

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**ESCUELA UNIVERSITARIA DE ÓPTICA**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**DINUCLEÓTIDOS COMO MARCADORES  
MOLECULARES DE OJO SECO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez**

Bajo la dirección del doctor

Jesús Pintor Just

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-3116-0**

**© Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez, 2010**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**ESCUELA UNIVERSITARIA DE ÓPTICA**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



**DINUCLEÓTIDOS COMO MARCADORES  
MOLECULARES DE OJO SECO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez**

Bajo la dirección del Doctor

Jesús Pintor Just

Madrid, 2010



Dr. JESÚS PINTOR JUST, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV DE LA ESCUELA UNIVERSITARIA DE ÓPTICA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Dinucleótidos como marcadores moleculares de ojo seco”, de la que es autor el alumno de doctorado en Óptica, Optometría y Visión D. Juan Gonzalo Carracedo Rodríguez, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Escuela Universitaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del que suscribe y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Madrid, a        de        de        2010

El Director de la Tesis Doctoral,

Dr. Jesús Pintor Just



A Pilar y Diego,

**"Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar."  
(Antonio Machado)**



## AGRADECIMIENTOS

Ya hace 13 años que comencé este camino hacia un sueño cuando os dije, Sunti y Suso, que quería investigar, y vosotros me adoptasteis. Nunca me cansaré de agradecer esta oportunidad que me disteis de conocer el mundo con el que siempre soñé. Suso, contigo siempre es un gusto hablar, y da igual de lo que sea, siempre aprendo algo, y no estoy hablando solo de ciencia. Y a ti Sunti, solo puedo decirte que esta tesis es también tuya, sin tu trabajo y tus enseñanzas yo no estaría escribiendo estos párrafos. Gracias a los dos por vuestra amistad y cariño.

Gracias a Teresa, Basilio, Marta, Ana, Almudena, Patri, Mamen, María, Conchi y Javier por compartir muchos momentos en el laboratorio. Gracias a Arancha por tus consejos vía Facebook (¡menudo invento!). A Pilar, futura compañera departamento. A Charles por tu ayuda en la revisión de los artículos. Gracias a Alba y Fernando por vuestro buen humor, este último año me habéis alegrado muchos días.

Gracias a Jesús, el señor de los anillos, por permitirme ser tu amigo y por transmitirme esa tranquilidad de la que a veces me olvido.

Gracias a todos mis compañeros de la Escuela de Óptica, especialmente a todos aquellos con los que he pasado muchas horas en la clínica. A Marta, Alba (¡tú otra vez!), Elena, Leticia, Ruben y Laura, esos becarios que me han ayudado más de lo que ellos creen. A Isabel por su comprensión y su ayuda cuando he necesitado de la clínica para este trabajo.

A Guadalupe, Ángel y Yolanda por hacer que el master previo al doctorado fuera mucho más llevadero. A Carmen Nieto por su paciencia para aclararme todas las dudas estadísticas.

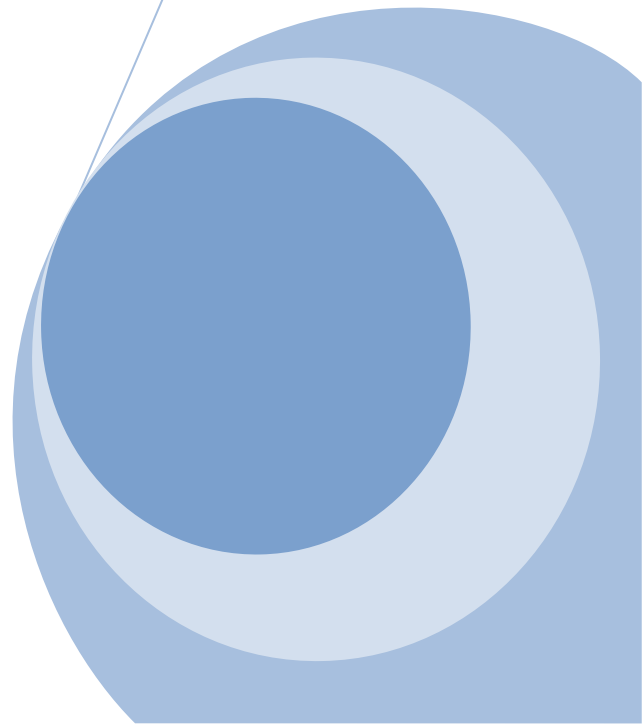
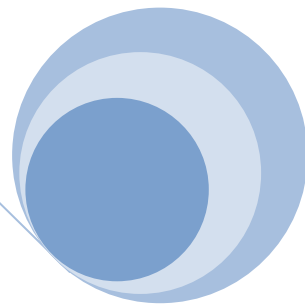
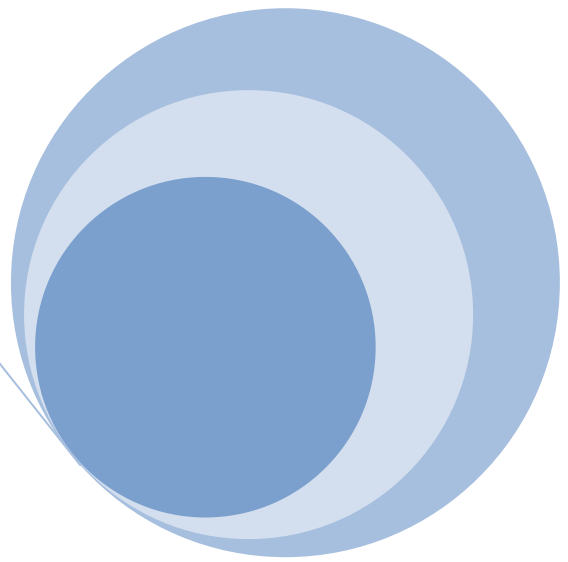
A José Manuel, Jorge, Queiros, Paulo, João,... y toda la gente de la Universidade do Minho que hicieron que me sintiera como en casa durante mi estancia en Braga. A Juana Gallar, Carlos Belmonte, Isabel Cacho y Juan Sánchez por su colaboración impagable. A la Asociación española de Síndrome de Sjögren y a la Asociación española de Aniridia congénita, en especial a Rosa, Yolanda y Marta.

A mis primos Jorge y Lurdes y mis tíos Teresa y Jorge por acogerme durante mi estancia en Portugal. Muito obrigado.

Gracias a mis padres Albina y Ovidio y mi hermana Belén, a mis suegros Pilar y Ciriaco y a mis cuñados Alicia, José y Eduardo por estar siempre cuando os necesito. Y a mis amigos por sus ánimos y apoyo.

Y por último, gracias a las dos personas más importantes en mi vida. Gracias Pilar por estar ahí siempre que lo he necesitado, por soportar mi mal humor, mis preocupaciones y mis miedos. Gracias por tus ánimos para conseguir mis sueños. Gracias por todo. Y a ti Diego, gracias por existir y hacerme tan feliz. Os quiero.

# Índice



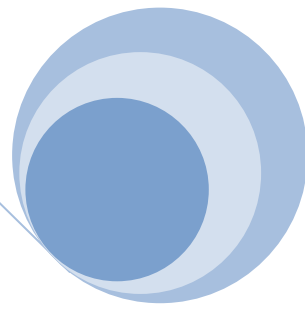
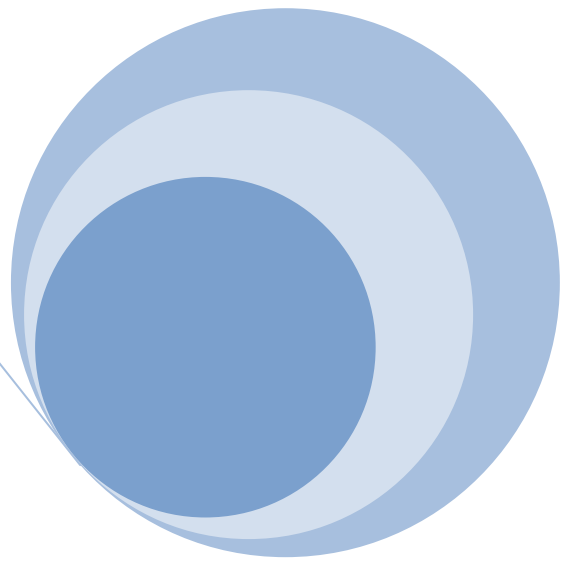


<b>1. ABREVIATURAS.....</b>	<b>15</b>
<b>2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>19</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Diadenosina polifosfatos.....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Estructura y características.....	27
3.1.2. Receptores P2 para diadenosin polifosfatos.....	30
3.1.2.1. Receptores P2X.....	30
3.1.2.2. Receptores P2Y.....	32
3.1.3. Almacenamiento y liberación de los diadenosin polifosfatos.....	34
<b>3.2. Importancia de los diadenosin polifosfatos en el ojo.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Efecto en la secreción lagrimal.....	37
3.2.2. Efecto sobre la cicatrización corneal epitelial.....	40
3.2.3. Presencia en el humor acuoso y efecto sobre la presión intraocular.....	42
3.2.4. Efecto sobre la producción de lisozima.....	44
3.2.5. Diadenosin polifosfatos en la retina.....	44
<b>3.3. Síndrome de ojo seco.....</b>	<b>46</b>
3.3.1 Definición: Signos y síntomas.....	46
3.3.2. Prevalencia y clasificación.....	48
3.3.3. Patogénesis.....	52
3.3.4. Diagnóstico.....	54
3.3.5. Tratamiento.....	56
3.3.6. Síndrome Sjögren.....	59
3.3.7. Ojo seco post cirugía refractiva.....	61
<b>3.4. Aniridia congénita.....</b>	<b>64</b>
3.4.1 Definición.....	64
3.4.2. Signos y síntomas de la superficie ocular.....	65
3.4.3. Otros signos oculares.....	69
<b>4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>71</b>
<b>4.1. Hipótesis.....</b>	<b>73</b>
<b>4.2. Objetivos.....</b>	<b>75</b>

