoaging in hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2017;33:101–11.

Mishima S, Gasset A, Klyce SD, Baum JL. Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1966;5:264–76.

Miyake H, Kawano Y, Tanaka H, Iwata A, Imanaka T, Nakamura M. Tear volume estimation using a modified Schirmer test: A randomized, multicenter, double-blind trial comparing 3% diquafosol ophthalmic solution and artificial tears in dry eye patients. *Clin Ophthalmol* 2016;10:879–86.

Montés-Micó R. Role of the tear film in the optical quality of the human eye. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:1631–5.

Montés-Micó R, Cerviño A, Ferrer-Blasco T, García-Lázaro S, Ortí-Navarro S. Optical quality after instillation of eyedrops in dry-eye syndrome. *J Cataract Refract Surg* 2010;36:935–40.

Moore CP, Wilsman NJ, Nordheim E V, Majors LJ, Collier LL. Density and distribution of canine conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:1925–32.

Moore JE, Graham JE, Goodall EA, Dartt DA, Leccisotti A, McGilligan VE, et al. Concordance between common dry eye diagnostic tests. *Br J Ophthalmol* 2009;93:66–72.

Morris CA, Maltseva IA, Rogers VA, Ni J, Khong KT, Derringer CB, et al. Consequences of Preservative Uptake and Release by Contact Lenses. *Eye Contact Lens* 2018;44:247–55.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.

Moss SE, Klein R, Klein BEK. Prevalance of and risk factors for dry eye syndrome. *Arch Ophthalmol* 2000;118:1264–8.

Motolko M, Breslin CW. The effect of pH and osmolarity on the ability to tolerate artificial tears. *Am J Ophthalmol* 1981;91:781–4.

Mudgil P. Antimicrobial role of human

- meibomian lipids at the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:7272–7.
- Muntz A, Subbaraman LN, Sorbara L, Jones L. Tear exchange and contact lenses: A review. *J Optom* 2015;8:2–11.
- Murube J, Paterson A, Murube E. Classification of Artificial Tears. *Adv Exp Med Biol* 1998;438:693–704.
- Nagyová B, Tiffany JM. Components responsible for the surface tension of human tears. *Curr Eye Res* 1999;19:4–11.
- Nakamura S, Kinoshita S, Yokoi N, Ogawa Y, Shibuya M, Nakashima H, et al. Lacrimal hypofunction as a new mechanism of dry eye in visual display terminal users. *PLoS One* 2010;5.
- Nelson JD WJ. Impression cytology of the ocular surface in keratoconjunctivitis sicca. In: FJ H, editor. *preocular tear Film Heal. Dis. contact lens wear*, Lubbock, Texas: Dry Eye Institute; 1986, p. 140–56.
- Nguyen T, Latkany R. Review of hydroxypropyl cellulose ophthalmic inserts for treatment of dry eye. *Clin Ophthalmol* 2011;5:587–91.
- Ni Y, Turner D, Yates KM, Tizard I. Isolation and characterization of structural components of Aloe vera L. leaf pulp. *Int Immunopharmacol* 2004;4:1745–55.
- Nichols JJ, King-Smith PE. Thickness of the pre- and post-contact lens tear film measured in vivo by interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:68–77.
- Nichols JJ, Sinnott LT. Tear film, contact lens, and patient-related factors associated with contact lens-related dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1319–28.
- Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The Repeatability of Clinical Measurements of Dry Eye. *Cornea* 2004;23:272–85.
- Nilforoushan MR, Latkany RA, Speaker MG. Effect of artificial tears on visual acuity. *Am J Ophthalmol* 2005;140:830–5.
- No author. The management of dry eye. *Drug Ther Bull* 2016;54:9–12.
- Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther* 2001;18:205–15.
- Norn MS. Dessication of the precorneal film: I. Corneal Wetting-Time. *Acta Ophthalmol* 1969;47:865–80.
- Noushad B, Thomas J, Amin S V. Reliability of a modified logMAR distant visual acuity chart for routine clinical use. *Oman J Ophthalmol* 2012;5:87–90.
- O’leary DJ, Wilson G, Bergmanson J. The influence of calcium in the tear-side perfusate on desquamation from the rabbit corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1985;4:729–31.
- Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, Kallberg ME, Plummer CE, O’Reilly S, et al. Proteinases of the cornea and preocular tear film. *Vet Ophthalmol* 2007;10:199–206.
- Onwubiko SN, Eze BI, Udeh NN, Onwasigwe EN, Umeh RE. Dry eye disease: Concordance between the diagnostic tests in African eyes. *Eye Contact Lens* 2016;42:395–400.
- Oryan A, Naeini A, Nikahval B, Gorjlan E. Effect of aqueous extract of Aloe vera on experimental cutaneous wound healing in rats. *Vet Arch* 2010;80:509–22.
- Özcura F, Aydin S, Helvaci MR. Ocular surface disease index for the diagnosis of dry eye syndrome. *Ocul Immunol Inflamm* 2007;15:389–93.
- De Paiva CS. Effects of aging in dry eye. *Int Ophthalmol Clin* 2017;57:47–64.