<b>5 PACIENTES, MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>77</b>
<b>5.1. Diseño del estudio.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2. Grupo muestral.....</b>	<b>82</b>
5.2.1. Identificación de los diadenosin polifosfatos en lágrima humana....	84
5.2.2. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes sintomáticos de ojo seco.....	84
5.2.3. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en patologías oculares...	85
5.2.4. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes de cirugía refractiva.....	86
<b>5.3. Material.....</b>	<b>89</b>
5.3.1. Material e instrumentos de las pruebas diagnósticas.....	89
5.3.2. Material e instrumentos de laboratorio.....	90
<b>5.4. Pruebas diagnósticas.....</b>	<b>92</b>
5.4.1. Test de Schirmer.....	92
5.4.2. Test de sintomatología de ojo seco.....	93
5.4.3. TBUT y tinciones corneales.....	95
5.4.4. Estesimetría.....	95
<b>5.5. Análisis de lágrima en laboratorio.....</b>	<b>97</b>
5.5.1. Procesado de las muestras de lágrima.....	97
5.5.2. Cuantificación de los diadenosin polifosfatos en HPLC.....	98
5.5.3. Métodos de verificación de los diadenosin polifosfatos en HPLC...	100
<b>5.6. Procedimiento.....</b>	<b>103</b>
5.6.1. Procedimientos quirúrgicos.....	105
5.6.1.1. Procedimiento quirúrgico LASIK.....	105
5.6.1.2. Procedimiento quirúrgico PRK.....	106
5.6.1.3. Procedimiento quirúrgico ICL.....	107
<b>5.7. Estudio in Vitro de la liberación de los diadenosin     polifosfatos.....</b>	<b>109</b>
5.7.1. Material.....	109
5.7.2. Cultivo celular.....	109
5.7.3. Recogida de muestras.....	110
5.7.4. Análisis HPLC.....	111
<b>5.8. Análisis estadístico.....</b>	<b>112</b>

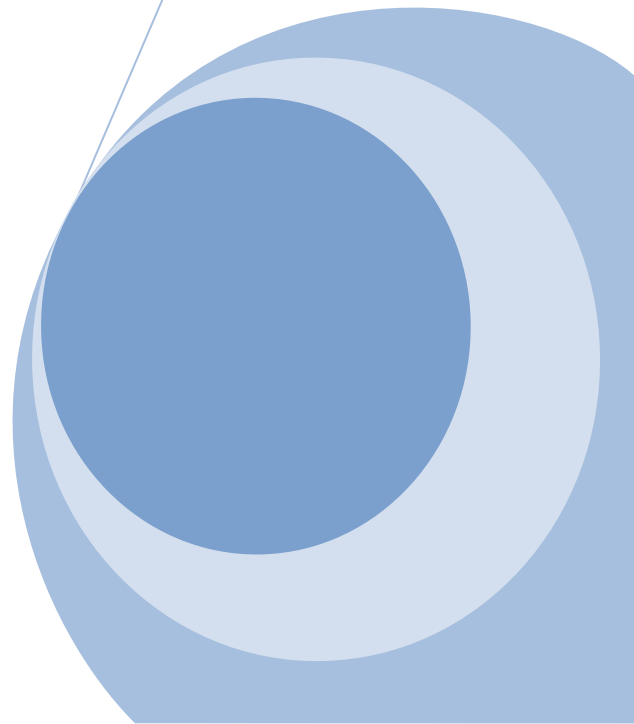
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>115</b>
<b>6.1. Primera fase: identificación de los dinucleótidos en la lágrima humana.....</b>	<b>117</b>
6.1.1. Identificación de los diadenosin polifosfatos en lágrima humana....	117
6.1.2. Concentraciones de los diadenosin polifosfatos según la edad y sexo.....	119
<b>6.2. Segunda fase: estudio de los dinucleótidos en el ojo seco y su liberación a la superficie ocular.....</b>	<b>125</b>
6.2.1. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes sintomáticos de ojo seco.....	125
6.2.2. Estudio <i>in Vivo</i> de la liberación de los diadenosin polifosfatos...	128
6.2.3. Estudio de la estimulación mecánica de las terminales nerviosas de la córnea.....	132
6.2.4. Estudio <i>in Vitro</i> de la liberación de los diadenosin polifosfatos...	134
<b>6.3. Tercera fase: estudio de los dinucleótidos en patologías oculares y cirugía refractiva.....</b>	<b>136</b>
6.3.1. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en patologías oculares...	136
6.3.1.1. Síndrome de Sjögren.....	136
6.3.1.2. Aniridia congénita.....	145
6.3.1.3. Queratocono.....	151
6.3.2. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes de cirugía refractiva.....	159
6.3.2.1. LASIK.....	159
6.3.2.2. PRK.....	166
6.3.2.3. ICL.....	173
6.3.3. Relación entre la frecuencia de los síntomas de ojo seco y las concentraciones de Ap <sub>4</sub> A y Ap <sub>5</sub> A.....	179
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>183</b>
<b>7.1. Primera fase: identificación de los dinucleótidos en la lágrima humana.....</b>	<b>185</b>
<b>7.2. Segunda fase: estudio de los dinucleótidos en el ojo seco y su liberación a la superficie ocular.....</b>	<b>190</b>

<b>7.3. Tercera fase: estudio de los dinucleótidos en patologías oculares y cirugía refractiva.....</b>	<b>196</b>
7.3.1. Síndrome de Sjögren.....	196
7.3.2. Aniridia Congénita.....	199
7.3.3. Queratocono.....	201
7.3.4. Cirugía refractiva.....	205
<b>7.4. Perspectivas de futuro.....</b>	<b>210</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>213</b>
<b>9. RESUMO EM PORTUGUÊS.....</b>	<b>217</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>229</b>
<b>11. ANEXO.....</b>	<b>267</b>



**1**

**Abreviaturas**

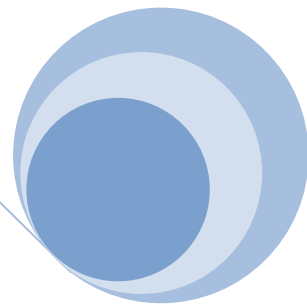
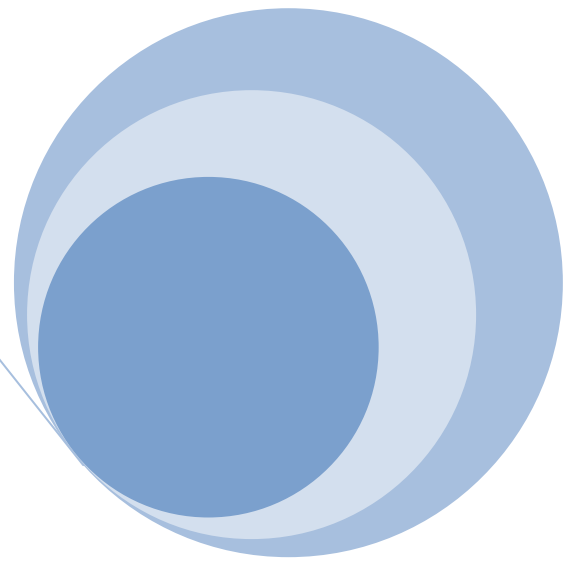