- Park MY, Kwon HJ, Sung MK. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:828–32.
- Paugh J, Stapleton F, Keay L, Ho A. Tear exchange under hydrogel contact lenses: methodological considerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;42:2813–20.
- Paulsen AJ, Cruickshanks KJ, Fischer ME, Huang GH, Klein BEK, Klein R, et al. Dry eye in the beaver dam offspring study: Prevalence, risk factors, and health-related quality of life. *Am J Ophthalmol* 2014;157:799–806.
- Paulsen F, Langer G, Hoffmann W, Berry M. Human lacrimal gland mucins. *Cell Tissue Res* 2004;316:167–77.
- Paulsen FP, Corfield AP, Hinz M, Hoffmann W, Schaudig U, Thale AB, et al. Characterization of mucins in human lacrimal sac and nasolacrimal duct. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1807–13.
- Peng SY, Norman J, Curtin G, Corrier D, McDaniel HR, Busbee D. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. *Mol Biother Biother* 1991;3:79–87.
- Peral A, Pintor J. Ocular mucin visualization by confocal laser scanning microscopy. *Cornea* 2008;27:395–401.
- Pflugfelder S. Prevalence, burden, and pharmacoeconomics of dry eye disease - PubMed. *Am J Manag Care* 2008;14:S102-106.
- Pflugfelder SC, Farley W, Luo L, Chen LZ, De Paiva CS, Olmos LC, et al. Matrix metalloproteinase-9 knockout confers resistance to corneal epithelial barrier disruption in experimental dry eye. *Am J Pathol* 2005;166:61–71.
- Pflugfelder SC, De Paiva CS, Villarreal AL, Stern ME. Effects of sequential artificial tear and cyclosporine emulsion therapy on conjunctival goblet cell density and transforming growth factor- β 2 production. *Cornea* 2008;27:64–9.
- Pflugfelder SC, Solomon A, Dursun D, Li DQ. Dry eye and delayed tear clearance: “A call to arms.” *Adv Exp Med Biol* 2002;506 B:739–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0717-8_104.
- Pinheiro R, Panfil C, Schrage N, Dutescu RM. The Impact of Glaucoma Medications on Corneal Wound Healing. *J Glaucoma* 2016;25:122–7.
- Pinto-Fraga J, Blázquez Arauzo F, Urbano Rodríguez R, González-García MJ. Evaluation of safety and efficacy of a new multipurpose disinfecting solution on silicone hydrogel contact lenses. *J Optom* 2015;8:40–7.
- Pintor J, Martín-Gil A, Carracedo G, Urbano R, Ríos S. Cytotoxic Effect on Corneal Surface of Multipurpose Soft Contact Lens Solution Which Contains Aloe Vera. *Biochem Pharmacol* 2014;3:1.
- Prabhasawat P, Ruangvaravate N, Tesavibul N, Thewthong M. Effect of 0.3% hydroxypropyl methylcellulose/dextran versus 0.18% sodium hyaluronate in the treatment of ocular surface disease in glaucoma patients: A randomized, double-blind, and controlled study. *J Ocul Pharmacol Ther* 2015;31:323–9.
- Pucker AD. A Review of the Compatibility of Topical Artificial Tears and Rewetting Drops with Contact Lenses. *Cont Lens Ant Eye* 2020;12:S1367-0484(20)30086-2.
- Pucker AD, Haworth KM. The presence and significance of polar meibum and tear lipids. *Ocul Surf* 2015;13:26–42.
- Pucker AD, Ng SM, Nichols JJ. Over the counter (OTC) artificial tear drops for dry

eye syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;23:CD009729.

Pugh N, Ross SA, ElSohly MA, Pasco DS. Characterization of aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. *J Agric Food Chem* 2001;49:1030–4.

Raksha B. Bioactive Compounds and Medicinal Properties of *Aloe Vera L.*: An Update. *J Plant Sci* 2014;2:102.

Ramamoorthy P, Sinnott LT, Nichols JJ. Contact lens material characteristics associated with hydrogel lens dehydration. *Ophthalmic Physiol Opt* 2010;30:160–6.

Rantamäki AH, Seppänen-Laakso T, Oresic M, Jauhiainen M, Holopainen JM. Human tear fluid lipidome: From composition to function. *PLoS One* 2011;6:19553.

Reddy I, Aziz W, Sause R. Artificial tear formulations, irrigating solutions and contact lens products. In: IK R, editor. *Ocul. Ther. drug Deliv. A Multidiscip. approach.*, Technomic Publications; 1996, p. 171–211.

Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios. REGULATION (EU) 2017/745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on medical devices 2017.

Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación. Classification rules (Annex VIII Chapter III of REGULATION (EU) 2017/745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on medical devices) 2017a.

Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación. Classification rules (Annex VIII Chapter III 5. Invasive devices 5.1 Rule 5 of REGULATION (EU) 2017/745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT

AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on medical devices) 2017b.

Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación. Classification rules (Annex VIII Chapter I Definitions specific to classification rules 1. Duration of use of REGULATION (EU) 2017/745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on medical devices) 2017c.

Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de clasificación. Classification rules (Annex VIII Chapter III 7. Special rules 7.3 Rule 16 of REGULATION (EU) 2017/745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on medical devices 2017d.

Reglamento de la Unión Europea para productos sanitarios Reglas de Clasificación. Annex VIII Chapter I Definitions specific to classification rules 2. Invasive and active devices 2.1 “Body orifice” of REGULATION (EU) 2017/745 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 5 April 2017 on medical devices) 2017.

Reinhart RA. Magnesium Metabolism: A Review With Special Reference to the Relationship Between Intracellular Content and Serum Levels. *Arch Intern Med* 1988;148:2415–20.

Reynolds T, Dweck AC. *Aloe vera* leaf gel: A review update. *J Ethnopharmacol* 1999;68:3–37.

Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: Absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med* 2004;36:827–8.

Ridder WH, LaMotte J, Hall JQ. Contrast sensitivity and tear layer aberrometry in dry eye patients. *Optom Vis Sci* 2009;86:E1059–68.

Ridder WH, Lamotte JO, Ngo L, Fermin J. Short-term effects of artificial tears on

- visual performance in normal subjects. *Optom Vis Sci* 2005a;82:370–7..
- Ridder WH, Tomlinson A, Paugh J. Effect of artificial tears on visual performance in subjects with dry eye. *Optom Vis Sci* 2005b;82:835–42.
- Rieger G. Contrast sensitivity in patients with keratoconjunctivitis sicca before and after artificial tear application. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993;231:577–9.
- Rismondo V, Osgood TB, Leering P, Hattenhauer MG, Ubels JL, Edelhauser HF. Electrolyte composition of lacrimal gland fluid and tears of normal and vitamin A-deficient rabbits. *CLAO J* 1989;15:222–8.
- Ro JY, Lee BC, Kim JY, Chung YJ, Chung MH, Lee SK, et al. Inhibitory mechanism of aloe single component (alprogen) on mediator release in guinea pig lung mast cells activated with specific antigen- antibody reactions. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:114–21.
- Rodrigues D, Viotto AC, Checchia R, Gomide A, Severino D, Itri R, et al. Mechanism of Aloe Vera extract protection against UVA: Shelter of lysosomal membrane avoids photodamage. *Photochem Photobiol Sci* 2016;15:334–50.
- Rolando M, Lester M, Macrí A, Calabria G. Low spatial-contrast sensitivity in dry eyes. *Cornea* 1998;17:376–9..
- Saarinen-Savolainen P, Järvinen T, Araki-Sasaki K, Watanabe H, Urtti A. Evaluation of cytotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in an immortalized human corneal epithelial cell line. *Pharm Res* 1998;15:1275–80.
- Sack RA, Nunes I, Beaton A, Morris C. Host-defense mechanism of the ocular surfaces. *Biosci Rep* 2001;21:463–80.
- Sambursky R, OBrien TP. MMP-9 and the perioperative management of LASIK surgery. *Curr Opin Ophthalmol* 2011;22:294–303.
- Sanchez MA, Torralbo-Jimenez P, Giron N, De La Heras B, Herrero Vanrell R, Arriola-Villalobos P, et al. Comparative analysis of carmellose 0.5% versus hyaluronate 0.15% in dry eye: A flow cytometric study. *Cornea* 2010;29:167–71.
- Sarkar N, Walker LC. Hydration-dehydration properties of methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. *Carbohydr Polym* 1995;27:177–85.
- Schargus M, Ivanova S, Kakkassery V, Dick HB, Joachim S. Correlation of tear film osmolarity and 2 different MMP-9 tests with common dry eye tests in a cohort of non-dry eye patients. *Cornea* 2015;34:739–44.
- Schaumberg DA, Uchino M, Christen WG, Semba RD, Buring JE, Li JZ. Patient Reported Differences in Dry Eye Disease between Men and Women: Impact, Management, and Patient Satisfaction. *PLoS One* 2013;8.
- Schotanus MP, Koetje LR, Van Dyken RE, Ubels JL. Stratified corneal limbal epithelial cells are protected from UVB-induced apoptosis by elevated extracellular K⁺. *Exp Eye Res* 2011;93:735–40.
- Shumway CL, Wade M. *Anatomy, Head and Neck, Eye Conjunctiva*. 2018.
- Sibony PA, Walcott B, Mckeon C, Jakobiec FA. Vasoactive Intestinal Polypeptide and the Innervation of the Human Lacrimal Gland. *Arch Ophthalmol* 1988;106:1085–8.
- Sindt CW, Longmuir RA. Contact lens strategies for the patient with dry eye. *Ocul Surf* 2007;5:294–307.
- Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: Emerging roles for matrix

metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:1–14.

Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, Easty DL. Tear film MMP accumulation and corneal disease. *Br J Ophthalmol* 2001;85:147–53.

Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder S. 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;42:2283–92.