## 1. ABREVIATURAS

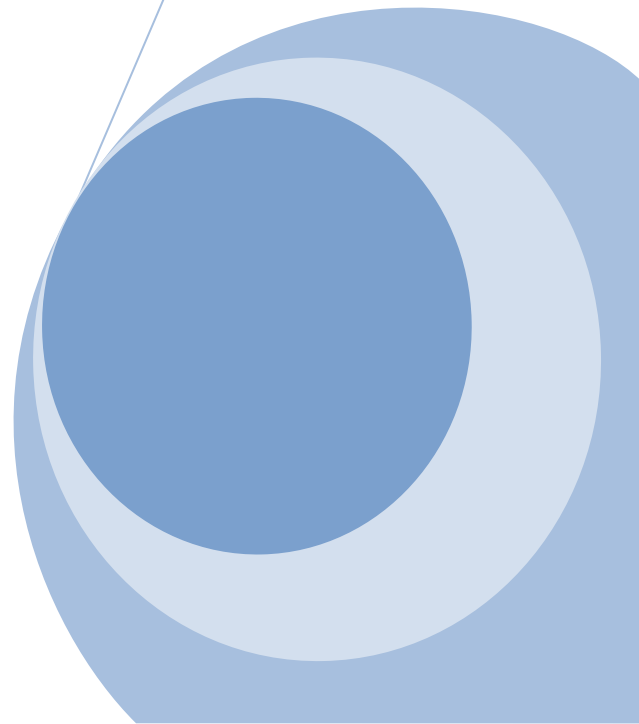
<b>ADP:</b>	Adenosina difosfato
<b>AECG:</b>	American- European consensus group (grupo de consenso americano-europeo)
<b>AMP:</b>	Adenosina monofosfato
<b>ANOVA:</b>	Análisis de la varianza
<b>Ap<sub>2</sub>A:</b>	Diadenosina difosfato
<b>Ap<sub>3</sub>A:</b>	Diadenosina trifosfato
<b>Ap<sub>4</sub>:</b>	Adenosina tetrafosfato
<b>Ap<sub>4</sub>A:</b>	Diadenosina tetrafosfato
<b>Ap<sub>5</sub>A:</b>	Diadenosina pentafofosfato
<b>Ap<sub>6</sub>A:</b>	Diadenosina hexafofosfato
<b>Ap<sub>7</sub>A:</b>	Diadenosina heptafofosfato
<b>ATP:</b>	Adenosina trifosfato
<b>BAC:</b>	Cloruro de benzalconio
<b>BSS:</b>	Solución salina balanceada
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b>	Ión calcio
<b>CFTR:</b>	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística)
<b>Cl<sup>-</sup>:</b>	Ión cloro
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dióxido de carbono
<b>DEQ:</b>	Dry eye questionnaire (cuestionario de ojo seco)
<b>DEQCL:</b>	Dry eye questionnaire contact lens (cuestionario de ojo seco en usuarios de lentes de contacto)
<b>DEWS:</b>	Dry eye workshop (grupo de trabajo para el ojo seco)
<b>DMEM:</b>	Medio Dulbecco modificado
<b>EC<sub>50</sub>:</b>	Concentración efectiva media
<b>EGF:</b>	Epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico)
<b>FDA:</b>	Food and drugs administration (administración de fármacos y alimentos)
<b>HCl:</b>	Ácido clorhídrico
<b>HPLC:</b>	High-pressure liquid chromatography (cromatografía líquida de alta presión)
<b>IBO:</b>	Instituto balear de oftalmología
<b>ICL:</b>	Intraocular contact lens (lente intraocular)
<b>K<sup>+</sup>:</b>	Ión potasio

<b>KCl:</b>	Cloruro potásico
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:</b>	Fosfato de potasio
<b>KOH:</b>	Hidróxido de potasio
<b>LASIK:</b>	Laser in situ keratomileusis
<b>LFU:</b>	Lacrimal functional unit (unidad funcional lagrimal)
<b>Mg<sup>2+</sup>:</b>	Ión magnesio
<b>MMP:</b>	Metaloproteasa de matriz
<b>Na<sup>+</sup>:</b>	Ión sodio
<b>NaCl:</b>	Cloruro sódico
<b>OSDI:</b>	Ocular surface disease index (índice de enfermedad de la superficie ocular)
<b>PBS:</b>	Tampón fosfato salino
<b>PIO:</b>	Presión intraocular
<b>PRK:</b>	Queratectomía fotorrefractiva
<b>RB-2:</b>	Reactivo blue 2
<b>RPG:</b>	Lentes rígidas permeables a los gases
<b>SEM:</b>	Error estándar de la media
<b>SIDA:</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SS:</b>	Síndrome de Sjögren
<b>SS-p:</b>	Síndrome de Sjögren primario
<b>TBA:</b>	Tetrabutil amonio
<b>TBUT:</b>	Tear break up time (tiempo de rotura lagrimal)
<b>TTR:</b>	Tear turnover rate (índice de producción lagrimal)
<b>Up<sub>4</sub>U:</b>	Diuridina tetrafosfato
<b>UTP:</b>	Uridina trifosfato



**2**

**Figuras y tablas**





## 2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Índice de figuras:

- Figura 3.1.** Estructura molecular del Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A.
- Figura 3.2.** Efecto de los diadenosina polifosfatos en la secreción lagrimal.
- Figura 3.3.** Clasificación de ojo seco.
- Figura 3.4.** Patogénesis del ojo seco.
- Figura 3.5.** Alteraciones oculares en pacientes con Aniridia congénita.
- Figura 3.6.** Opacidad corneal en paciente con Aniridia congénita.
- Figura 5.1.** Diagrama de las fases de la investigación.
- Figura 5.2.** Ejemplo de pregunta en el cuestionario Dry Eye Questionnaire.
- Figura 5.3.** HPLC utilizado para el análisis de diadenosina polifosfatos.
- Figura 5.4.** Cromatogramas de diadenosina polifosfatos.
- Figura 5.5.** Cromatograma de Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A con fosfodiesterasa.
- Figura 6.1** Concentraciones diadenosina polifosfatos en lágrima humana sin y con anestésico.
- Figura 6.2.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función de la edad.
- Figura 6.3.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en menores de 50 años y mayores de 50 años.
- Figura 6.4.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A según el sexo.
- Figura 6.5.** Concentraciones de Ap<sub>5</sub>A según el sexo.
- Figura 6.6.** Valores obtenidos con el test de Schirmer en sintomáticos y asintomáticos de ojo seco.
- Figura 6.7.** Concentraciones de los diadenosina polifosfatos en sintomáticos y asintomáticos de ojo seco.
- Figura 6.8.** Representación gráfica de la evolución de la secreción lagrimal con el parpadeo.
- Figura 6.9.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A en diferentes frecuencias de parpadeo.
- Figura 6.10.** Concentraciones de Ap<sub>5</sub>A en diferentes frecuencias de parpadeo.
- Figura 6.11.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A después de la estimulación mecánica con el estesiómetro de gas.
- Figura 6.12.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A antes y tras la estimulación mecánica *In Vitro*.
- Figura 6.13.** Valores en el test de Schirmer en pacientes con Síndrome de Sjögren.

**Figura 6.14.** Concentraciones de diadenosina polifosfatos en pacientes con Síndrome de Sjögren.

**Figura 6.15.** Intensidad de los síntomas de ojo seco en pacientes con Síndrome de Sjögren.

**Figura 6.16.** Valores del test Schirmer en Aniridia congénita.

**Figura 6.17.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A en Aniridia congénita.

**Figura 6.18.** Concentraciones de Ap<sub>5</sub>A en Aniridia congénita.

**Figura 6.19.** Representación gráfica del test de Schirmer, TBUT y tinciones en queratocono.

**Figura 6.20.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A de pacientes con queratocono.

**Figura 6.21.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función del frotamiento en pacientes de queratocono.

**Figura 6.22.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función del tipo de corrección en pacientes con queratocono.

**Figura 6.23.** Test de Schirmer, del TBUT y del grado de tinción corneal en pacientes operados con LASIK.

**Figura 6.24.** Evolución de las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A durante tres meses en pacientes sometidos a cirugía LASIK.

**Figura 6.25.** Evolución de la intensidad de los síntomas de ojo seco en pacientes operados con LASIK.

**Figura 6.26.** Test de Schirmer, del TBUT y del grado de tinción corneal en pacientes operados con PRK.

**Figura 6.27.** Evolución de las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A durante tres meses en pacientes sometidos a cirugía PRK.

**Figura 6.28.** Evolución de la intensidad de los síntomas de ojo seco en pacientes operados con PRK.

**Figura 6.29.** Test de Schirmer, del TBUT y del grado de tinción corneal en pacientes operados con ICL.

**Figura 6.30.** Evolución de las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A durante tres meses en pacientes sometidos a cirugía ICL.

**Figura 6.31.** Evolución de la intensidad de los síntomas de ojo seco en pacientes operados con ICL.

**Figura 6.32.** Relación entre las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y la frecuencia de síntomas.

**Figura 6.33.** Relación entre las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y la frecuencia de síntomas.

## Índice de tablas:

- Tabla 3.1.** Afinidad por receptores P2X por parte de los diadenosina polifosfatos.
- Tabla 3.2.** Afinidad por receptores P2Y por parte de los diadenosina polifosfatos.
- Tabla 3.3.** Concentraciones en conejos de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A.
- Tabla 5.1.** Características demográficas de los pacientes del estudio.
- Tabla 5.2.** Material utilizado para realizar las pruebas diagnósticas.
- Tabla 5.3.** Instrumentos utilizados durante las pruebas diagnósticas.
- Tabla 5.4.** Reactivos y material utilizado para el análisis en el laboratorio.
- Tabla 5.5.** Instrumentos de laboratorio utilizados para el análisis de lágrima.
- Tabla 5.6.** Esquema de pruebas y visitas realizadas por los diferentes grupos del estudio.
- Tabla 5.7.** Reactivos, material e instrumentación utilizados para el estudio de la liberación de diadenosina polifosfatos *In Vitro*.
- Tabla 6.1.** Volumen lagrimal evaluado con el test de Schirmer.
- Tabla 6.2.** Concentraciones de diadenosina polifosfatos en lágrima humana sin y con anestésico.
- Tabla 6.3.** Distribución por grupos de edad de los voluntarios que participaron en el estudio.
- Tabla 6.4.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función de la edad.
- Tabla 6.5.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función del sexo.
- Tabla 6.6.** Valores obtenidos con el test de Schirmer y el cuestionario de McMonnies en sintomáticos y asintomáticos de ojo seco.
- Tabla 6.7.** Concentraciones de los diadenosina polifosfatos en sintomáticos y asintomáticos de ojo seco.
- Tabla 6.8.** Valores en el test de Schirmer con y sin anestésico con diferentes frecuencias de parpadeo.
- Tabla 6.9.** Concentraciones expresadas de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A tras parpadeo forzado con y sin anestésico.
- Tabla 6.10.** Concentraciones expresadas de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A antes y tras la estimulación mecánica con el estesiómetro de Belmonte.
- Tabla 6.11.** Concentraciones expresadas de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A antes y tras la estimulación mecánica *In Vitro*.
- Tabla 6.12.** Valores en el test de Schirmer en pacientes con Síndrome de Sjögren.
- Tabla 6.13.** Concentraciones de los diadenosina polifosfatos en pacientes con Síndrome de Sjögren.
- Tabla 6.14.** Correlaciones entre las variables ordinales estudiadas en los pacientes con Síndrome de Sjögren.