Somboonwong J, Jariyapongskul A, Thanamitramanee S, Patumraj S. Therapeutic effects of aloe vera on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats. *J Med Assoc Thai* 2000;83:417–25.

Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I. Assay of mucins in human tear fluid. *Exp Eye Res* 2007;84:939–50.

Stahl U, Willcox M, Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics. *Clin Exp Optom* 2012;95:3–11.

Stalmans I, Mégevand GS, Cordeiro MF, Hommer A, Rossetti L, Goñi F, et al. Preservative-free treatment in glaucoma: Who, when, and why? *Eur J Ophthalmol* 2013;23:518–25.

Stapleton F, Alves M, Bunya VY, Jalbert I, Lekhanont K, Malet F, et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf* 2017;15:334–65.

Stapleton F, Garret Q, Chan C, Craig J. The epidemiology of dry eye disease. In: C C, editor. *Dry Eye A Pract. approach. Essentials Ophthalmol.*, Berlin: Springer-Verlag; 2015, p. 21–9.

Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 2015;574:193–203.

Stewart WC, Stewart JA, Nelson LA.

Ocular surface disease in patients with ocular hypertension and glaucoma. *Curr Eye Res* 2011;36:391–8.

Strickland FM, Darvill A, Albersheim P, Eberhard S, Pauly M, Pelley RP. Inhibition of UV-Induced Immune Suppression and Interleukin-10 Production by Plant Oligosaccharides and Polysaccharides. *Photochem Photobiol* 1999;69:141.

Strickland FM, Pelley RP, Kripke ML. Prevention of ultraviolet radiation-induced suppression of contact and delayed hypersensitivity by Aloe barbadensis gel extract. *J Invest Dermatol* 1994;102:197–204.

Stull C, Valdes-Rodriguez R, Shafer BM, Shevchenko A, Nattkemper LA, Chan Y-H, et al. The prevalence and characteristics of chronic ocular itch: a cross-sectional survey. *Itch* 2017;2:e4.

Sullivan BD, Crews LA, Messmer EM, Foulks GN, Nichols KK, Baenninger P, et al. Correlations between commonly used objective signs and symptoms for the diagnosis of dry eye disease: Clinical implications. *Acta Ophthalmol* 2014;92:161–6.

Sullivan DA, Rocha EM, Aragona P, Clayton JA, Ding J, Golebiowski B, et al. TFOS DEWS II Sex, Gender, and Hormones Report. *Ocul Surf* 2017;15:284–333.

Surjushe A, Vasani R, Saple D. Aloe vera: A short review. *Indian J Dermatol* 2008;53:163–6.

Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, Rosler KHA, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2463–6.

Szczesna-Iskander DH, Iskander DR, Read SA, Alonso-Caneiro D. Noninvasive in vivo assessment of soft contact lens type on tear film surface quality. *Invest Ophthalmol Vis Sci*

2012;53:525–31.

Szczesna DH, Alonso-Caneiro D, Iskander DR, Read SA, Collins MJ. Lateral shearing interferometry, dynamic wavefront sensing, and high-speed videokeratoscopy for noninvasive assessment of tear film surface characteristics: a comparative study. *J Biomed Opt* 2010;15:037005.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K ichi, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986;93:157–65.

Takahashi Y, Hayashi T, Koike M, Sakaguchi H, Kuwahara H, Nishiyama N. An interlaboratory study of the short time exposure (STE) test using SIRC cells for predicting eye irritation potential. *Cutan Ocul Toxicol* 2010;29:77–90.

Takahashi Y, Koike M, Honda H, Ito Y, Sakaguchi H, Suzuki H, et al. Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. *Toxicol Vitro* 2008;22:760–70.

Tiffany JM, Winter N, Bliss G. Tear film stability and tear surface tension. *Curr Eye Res* 1989;8:507–15.

Toda I, Shinozaki N, Tsubota K. Hydroxypropyl Methylcellulose for the Treatment of Severe Dry Eye Associated with Sjögren's Syndrome. *Cornea* 1996;15:120–8.

Tognoni G. [The new Helsinki declaration]. *Assist Inferm Ric* 2009;28:49–51.

Tomlinson A, Khanal S. Assessment of tear film dynamics: Quantification approach. *Ocul Surf* 2005;3:81–95.

Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: Determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4309–15.

Tong L, Petznick A, Lee S, Tan J. Choice of artificial tear formulation for patients with dry eye: Where do we start? *Cornea* 2012;31:S32-6.

Torok M. Dry-eye syndrome treated with eye drops (Isopto®-Naturale) containing hydroxypropylmethyl. *Klin Monbl Augenheilkd* 1985;187:60–2.

Torricelli AAM, Wilson SE. Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity. *Exp Eye Res* 2014;129:151–60.

Trees GR, Tomlinson A. Effect of artificial tear solutions and saline on tear film evaporation. *Optom Vis Sci* 1990;67:886–90.

Tsubota K, Xu K, Fujihara T, Katagiri S, Takeuchi T. Decreased Reflex Tearing Is Associated With Lymphocytic Infiltration in Lacrimal Glands - PubMed. *J Rheumatol* 1996;23:313–20.