**Tabla 6.15.** Frecuencia de los síntomas de ojo seco en pacientes con Síndrome de Sjögren.

**Tabla 6.16.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en μM en función de la intensidad de los síntomas en pacientes con Síndrome de Sjögren.

**Tabla 6.17.** Edades medias y test de McMonnies en Aniridia congénita.

**Tabla 6.18** Valores obtenidos con el test de Schirmer en los pacientes con Aniridia congénita.

**Tabla 6.19.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en Aniridia congénita.

**Tabla 6.20.** Correlaciones entre las variables ordinales estudiadas en los pacientes con Aniridia congénita.

**Tabla 6.21.** Valores del test de Schirmer, del TBUT, el grado de tinción corneal y la puntuación en el test de McMonnies en queratocono.

**Tabla 6.22.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en queratocono.

**Tabla 6.23.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función del frotamiento en pacientes de queratocono.

**Tabla 6.24.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función del tipo de corrección en pacientes de queratocono.

**Tabla 6.25.** Correlaciones entre las variables ordinales estudiadas en los pacientes con queratocono.

**Tabla 6.26.** Test de Schirmer, del TBUT y del grado de tinción corneal en pacientes operados con LASIK.

**Tabla 6.27.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en pacientes operados con LASIK.

**Tabla 6.28.** Evolución de la frecuencia de síntomas en pacientes operados con LASIK.

**Tabla 6.29.** Test de Schirmer, del TBUT y del grado de tinción corneal en pacientes operados con PRK.

**Tabla 6.30.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en pacientes operados con PRK.

**Tabla 6.31.** Evolución de la frecuencia de síntomas en pacientes operados con PRK.

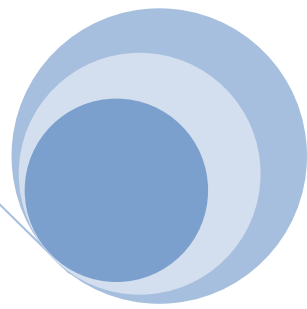
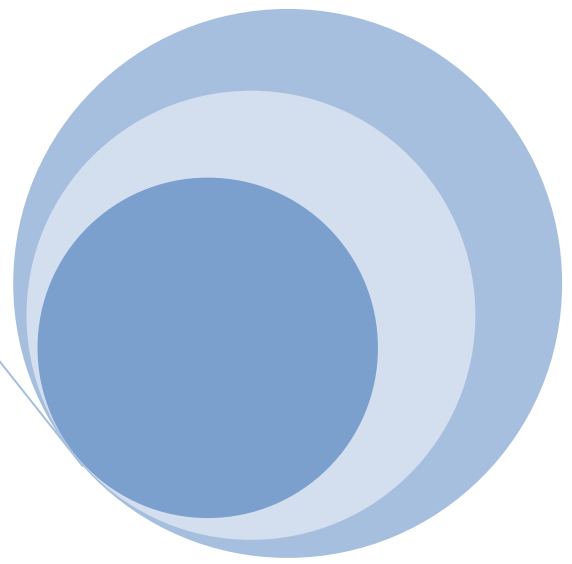
**Tabla 6.32.** Test de Schirmer, del TBUT y del grado de tinción corneal en pacientes operados con ICL.

**Tabla 6.33.** Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en pacientes operados con ICL.

**Tabla 6.34.** Evolución de la frecuencia de síntomas en pacientes operados con ICL.

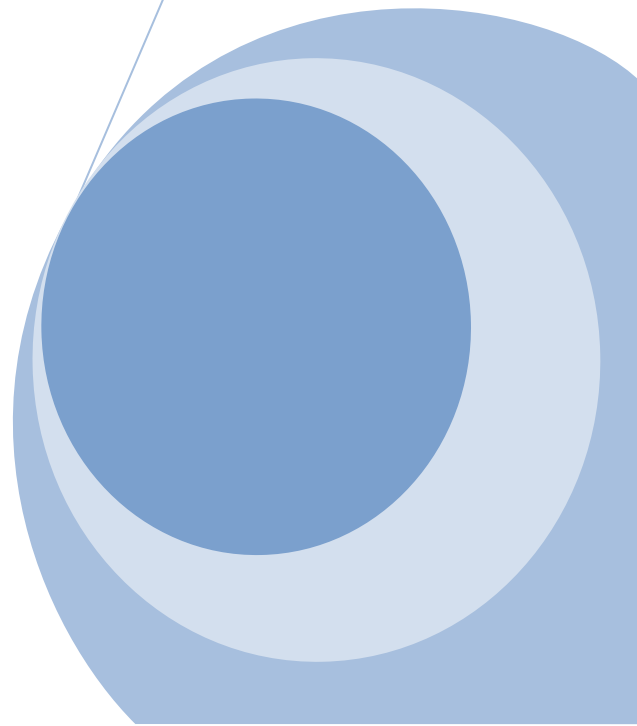
**Tabla 6.35.** Relación entre las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y la frecuencia de síntomas.

**Tabla 6.36.** Relación entre las concentraciones de Ap<sub>5</sub>A y la frecuencia de síntomas.



**3**

**Introducción**





## 3.1 DIADENOSIN POLIFOSFATOS.

### 3.1.1. Estructura y características.

Los diadenosina polifosfatos (también conocidos como  $\alpha,\omega$ -dinucleótidos de adenina, nucleótidos diadenilados, bis(5'-adenosil) polifosfatos, dinucleótidos adelinados o polifosfatos diadenilados) pertenecen a la familia de dinucleótidos de adenina. Están formados por dos moléculas de adenosina unidas en las posiciones 5' por un número variable de fosfatos que pueden oscilar entre 2 y 7 (abreviados como  $Ap_nA$ ,  $n = 2-7$ ) (Miras-Portugal, Gualix et al. 1999). Hasta la fecha se han descubierto la existencia de seis dinucleótidos de adenina,  $Ap_2A$ ,  $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$ ,  $Ap_5A$ ,  $Ap_6A$  y  $Ap_7A$ , los cuales se han identificado y encontrado en diversos tejidos biológicos incluidas las plaquetas (Flodgaard y Klenow 1982; Luthje y Ogilvie 1983), los gránulos cromafines de la médula adrenal (Rodriguez del Castillo, Torres et al. 1988; Castro, Torres et al. 1990; Pintor, Torres et al. 1991a; Pintor, Diaz-Rey et al. 1992) y en el sistema nervioso central (Pintor, Diaz-Rey et al. 1992; Zimmermann, Volkmandt et al. 1993; Klishin, Lozovaya et al. 1994; Pivorun y Nordone 1996). En la Figura 3.1 se muestra la estructura del diadenosina trifosfato,  $Ap_3A$ , diadenosina tetrafosfato,  $Ap_4A$  y diadenosina pentafofosfato,  $Ap_5A$ .

La estructura de estas moléculas parece ser importante para su habilidad para unirse a diferentes receptores P2. En solución y en condiciones de pH fisiológico, los diadenosina polifosfatos adoptan una conformación plegada simétrica con apilamiento de sus bases (Mayo, Mvele et al. 1990). El cambio de conformación y el grado de apilamiento de bases depende del pH y parece estar relacionado con la longitud de la cadena de fosfatos (Mayo, Mvele et al. 1990), y aunque no existe información sobre la disposición de los dinucleótidos cuando estos se unen a los purinoceptores, parece que el cambio de conformación de los dinucleótidos con el pH podría explicar la selectividad por los

receptores purinérgicos (Hoyle 1990; Hoyle, Hilderman et al. 1990; Ralevic, Hoyle et al. 1995; Pintor, Villafuertes et al. 2001). Además cambios significativos en el pH modifican la actividad de los receptores P2 a los que se unen los diadenosina polifosfatos (King, Ziganshina et al. 2006).

Cada uno de los fosfatos de los diadenosina polifosfatos posee una carga negativa, la cual al formar complejos con cationes divalentes afecta a la unión de dicha molécula con el receptor. Por ejemplo, se ha comprobado que  $Mg^{2+}$  es capaz de unirse a esas cargas negativas de los fosfatos para formar complejos con el  $Ap_4A$  (Westkaemper 1987).

En resumen, el pH, la longitud de la cadena de fosfatos y la unión a cationes divalentes podrían explicar porque los diadenosina polifosfatos no estimulan a los mismos receptores.

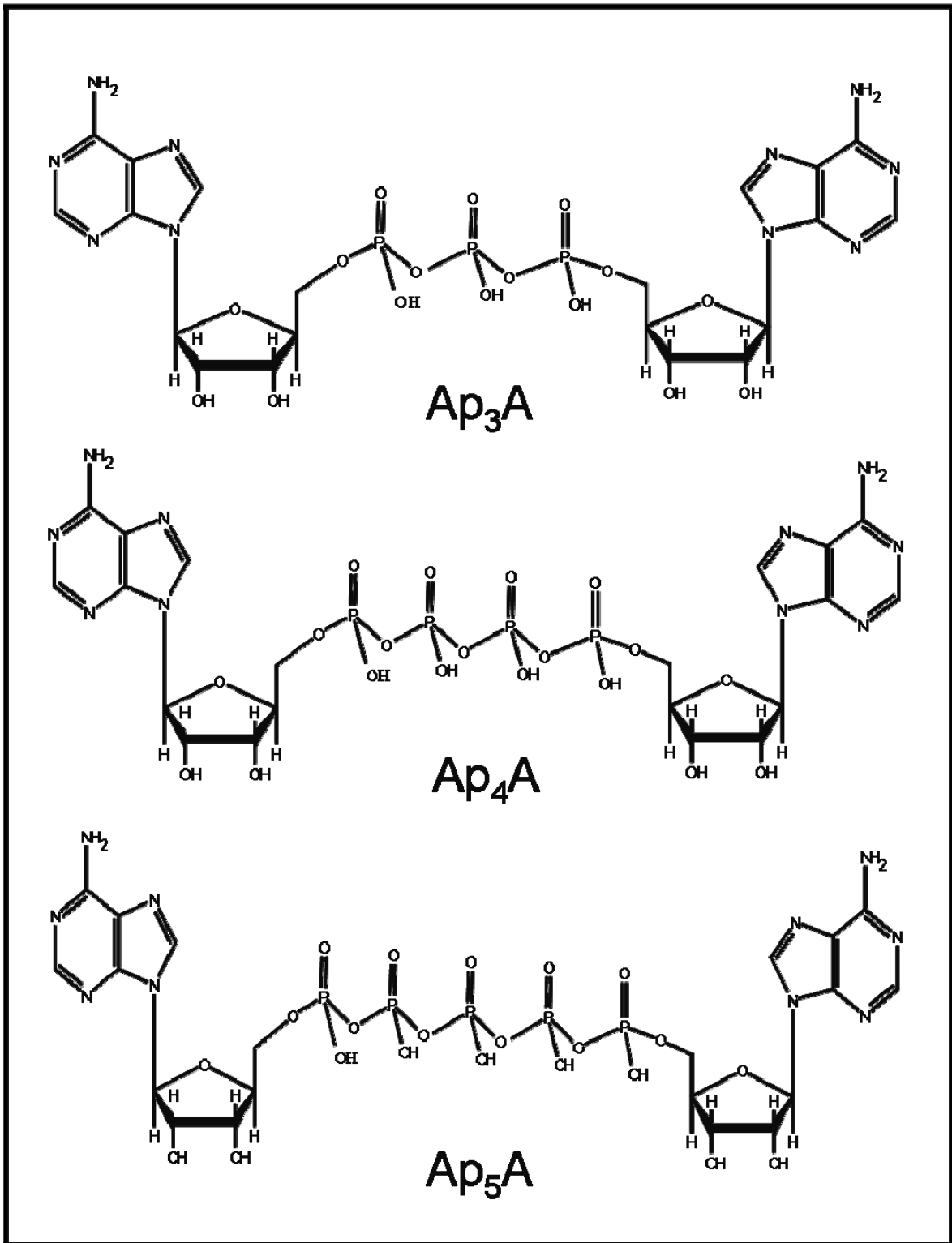


Figura 3.1. Estructura molecular del Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A.

### **3.1.2. Receptores P2 para los diadenosin polifosfatos.**

El efecto de los diadenosina polifosfatos está mediado principalmente por unos receptores de membrana conocidos como P2, los cuales transmiten la señal al interior de la célula donde se producirán los cambios bioquímicos oportunos.

Se han descrito dos grandes familias de receptores P2 a los cuales se pueden unir los diadenosina polifosfatos y activarlos: los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y (Burnstock 2004). Estos dos subtipos de receptores tienen distintos perfiles farmacológicos y distribución en los tejidos: clásicamente los receptores P2X son activados de forma más potente por análogos de ATP,  $\alpha,\beta$ -metilen ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP) y  $\beta,\gamma$ -metilen ATP ( $\beta,\gamma$ -meATP), mientras que el agonista más potente para los receptores P2Y es 2-metiltio ATP (2MeSATP) (Burnstock y Kennedy 1985). En cuanto a la distribución tisular de estos receptores, se ha visto la presencia de P2X en el conducto deferente, en la vejiga urinaria, en el músculo liso vascular y, la presencia de P2Y en *taenia coli* de cobaya y en las células endoteliales vasculares.

Diversas estructuras en el ojo también contienen receptores P2, los cuales son susceptibles de ser activados por los diadenosina polifosfatos provocando cambios fisiológicos en la glándula lagrimal, córnea, cuerpo ciliar, malla trabecular, cristalino o retina (Cowlen, Zhang et al. 2003; Guzman-Aranguez, Crooke et al. 2007).

#### **3.1.2.1. Receptores P2X.**

Los receptores P2X son receptores ionotrópicos que actúan como canales selectivos para los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Burnstock y Kennedy 1985; Humphrey, Buell et al. 1995; Buell, Lewis et al. 1996; Evans, Lewis et al. 1996). Estructuralmente están formados por varias

subunidades o monómeros caracterizadas por poseer dos dominios transmembrana (aunque estas subunidades pueden existir tanto en forma heteromérica como homomérica) (Silberberg, Chang et al. 2005; Roberts, Vial et al. 2006), junto a un bucle extracelular que siempre contiene 10 residuos de cisteína, lo que va a generar un poro en la membrana de la célula, muy similar a los canales para  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  (North 1996).

Estudios moleculares han permitido identificar al menos 7 tipos diferentes de receptores P2X (del P2X<sub>1</sub> al P2X<sub>7</sub>). Cada una de las subunidades que conforman este receptor está formada por un número de aminoácidos que oscila entre los 379 (para el receptor P2X<sub>6</sub>) y los 595 (para el receptor P2X<sub>7</sub>) (Jarvis y Khakh 2009).

Estos receptores están implicados en la transmisión sináptica rápida entre las neuronas o los nervios autonómicos y el músculo liso, siendo el transmisor el ATP (Benham 1990; Edwards y Gibb 1993).

En el ojo se han encontrado la presencia de los receptores P2X en las terminaciones nerviosas parasimpáticas de los procesos ciliares, en las terminaciones nerviosas colinérgicas de la malla trabecular (Pintor 2003; Soto, Pintor et al. 2005) y en diferentes estructuras de la retina y la coroides (Neal y Cunningham 1994; Greenwood, Yao et al. 1997; Brandle, Guenther et al. 1998; Puthussery y Fletcher 2006; Branson, Mertens et al. 2009).

Como se ha comentado anteriormente, la afinidad de los diadenosina polifosfatos es selectiva. Por ejemplo, el  $\text{Ap}_4\text{A}$  es más afín por los receptores P2X<sub>2</sub> y P2X<sub>4</sub> (Wildman, Brown et al. 1999; Pintor, Pelaez et al. 2004). En la tabla 3.1 se muestran la afinidad de los diferentes diadenosina polifosfatos por los receptores P2X (Guzman-Aranguez, Crooke et al. 2007).

<b>P2X</b>	<b>POTENCIA DE ACCIÓN</b>
P2X <sub>1</sub>	Ap <sub>6</sub> A > Ap <sub>5</sub> A Ap <sub>4</sub> A > Ap <sub>3</sub> A
P2X <sub>2</sub>	Ap <sub>4</sub> A
P2X <sub>3</sub>	Ap <sub>3</sub> A > Ap <sub>4</sub> A > Ap <sub>5</sub> A > Ap <sub>6</sub> A
P2X <sub>2/3</sub>	Ap <sub>4</sub> A
P2X <sub>4</sub>	Ap <sub>6</sub> A > Ap <sub>4</sub> A
P2X <sub>5</sub>	Ap <sub>4</sub> A > Ap <sub>5</sub> A > Ap <sub>6</sub> A > Ap <sub>3</sub> A
P2X <sub>6</sub>	Ap <sub>4</sub> A
P2X <sub>4/6</sub>	Ninguno
P2X <sub>7</sub>	Todos pero a concentración mayor de 1 mM

**Tabla 3.1. Afinidad por los diferentes receptores P2X por parte de los diadenosina polifosfatos.**

### 3.1.2.2. Receptores P2Y.

Los receptores P2Y son de naturaleza metabotrópica y están formados por proteínas con siete dominios transmembrana y dominios N-terminal extracelular y C-terminales intracelular.