Tyagi G, Alonso-Caneiro D, Collins M, Read S. Tear film surface quality with rigid and soft contact lenses. *Eye Contact Lens* 2012;38:171–8.

Ubels JL, Schotanus MP, Bardolph SL, Haarsma LD, Koetje LR, Louters JR. Inhibition of UV-B induced apoptosis in corneal epithelial cells by potassium channel modulators. *Exp Eye Res* 2010;90:216–22.

Uchino M, Schaumberg DA. Dry Eye Disease: Impact on Quality of Life and Vision. *Curr Ophthalmol Rep* 2013;1:51–7.

Uchino M, Uchino Y, Dogru M, Kawashima M, Yokoi N, Komuro A, et al. Dry eye disease and work productivity loss in visual display users: The Osaka study. *Am J Ophthalmol* 2014;157:294–300.

UNE-EN ISO 14155. AENOR. Investigación clínica de productos sanitarios para humanos. Buenas prácticas clínicas. UNE-EN ISO 14155:

2011 2011.

Ünlü C, Güney E, Akçay BIS, Akçali G, Erdoğan G, Bayramlar H. Comparison of ocular-surface disease index questionnaire, tearfilm break-up time, and Schirmer tests for the evaluation of the tearfilm in computer users with and without dry-eye symptomatology. *Clin Ophthalmol* 2012;6:1303–6.

Urch D. Aloe vera the plant. Aloe vera nature's Gift, Bristol, United Kingdom: Blackdown; 1999, p. 8–17.

Vázquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. *J Ethnopharmacol* 1996;55:69–75.

Versura P, Maltarello MC, Siecher F, Caramazza R, Laschi R. Dry eye before and after therapy with hydroxypropyl methylcellulose: Ultrastructural and cytochemical study in 20 patients. *Ophthalmologica* 1989;198:152–62.

Viso E, Rodriguez-Ares MT, Gude F. Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (The Salnes Eye Study). *Ophthalmic Epidemiol* 2009;16:15–21.

Vistica DT, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Res* 1991;51:2515–20.

Wallace-Tucker A. An in-depth look at lens-related dry eye. *Cont Lens Spectr* 2012;27:32–6.

Watanabe H. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea*, vol. 21, 2002.

Wilensky JT. Diurnal variations in intraocular pressure. *Trans Am Ophthalmol Soc*, vol. 89, 1991, p. 757–90.

Williams RC, Gibbons RJ. Inhibition of

bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: A mechanism of antigen disposal. *Science* (80-) 1972;177:697–9.

Wilson G, Bachman W, Call P. A nutritional role for tears. In: Holly FJ, Lamberts DW MD, editor. *preocular Tear Film Heal. Dis. Contact Lens Wear*, Lubbock, Texas: Dry Eye Institute; 1986, p. 978–87.

Wolff E. The muco-cutaneous junction of the lidmargin and the distribution of the tear fluid. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1946;66:291–308.

Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K, et al. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf* 2017;15:539–74.

Womble D, Helderman JH. Enhancement of allo-responsiveness of human lymphocytes by acemannan (Carrisyn™). *Int J Immunopharmacol* 1988;10:967–74.

Woodward AM, Senchyna M, Argüeso P. Differential contribution of hypertonic electrolytes to corneal epithelial dysfunction. *Exp Eye Res* 2012;100:98–100.

Woźniak A, Paduch R. Aloe vera extract activity on human corneal cells. *Pharm Biol* 2012;50:147–54.

Xiang H, Cao F, Ming D, Zheng Y, Dong X, Zhong X, et al. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017;101:6671–81.

Yamada M, Mizuno Y, Shigeyasu C. Impact of dry eye on work productivity. *Clin Outcomes Res* 2012;4:307–12.

Yeo ACH, Carkeet A, Carney LG, Yap MKH. Relationship between goblet cell density and tear function tests. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003;23:87–94.

Yu DF, Chen Y, Han JM, Zhang H, Chen XP, Zou WJ, et al. MUC19 expression in human ocular surface and lacrimal gland and its alteration in Sjögren syndrome patients. *Exp Eye Res* 2008;86:403–11.

Zhu H, Chauhan A. Effect of viscosity on tear drainage and ocular residence time. *Optom Vis Sci* 2008;85:715–25.

Zierhut M, Dana MR, Stern ME, Sullivan DA. Immunology of the lacrimal gland

and ocular tear film. *Trends Immunol* 2002;23:333–5.

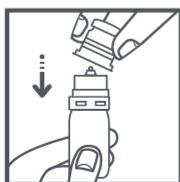
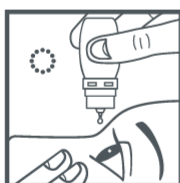
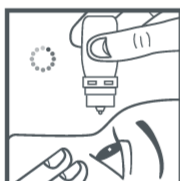
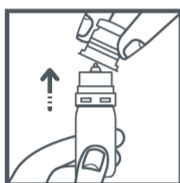
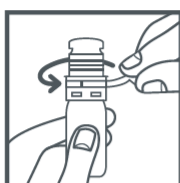
Zuazo F, López-Ponce D, Salinas-Toro D, Valenzuela F, Sans-Puroja J, Srur M, et al. Citología de impresión conjuntival en pacientes con valores OSDI normales y alterados. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2014;89:391–6.

ANEXOS

I. ANEXO

PROS812.2

AVIZOR

PRESERVATIVE
FREE

0318

STERILE A

AVIZOR S.A.
La cañada 13-17
28850 Torrejón de Ardoz, Madrid (SPAIN)lacrifresh®
aloe**INDICACIONES:**

Lacrifresh Aloe es un producto multidosis sin conservante que está especialmente indicado para el alivio de las irritaciones leves de los ojos provocadas por la contaminación, ambientes secos y cargados de polvo, humo, uso prolongado de lentes de contacto, agua clorada (piscinas) y otros agentes irritantes.

También está indicado para la humectación y lubricación de lentes de contacto. En usuarios de lentes de contacto proporciona una alta lubricación facilitando su colocación, mejorando el confort visual y el porte de la lente. El producto es compatible con todo tipo de lentes de contacto.

INSTRUCCIONES DE USO:

1. Lavar, aclarar y secarse las manos antes de la aplicación. 2. Coger un frasco de Lacrifresh Aloe, tirar del precinto de seguridad en sentido contrario a las agujas del reloj y retirar la tapa protectora. 3. Uso directo: Instilar una o dos gotas en cada ojo y parpadear varias veces. 4. Uso en lente de contacto: Aplicar una o dos gotas en la cara interna de la lente antes de llevarla al ojo. 5. Después de cada administración vuelve a colocar la tapa protectora. 6. Utilizar el producto según sus necesidades hasta un máximo de 8 veces al día. *Fecha de la última revisión: 2017/03.*

PRECAUCIONES:

- No ingerir y mantener fuera del alcance de los niños.
- No usar el producto en caso de alergia a alguno de sus componentes.
- En caso de reacción adversa o molestia, consultar con un especialista.
- Una vez abierto el frasco, utilizar el producto durante un máximo de 90 días.
- Evitar que la punta del envase entre en contacto con los ojos o cualquier otra superficie para evitar su contaminación.
- No apriete el frasco con la tapa protectora colocada.
- No utilizar el producto si el precinto de seguridad está roto o ausente, o el envase esté dañado.
- Conservar el producto a temperatura ambiente.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- No usar el producto en combinación con un tratamiento farmacológico o cualquier otro producto que se aplique sobre la superficie ocular, ya que podrían alterarse las funciones de ambos.
- Mantener el frasco bien cerrado después de cada uso.

COMPOSICIÓN: Aloe vera, hipromelosa, electrolitos esenciales (Cl⁻, Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺) en solución acuosa, tamponada e isotónica.

lacrifresh®
aloe**GEBUIK:**

Lacrifresh Aloe is een conserveermiddelvrij product voor multidosering, speciaal bestemd voor het verlichten van de symptomen van milde oogirritaties door verontreiniging, droge of stoffige omgevingen, rook, verlengd gebruik van contactlenzen, gechloreerd water (zwembaden) en andere irriterende stoffen.

Het is ook aangewezen voor de bevochtiging en lubrificering van contactlenzen. Voor de dragers van contactlenzen biedt het een uitstekende lubrificering, wat het indoen van de lens gemakkelijk, het visueel comfort verhoogt en het dragen van de lens verbetert. Dit product is compatibel met alle soorten contactlenzen.

GEBUIKSAANWIJZING:

1. Was, spoel en droog uw handen alvorens dit product te gebruiken. 2. Neem een fles Lacrifresh Aloe, draai de verzegeling linksom en verwijder de beschermop. 3. Direct gebruik: breng één of twee druppels aan in elk oog en knipper meermaals. 4. Gebruik met contactlenzen: één of twee druppels op de binnenkant van beide lenzen druppelen alvorens deze op het oog te plaatsen. 5. De beschermop na iedere toediening terugplaatsen. 6. Gebruik het product, naargelang uw behoeften, tot 8 keer per dag. *Datum van laatste herziening: 2017/03.*

VOORZORGSMAATREGELEN:

- Niet inslikken en buiten het bereik van kinderen houden.
- Gebruik het product niet als u allergisch bent voor een van de bestanddelen.
- Als u oogirritatie of een bijwerking ondervindt, gelieve een specialist te raadplegen.
- Als de fles eenmaal is geopend, kan het product maximaal 90 dagen worden gebruikt.
- Zorg ervoor dat de punt van de fles niet met de ogen of enig ander oppervlak in aanraking komt, om besmetting te voorkomen.
- Niet in de fles knippen met de beschermop erop.
- Het product niet gebruiken als de verzegeling is verbroken of ontbreekt, of wanneer de fles is beschadigd.
- Het product bij kamertemperatuur bewaren.
- Het product niet gebruiken na de vervaldatum.
- Het product niet gebruiken in combinatie met een farmacologische behandeling of andere producten die op het oogoppervlak worden aangebracht, omdat de werking van beide mogelijk wordt beïnvloed.
- Na elk gebruik de fles zorgvuldig sluiten.