En la actualidad se han clonado 8 subtipos diferentes: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub> (Chambers, Mcdonald et al. 2000; Communi, Gonzalez et al. 2001; Communi, Suarez-Huerta et al. 2001; Hollopeter, Jantzen et al. 2001; Weisman, Wang et al. 2005). Se expresan en la superficie de casi todas las células, aunque los cuatro últimos están particularmente implicados en procesos como el mantenimiento del tono vascular y la agregación plaquetaria (Boeynaems, Communi et al. 2005; Boeynaems, van Giezen et al. 2005).

De los 8 tipos de receptores P2Y, solo los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> son muy afines a los diadenosina polifosfatos, mientras que otros receptores P2Y precisan de concentraciones por encima de 1mM del diadenosina polifosfatos afín para ser activados (Lazarowski, Watt et al. 1995; Communi, Motte et al. 1996; Patel, Barnes et al. 2001; Pintor, Peral et al. 2002). En la tabla 3.2 se muestran los receptores P2Y y los diadenosina polifosfatos más afines (Guzman-Aranguez, Crooke et al. 2007).

El receptor P2Y<sub>1</sub> no ha sido detectado en la superficie ocular aunque si se ha relatado su presencia en otros tejidos del ojo como en el cristalino (Merriman-Smith, Tunstall et al. 1998), en las células de la malla trabecular (Soto, Pintor et al. 2005), en el epitelio del cuerpo ciliar (Farahbakhsh y Cilluffo 2002) y en las células de Muller y el epitelio pigmentario de la retina (Fries, Goczalik et al. 2005; Lu, Reigada et al. 2007).

Parece que el receptor P2Y con una mayor funcionalidad en el ojo es el receptor P2Y<sub>2</sub> (Pintor, Sanchez-Nogueiro et al. 2004). Este receptor está ampliamente distribuido en los tejidos y se encuentra en niveles elevados en pulmón, corazón, músculo esquelético, bazo, riñón, hígado y epitelio (Lustig, Shiau et al. 1993; Parr, Sullivan et al. 1994). Estudios en ratones deficientes de este receptor han revelado un papel fundamental de este receptor en el transporte de iones en las células epiteliales (Cressman, Lazarowski et al. 1999; Leipziger 2003). Este receptor se activa por el diadenosin tetrafosfato, Ap<sub>4</sub>A, y por el diuridin tetrafosfato, Up<sub>4</sub>U, entre otros (Patel, Barnes et al. 2001; Pendergast, Yerxa et al. 2001). La suramina actúa como antagonista para P2Y<sub>2</sub> en humanos. En rata, tanto PPADS como RB-2 son antagonistas aunque de forma muy débil. Se ha visto que los flavonoides bloquean el receptor nativo P2Y<sub>2</sub> en células NG108-15 de manera no competitiva (Kaulich, Streicher et al. 2003).

P2Y	POTENCIA DE ACCIÓN
P2Y <sub>1</sub>	Ap <sub>3</sub> A > Ap <sub>4</sub> A > Ap <sub>5</sub> A = Ap <sub>6</sub> A >> Ap <sub>2</sub> A
P2Y <sub>2</sub>	Ap <sub>4</sub> A > Ap <sub>5</sub> A > Ap <sub>6</sub> A > Ap <sub>3</sub> A
P2Y <sub>4</sub>	Ninguno
P2Y <sub>6</sub>	Ap <sub>5</sub> A > Ap <sub>3</sub> A (a concentraciones superiores 1 mM)
P2Y <sub>11</sub>	Ninguno
P2Y <sub>13</sub>	Ap <sub>4</sub> A pero actúa como antagonista

**Tabla 3.2. Afinidad por los diferentes receptores P2Y por parte de los diadenosina polifosfatos.**

A través de diferentes aproximaciones fisiológicas y farmacológicas se han podido identificar estos receptores P2Y<sub>2</sub> en diferentes estructuras del ojo como en el epitelio y endotelio corneal (Srinivas, Yeh et al. 1998; Kimura, Nishimura et al. 1999; Cha, Hahn et al. 2000; Yang, Wu et al. 2000; Cowlen, Zhang et al. 2003), epitelio conjuntival (Jumblatt y Jumblatt 1998; Hosoya, Ueda et al. 1999; Shiue, Kulkarni et al. 2000; Li, Kuang et al. 2001), epitelio cuerpo ciliar (Wax, Sanghavi et al. 1993; Shahidullah y Wilson 1997), Células de Muller (Liu y Wakakura 1998; Bringmann, Pannicke et al. 2002), epitelio pigmentario de la retina (Sullivan, Erb et al. 1997) células ganglionares (Wheeler-Schilling, Marquardt et al. 2001), coroides (Sugamoto, Hirai et al. 1999) y cristalino (Collison y Duncan 2001).

### **3.1.3. Almacenamiento y liberación de los diadenosin polifosfatos.**

Los diadenosina polifosfatos se almacenan y liberan junto a los mononucleótidos al entorno extracelular desde los gránulos densos de las plaquetas, desde las células cromafines, y también desde las terminales sinápticas (Rodríguez del Castillo, Torres et

al. 1988; Pintor, Diaz-Rey et al. 1992; Pintor, Rotllan et al. 1992; Pintor, Diaz-Rey et al. 1993; Pintor y Miras-Portugal 1995).

El almacenamiento de Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>6</sub>A en altas concentraciones junto a ATP y ADP se encuentra en los gránulos densos de las plaquetas, siendo el mayor reservorio de diadenosina polifosfatos en el sistema vascular (Flodgaard y Klenow 1982; Luthje y Ogilvie 1983; Schluter, Offers et al. 1994). La concentración de estos compuestos en las plaquetas es de 0.42 nmoles mg<sup>-1</sup>. Sin embargo, la presencia de los diadenosina polifosfatos es casi indetectable en eritrocitos, leucocitos y otros componentes de la sangre (Luthje y Ogilvie 1983).

Tanto Ap<sub>4</sub>A como Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>6</sub>A, pero no Ap<sub>3</sub>A, se almacenan junto a AMP, ADP, ATP y catecolaminas en los gránulos secretores densos de las células cromafines de la médula adrenal (Rodriguez del Castillo, Torres et al. 1988; Pintor, Torres et al. 1991a; Pintor, Rotllan et al. 1992). La presencia de estos dinucleótidos en la fracción citosólica es mínima, mientras que en la fracción granular la concentración de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A es de 32 nmoles mg<sup>-1</sup> y 49 nmoles mg<sup>-1</sup> respectivamente (Rodriguez del Castillo, Torres et al. 1988).

Se han detectado importantes concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en las vesículas de las terminales sinápticas. Del mismo modo que ocurre en plaquetas y células cromafines, estos dinucleótidos se almacenan junto a ATP, aunque la concentración de los dinucleótidos es 22 ó 23 veces inferior a la de ATP, presentando concentraciones de 0.17 y 0.16 nmoles mg<sup>-1</sup> respectivamente (Pintor, Rotllan et al. 1992).

En las plaquetas, el ratio molar de salida de diadenosina polifosfatos es similar al ratio intra-granular, y representa solo el 4-5% del almacenamiento de estos dinucleótidos. El Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>6</sub>A se liberan mediante exocitosis de las células cromafines junto a los

mononucleótidos de adenina y las catecolaminas, tras la estimulación con carbacol y en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Castro, Pintor et al. 1992).

Estudios *In Vitro*, han revelado que la liberación de los diadenosina polifosfatos de las terminales sinápticas se produce tras la despolarización de la membrana mediada por agentes como la 4-aminopiridina y la vetridina, siendo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ap}_4\text{A}$  y  $\text{Ap}_5\text{A}$  se presentan en concentraciones de 0,17 y 0,16 nmoles  $\text{mg}^{-1}$ , respectivamente (Pintor, Diaz-Rey et al. 1992).

A pesar de estos bajos porcentajes, los diadenosina polifosfatos pueden alcanzar concentraciones fisiológicamente activas (Hohage, Reinhardt et al. 1996; Ogilvie, Blasius et al. 1996; Hollah, Hausberg et al. 2001; Jankowski, Jankowski et al. 2003; Luo, Jankowski et al. 2004), siendo incluso del orden de microMolar (Pintor, Torres et al. 1991a).

## **3.2. IMPORTANCIA DE LOS DIADENOSIN POLIFOSFATOS EN EL OJO.**

La relevancia fisiológica de los diadenosina polifosfatos y de sus receptores en las estructuras oculares, solamente se ha tratado en profundidad desde hace unos pocos años (Pintor 1999). En los siguientes apartados se va a mostrar la importancia en la fisiología ocular de estos dinucleótidos.

### **3.2.1 Efecto en la secreción lagrimal.**

Mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se identificaron diadenosina polifosfatos en la lágrima de conejo de la raza de Nueva Zelanda. En concreto, se detectaron concentraciones en rangos de microMolar, de diadenosina tetrafosfato,  $Ap_4A$ , y de diadenosina pentafofosfato,  $Ap_5A$  (Pintor, Peral et al. 2002). Estas concentraciones serían suficientes para activar los receptores de la superficie ocular ya descritos por diferentes autores (Kulkarni, Trousdale et al. 2003; Leipziger 2003; Murakami, Fujihara et al. 2003).