SAMENSTELLING:

Aloë vera, hypromellose, essentiële elektrolyten (Cl⁻, Na⁺, Ca²⁺, K⁺, Mg²⁺) in waterige, gebufferde, isotone oplossing.

II. ANEXO

ARTÍCULOS PUBLICADOS (6)

- GONZALO CARRACEDO; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; AMAIA MARTÍN HERMOSO; ALBA MARTIN GIL; JESÚS PINTOR. “**Post-lens tear turbidity and visual quality after scleral lens wear**”. Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology.
- GONZALO CARRACEDO; MARIA SERRAMITO BLANCO; ALBA MARTIN GIL; ZICHENG WANG; CANDELA RODRIGUEZ POMAR; JESUS PINTOR. “**Post-lens tear turbidity and visual quality after scleral lens wear**”. Clinical & Experimental Optometry. 2017; 100(6): 577-582.
- CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; JESÚS PINTOR; BASILIO COLLIGRIS; GONZALO CARRACEDO. “**Therapeutic inhibitors for the treatment of dry eye syndrome**”. Expert opinion on pharmacotherapy. 2017; 18(7): 1855-1865.
- GONZALO CARRACEDO; CRISTINA PASTRANA; MARIA SERRAMITO; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR. “**Evaluation of tear meniscus by optical coherence tomography after different sodium hyaluronate eyedrops instillation**”. Acta Ophthalmologica. 2019; 92(2): e162-e169.
- GONZALO CARRACEDO; ALEJANDRO MARTÍNEZ-ÁGUILA; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; JULIA BODAS ROMERO; JUAN SÁNCHEZ-NAVES; JESÚS PINTOR. “**Effect of nutritional supplement based on melatonin on the intraocular pressure in normotensive subjects**”. International ophthalmology. 2020; 40(2): 419-422.
- CARLOS CARPENA TORRES; JESÚS PINTOR; FERNANDO HUETE-TORAL; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; ALEJANDRO MARTÍNEZ

ÁGUILA; GONZALO CARRACEDO. **“Preclinical development of artificial tears based on an extract of Artemia salina containing dinucleotides in rabbits”**. Current Eye Research. 2020; 7: 1-5.

COMUNICACIONES Y CONTRIBUCIONES A CONGRESOS (29)

- Título del trabajo: TINCIONES CORNEALES DE ETIOLOGÍA MECÁNICA DERIVADAS DEL USO DE LENTES DE CONTACTO Nombre del congreso: VISER (Vision Sciences and Eye Research Meeting) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Santiago de Compostela Fecha de celebración: 22-23 de Noviembre de 2014 Ciudad entidad organizadora: Santiago de Compostela, España CANDELA RODRÍGUEZ POMAR

- Título del trabajo: Ocular surface Temperature and osmolarity in Sjögren syndrome patients; Nombre del congreso: CIOCV 2015 (Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 25-26 Abril 2015 Ciudad entidad organizadora: Braga, Universidade do Minho, CANDELA RODRIGUEZ POMAR; AMAIA MARTIN HERMOSO; ALBA MARTIN GIL; JESÚS PINTOR; GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: Temperatura de la superficie ocular en pacientes con síndrome de Sjögren: OPTOM 2016 (Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Madrid, España Fecha de celebración: 8-10 Abril 2016 Ciudad entidad organizadora: Madrid, ALEJANDRO MARTÍNEZ ÁGUILA; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; AMAIA MARTIN HERMOSO; ALBA MARTIN GIL; JESUS PINTOR, MARIA JESÚS PÉREZ DE LARA, GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: Evaluación de marcadores de ojo seco tras el uso de lentes de contacto esclerales; Nombre del congreso: OPTOM 2016 (Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional no UE Tipo de participación:

Comunicación oral Ciudad de celebración: Madrid, España Fecha de celebración: 8-10 Abril de 2016 Ciudad entidad organizadora: Madrid; MARIA SERRAMITO BLANCO; ALBA MARTIN GIL; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; JESÚS CARBALLO; JESÚS PINTOR; GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: Evaluación de biomarcadores moleculares en pacientes con Síndrome de Sjögren Nombre del congreso: OPTOM 2016 (Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Comunicación oral Ciudad de celebración: Madrid, España Fecha de celebración: 8-10 Abril 2016 Ciudad entidad organizadora: Madrid CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; AMAIA MARTIN HERMOSO; ALBA MARTIN GIL; MARIA JESÚS PÉREZ DE LARA; MARIA SERRAMITO; JESÚS PINTOR; GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: Sensitivity and Specificity of diadenosine tetraphosphate as dry eye biomarker; Nombre del congreso: CIOCV 2016 (Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 23-24 Abril 2016 Ciudad entidad organizadora: Braga Universidade do Minho. CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; MARIA SERRAMITO; FERNANDO HUETE TORAL; JESÚS PINTOR; GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: Postlens tear turbidity and visual quality after scleral lens wear. Nombre del congreso: GSLS 2017 (Global Specialty Lens Symposium) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Las Vegas, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 26-29 Enero 2017 Ciudad entidad organizadora: Estados Unidos de América GONZALO CARRACEDO, MARIA SERRAMITO, CANDELA RODRÍGUEZ POMAR, ALBA MARTIN GIL, JESÚS CARBALLO, JESÚS PINTOR.