Sería razonable pensar que la presencia de estos nucleótidos en la lágrima del conejo se debe a su liberación desde las terminales nerviosas que inervan la superficie ocular, al igual que ocurre en el sistema nervioso central (Pintor, Peral et al. 2002). Pero en un experimento realizado con conejos a los que se les ha denervado mediante una inyección retrobulbar de etanol, se obtuvieron resultados muy similares a los animales sin denervar (Guzman-Aranguez, Crooke et al. 2007), valores que se muestran en la tabla 3.3. Estos resultados sugieren que los diadenosina polifosfatos no son liberadas a la lágrima desde las terminaciones nerviosas por un mecanismo dependiente del  $Ca^{2+}$  (Pintor, Peral et al. 2002).

Diadenosina polifosfatos	Conejo normal	Conejo denervado
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	2.92 ± 0.28	2.85 ± 0.41
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0.58 ± 0.11	0.66 ± 0.20

**Tabla 3.3. Concentraciones expresadas en  $\mu\text{M}$  de diadenosina tetrafosfato y diadenosina pentafofosfato en conejos de la raza Nueva Zelanda, en condiciones normales y denervados.**

La presencia de diadenosina polifosfatos en lágrima de conejo de raza Nueva Zelanda sugiere que pueden tener relevancia en la fisiología de la superficie ocular. La aplicación tópica de diadenosina polifosfatos produce un aumento en el volumen lagrimal, que es dependiente de la longitud de la cadena de fosfatos que une las dos moléculas de adenosina. Como observamos en la figura 3.2, tanto Ap<sub>2</sub>A como Ap<sub>3</sub>A disminuyen la secreción lagrimal respecto a las condiciones basales, mientras que Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>6</sub>A son efectivos, siendo el más activo de todos Ap<sub>4</sub>A, ya que incrementa la producción de lágrima en un 60 % sobre los valores normales de lágrima y Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>6</sub>A los incrementan solo un 20 % aproximadamente. En estos experimentos también se establecieron, después de realizar una curva de dosis respuesta, los valores EC<sub>50</sub> para los tres dinucleótidos que mejoraban la secreción lagrimal. Ap<sub>4</sub>A presentaba un EC<sub>50</sub> de 2.76  $\mu\text{M}$ , Ap<sub>5</sub>A de 1.77  $\mu\text{M}$  y Ap<sub>6</sub>A de 3.16  $\mu\text{M}$  (Pintor, Peral et al. 2002).

Sin embargo, todavía no está muy claro si el incremento de la secreción lagrimal se produce por la inducción de la producción lagrimal en la glándula lagrimal o en otras estructuras secretoras accesorias (Cowlen, Zhang et al. 2003).

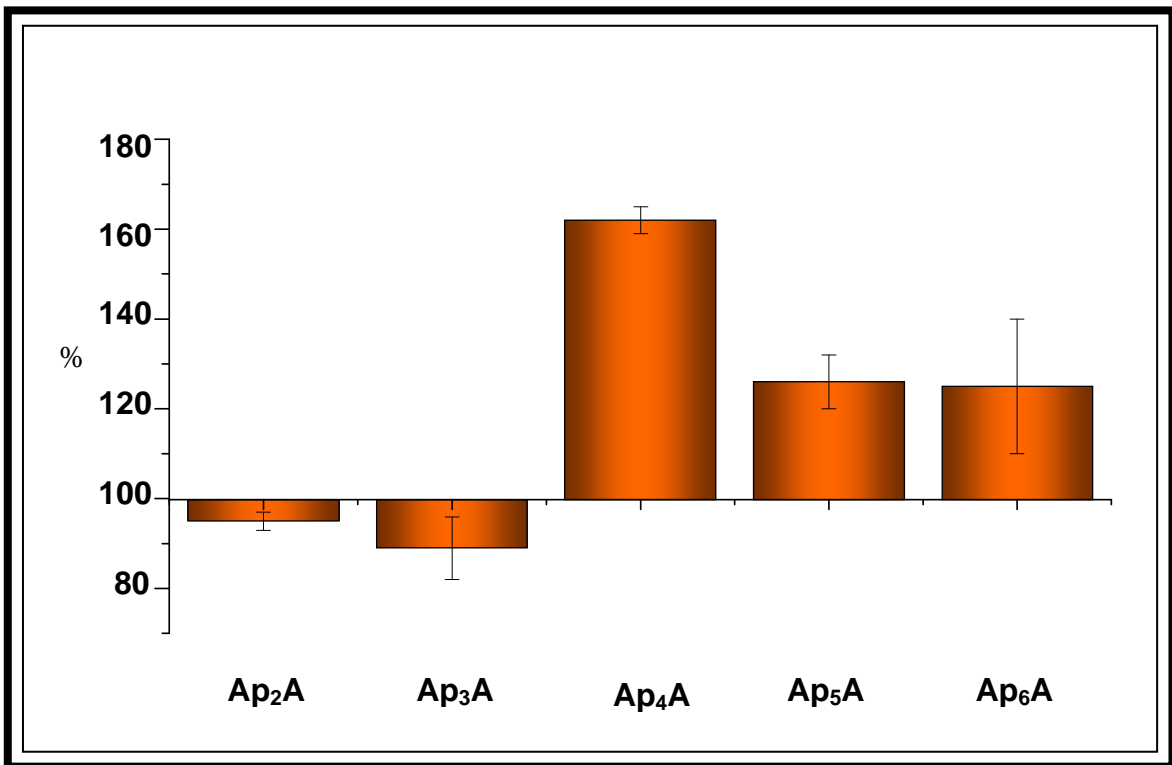


Figura 3.2. Porcentajes de estimulación o inhibición de la secreción lagrimal por parte de los diadenosina polifosfatos respecto a la lacrimación basal (modificada de pintor, peral et al. 2002).

Lo que parece más claro es que el efecto de estos dinucleótidos viene mediado por el receptor P2Y<sub>2</sub> (Lazarowski, Watt et al. 1995; Nicholas, Watt et al. 1996), ya que otro agonista de este receptor como el UTP produce una similar estimulación de la secreción lagrimal y cuando se instiló reactivo blue-2 (RB2), antagonista de los receptores P2Y<sub>2</sub>, con el Ap<sub>4</sub>A se inhibió el efecto estimulador del diadenosina tetrafosfato (Pintor, Peral et al. 2002).

Un hecho sorprendente es que la melatonina aumenta alrededor de un 20% el efecto del Ap<sub>4</sub>A sobre la lacrimación lagrimal, efecto que es inhibido cuando se instila con anterioridad Luzindol, un antagonista de la melatonina, lo que sugiere una relación entre los receptores P2Y<sub>2</sub> y el receptor MT de la melatonina (Hoyle, Peral et al. 2006).

Parece por tanto que el diseño de nuevos fármacos compuestos por derivados de los diadenosina polifosfatos podría ser interesante para el tratamiento del ojo seco. En los últimos años se ha desarrollado un fármaco con un análogo del Ap<sub>4</sub>A, como es el diuridin tetrafosfato, Up<sub>4</sub>U, con el nombre genérico de Diquafosol (Yerxa, Mundasad et al. 2002; Yerxa, Sabater et al. 2002; Nichols, Yerxa et al. 2004; Tauber, Davitt et al. 2004).

A finales de 2009 fue rechazada su autorización por la FDA en Estados Unidos, pero en Abril de 2010 se aprobó como fármaco para el ojo seco por la Agencia del medicamento en Japón, donde será comercializado en una solución oftálmica al 3% por Santen Pharmaceutical con el nombre comercial DIQUAS. La posología será de 1 gota / 6 veces al día ([http://www.santen.com/news/20100416\\_2.pdf](http://www.santen.com/news/20100416_2.pdf)).

### **3.2.2. Efecto sobre la cicatrización corneal epitelial.**

Debido a su localización en el ojo, la córnea es la estructura más expuesta a sufrir daños en su epitelio. Un complejo grupo de señales y mecanismos moleculares permiten la regeneración del epitelio corneal. Entre las moléculas participantes están el EGF, la galectina 3 y 7 y la timosina β<sub>4</sub> entre otras (Cao, Said et al. 2002; Sosne, Szliter et al. 2002; Wilson, Netto et al. 2003; Uno, Hayashi et al. 2004).

El proceso de cicatrización del epitelio corneal se realiza en tres pasos:

**1.- Fase de latencia.**- Esta fase se desarrolla durante las primeras 4-6 horas después de la lesión (Zieske y Gipson 1986). Las células del borde de la lesión se separan de la membrana de Bowman y son eliminadas por leucocitos polimorfonucleares. Durante esta fase aumenta el tamaño de la lesión.

**2.- Fase de migración.-** Con una duración entre 24 y 36 horas, las células de epitelio comienzan a cubrir el espacio de la lesión desde la periferia con un movimiento centrípeto (Steele 1999). Las células para realizar esta migración crean filopodios y lamelopodios que les ayuda a desplazarse (Gundorova, Brikman et al. 1994).

**3.- Fase de división celular.-** Una vez que está totalmente recubierta la lesión por una capa de células, estas se anclan fuertemente a la membrana de Bowman y comienzan a dividirse para completar las diferentes capas del epitelio (Lehrer, Sun et al. 1998).