- Título del trabajo: Evaluation of the antiinflammatory effect of an humectant solution base on Aloe vera Nombre del congreso: CIOCV 2017 (Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 22-23 Abril 2017 Ciudad entidad organizadora: Braga, Universidade do Minho CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; MARÍA SERRAMITO BLANCO; CARLOS CARPENA TORRES, MARIA JESUS PEREZ DE LARA; GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: In vivo wettability changes after tear substitutes instillation in hydrophilic contact lens users Nombre del congreso: CIOCV 18 (Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 28-29 Abril 2018 Ciudad entidad organizadora: Braga, Universidade do Minho CANDELA RODRIGUEZ POMAR; CRISTINA PASTRANA; CARLOS CARPENA TORRES; JESUS PINTOR; GONZALO CARRACEDO

- Título del trabajo: How long should it be waited to evaluate soft contact lenses after its insertion? Nombre del congreso: CIOCV 18 (Congresso Internacional de Optometria e Ciências da Visão) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 28-29 Abril 2018 Ciudad entidad organizadora: Braga, Universidade do Minho CRISTINA PASTRANA; CARLOS CARPENA; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; MARIA SERRAMITO; GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: Sensibilidad y especificidad del diadenosina tetrafosfato como biomarcador objetivo de ojo seco Nombre del congreso: OPTOM 2018 (Congresso Internacional de optometría, contactología y óptica oftálmica) Tipo de evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster

Ciudad de celebración: Madrid, España Fecha de celebración: 13-15 Abril 2018
Ciudad entidad organizadora: Madrid CANDELA RODRÍGUEZ POMAR, MARÍA SERRAMITO, FERNANDO HUETE, MARIA JESÚS PÉREZ DE LARA, JESÚS PINTOR, GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: Evaluación de las propiedades humectantes e anti-inflamatorias de una solución basada en Aloe vera Nombre del congreso: Optom 2018 (Congreso Internacional de optometría, contactología y óptica oftálmica) Tipo de evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Comunicación oral Ciudad de celebración: Madrid, España Fecha de celebración: 13-15 Abril 2018 Ciudad entidad organizadora: Madrid GONZALO CARRACEDO; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR, CARLOS CARPENA; MARÍA SERRAMITO, MARIA JESÚS PÉREZ DE LARA, JESÚS PINTOR.

- Título del trabajo Estabilización de la humectación in vivo, comfort y calidad visual tras la inserción de lentes de contacto hidrofílicas Nombre del congreso: OPTOM 2018 (Congreso Internacional de optometría, contactología y óptica oftálmica) Tipo de evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Madrid, España Fecha de celebración: 13-15 Abril 2018 Ciudad entidad organizadora: Madrid CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; CRISTINA PASTRANA; CARLOS CARPENA; MARIA SERRAMITO; GONZALO CARRACEDO.

- Título del trabajo: In vitro and in vivo correlation between osmolarity and nucleotides in Sjögren syndrome patients Nombre del congreso: CIOCV 19 (Congreso Internacional de Optometria e Ciências da Visão) Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Braga, Portugal Fecha de celebración: 4-5 Mayo 2019 Ciudad entidad organizadora: Braga, Universidade do Minho CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; AMAIA MARTIN HERMOSO; ALBA MARTIN GIL; ANA GUZMÁN ARÁNGUEZ; JESÚS PINTOR; GONZALO CARRACEDO; JESUS PINTOR.

- Título del trabajo: Evaluation of the anti-inflammatory effect of an ophthalmic tear substitute base don a combination of Aloe vera and hydroxypropylmethylcellulose Nombre del congreso: PhDay Complutense Tipo de evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster Ciudad de celebración: Madrid, España Fecha de celebración: 7 Noviembre 2019 Ciudad entidad organizadora: Universidad Complutense de Madrid CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; MARÍA SERRAMITO BLANCO; CARLOS CARPENA.

- Título del trabajo: Stimulation of tear secretion with eye drops base don an extract of Artemia salina containing dinucleotides in rabbits Nombre del congreso: ARVO Annual Meeting Abstract Tipo evento: Congreso Ámbito geográfico: Internacional Tipo de participación: Póster (Presentación online) Ciudad de celebración: Baltimore, Estados Unidos de América Fecha de celebración: 3-7 Mayo 2020 Ciudad entidad organizadora: Baltimore CARLOS CARPENA TORRES; JESÚS PINTOR; FERNANDO HUETE TORAL; CANDELA RODRÍGUEZ POMAR; ALEJANDRO MARTÍNEZ ÁGUILA; GONZALO CARRACEDO.