Se evaluó el posible efecto sobre la cicatrización epitelial de los diadenosina polifosfatos. Para ello se realizó un experimento *In Vivo* en el que se emplearon conejos de la raza Nueva Zelanda a los cuales se les realizó una ulcera en la córnea de 3 mm de diámetro con n-heptanol. Sin instilar ningún dinucleótido, el tiempo de cicatrización fue de 32,2 horas con una velocidad de 72  $\mu\text{m}/\text{hora}$ . Cuando fueron tratados con  $\text{Ap}_4\text{A}$  la velocidad de cicatrización aumentó hasta 93,7  $\mu\text{m}/\text{hora}$ . Ni  $\text{Ap}_3\text{A}$ , ni  $\text{Ap}_5\text{A}$  aumentaron la velocidad de cicatrización (Pintor, Bautista et al. 2004).

El efecto positivo sobre la cicatrización del  $\text{Ap}_4\text{A}$  es probablemente mediado por receptores  $\text{P2Y}_2$ , ya que el UTP (uridin trifosfato) provoca el mismo aumento en la velocidad de cicatrización y se ha descrito que ambas moléculas son agonistas del receptor  $\text{P2Y}_2$  (Lazarowski, Watt et al. 1995). Además cuando aplicaron antagonistas de receptores  $\text{P2Y}$ , como RB-2, se inhibió el efecto de ambas moléculas.

Para verificar los resultados encontrados *In Vivo*, se realizaron estudios *In Vitro* en los que se verificó el aumento de velocidad de cicatrización por parte del  $\text{Ap}_4\text{A}$  y la desaceleración producida por  $\text{Ap}_3\text{A}$  y  $\text{Ap}_5\text{A}$ . Estos estudios sugieren que el  $\text{Ap}_4\text{A}$  actúa aumentando la velocidad de migración celular activando receptores  $\text{P2Y}_2$ , mientras que los otros dos dinucleótidos lo hacen a través de receptores  $\text{P2Y}_6$ , inhibiendo la migración

(Mediero, Peral et al. 2006; Mediero, Guzman-Aranguez et al. 2008). En trabajos anteriores se muestran resultados semejantes con otros nucleótidos (Klepeis, Weinger et al. 2004; Yang, Crason et al. 2004; Weinger, Klepeis et al. 2005).

Debido a la presencia de diferentes receptores P2Y en la superficie ocular, es razonable pensar que estén envueltos en diferentes funciones como la mitosis o el movimiento de iones y en otros procesos fisiológicos en la córnea y la conjuntiva (Jumblatt y Jumblatt 1998; Hosoya, Ueda et al. 1999).

### **3.2.3. Presencia en el humor acuoso y efecto sobre la presión intraocular.**

El humor acuoso, además de mantener la presión intraocular (PIO), es el fluido que provee de nutrientes a las estructuras avasculares del ojo, principalmente a la córnea y al cristalino.

Los diadenosina polifosfatos fueron identificados en el humor acuoso, en concentraciones de 0,34  $\mu\text{M}$  para el  $\text{Ap}_4\text{A}$  y de 0,08  $\mu\text{M}$  para el  $\text{Ap}_5\text{A}$ , respectivamente como moléculas señalizadoras que provienen de los procesos ciliares (Mitchell, Carre et al. 1998; Pintor, Peral et al. 2003).

La presencia de receptores P2 en los lugares de secreción (procesos ciliares) y drenaje (malla trabecular) del humor acuoso sugieren que los diadenosina polifosfatos pueden modular ambos procesos y de esta manera modificar la presión intraocular (Chen y Sears 1997; Farahbakhsh y Cilluffo 2002; Crosson, Yates et al. 2004; Pintor, Pelaez et al. 2004; Soto, Pintor et al. 2005).

Cuando se evaluó el efecto de los dinucleótidos sobre la presión intraocular en conejos de raza Nueva Zelanda se ha comprobado que ni Ap<sub>2</sub>A, ni Ap<sub>3</sub>A y tampoco Ap<sub>5</sub>A disminuyen la PIO. En cambio, el Ap<sub>4</sub>A provoca una disminución de la presión intraocular aproximadamente un 29 % (Pintor 2003).

Esta acción hipotensora parece estar mediada por receptores P2X, más en concreto del P2X<sub>2</sub> el cual parece localizarse en las terminales nerviosas que inervan los procesos ciliares, ya que al denervar mediante una inyección retrobulbar, se inhibe el efecto del Ap<sub>4</sub>A (Pintor 2005; Peral, Gallar et al. 2009). Estos mismos autores sugieren que el Ap<sub>4</sub>A estimula la liberación de acetilcolina al activar los receptores P2X<sub>2</sub> presentes en los procesos ciliares, provocando la contracción del músculo ciliar y abriendo el ángulo iridocorneal, disminuyendo la resistencia a la salida del flujo de humor acuoso (Pintor 2005).

Además de localizar el efecto del Ap<sub>4</sub>A en las terminales nerviosas de los procesos ciliares, se ha demostrado su efecto en la malla trabecular (tejido de evacuación del humor acuoso), donde se ha identificado la presencia de receptores P2Y en las estructuras oculares (Crosson, Yates et al. 2004; Soto, Pintor et al. 2005). Estudios de perfusión en segmento anterior del ojo han demostrado que la respuesta es vía activación de un receptor P2Y<sub>1</sub>. Estos estudios muestran un incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> en el espacio intracelular de la malla trabecular, lo que sugiere un adelgazamiento de las células de la malla trabecular que deja mayor espacio intracelular y por tanto facilitan la salida de humor acuoso (Soto, Pintor et al. 2005).

En el cristalino se han identificado, por hibridación *in situ* y RT-PCR, los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>2</sub> (Merriman-Smith, Tunstall et al. 1998; Collison y Duncan 2001; Cowlen, Zhang et al. 2003). El Ap<sub>4</sub>A produce en las fibras corticales del cristalino cambios en el Ca<sup>2+</sup> intracelular, lo que podría modular la actividad de diversos canales de K<sup>+</sup> (Rhodes,

Collison et al. 2003) que determinarían el potencial de membrana del cristalino, y canales de  $Cl^-$  (Valverde, Diaz et al. 1992) lo que contribuiría a la regulación del volumen del cristalino y su transparencia.

#### **3.2.4. Efecto en la producción de lisozima.**

La lactoferrina y lisozima son dos proteínas con acción bactericida encontradas en la lágrima (Leitch y Willcox 1998; Leitch y Willcox 1999a; Leitch y Willcox 1999b; Paulsen, Pufe et al. 2001). En el caso de la lisozima, su concentración en lágrima es independiente de la secreción lagrimal (Fullard y Snyder 1990; Sack, Beaton et al. 2000).

Se ha encontrado que en conejos de la raza Nueva Zelanda la aplicación tópica de algún nucleótido modifica la secreción de lisozima a la lágrima. La instilación de  $Ap_4A$  (en dosis de  $100 \mu M$ ), incrementa los niveles de lisozima a las dos horas en un 93 % sobre los valores control, alcanzando su incremento máximo a las 3-4 horas con un 140 %.

La instilación de una única dosis de diadenosina tetrafosfato mantiene los niveles de lisozima elevados por un periodo de 4 horas, lo que indica el potencial papel de este dinucleótido como tratamiento para infecciones (Peral, Loma et al. 2008).

#### **3.2.5. Diadenosin polifosfatos en la retina.**

La presencia y actividad de los diadenosina polifosfatos en la retina son de momento especulativas. Al ser la retina neural parte del Sistema Nervioso Central, podríamos esperar encontrar diadenosina polifosfatos almacenados junto a acetilcolina en las células amacrinas de la retina. Se han identificado diversos receptores del tipo P2X (Brandle, Guenther et al. 1998; Brandle, Kohler et al. 1998; Wheeler-Schilling, Marquardt

et al. 2001) y P2Y (Sugioka, Fukuda et al. 1996; Cowlen, Zhang et al. 2003; Fries, Wheeler-Schilling et al. 2004a; Fries, Wheeler-Schilling et al. 2004b) en la retina neural.

Sin embargo, de momento no existen evidencias que reporten un papel específico para los nucleótidos en la retina neural, y aunque se ha demostrado la liberación de dinucleótidos desde las células del epitelio pigmentado de la retina, no hay evidencia de la presencia natural de dinucleótidos extracelulares (Mitchell 2001; Pearson, Dale et al. 2005; Reigada y Mitchell 2005).

### 3.3 SÍNDROME DE OJO SECO

#### 3.3.1 Definición: signos y síntomas.

En el año 1995 en el Taller del National Eye Institute/Industry se decidió que el ojo seco se definiría como:

*“El ojo seco es un trastorno de la película lagrimal debido a una deficiencia lagrimal o a una evaporación excesiva, que daña la superficie ocular interpalpebral y que está asociado con síntomas de malestar ocular”. (Lemp 1995)*

Esta definición fue modificada en el año 2007 en otro taller denominado Dry Eye WorkShop (DEWS, en inglés), en el cual se creyó conveniente añadir a la definición anterior una mención a la osmolaridad, a la inflamación de la superficie ocular y también a los efectos sobre la calidad visual ([Not authors listed] (2007a)). Así, la definición actual de ojo seco es:

*“El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la película lagrimal y la superficie ocular que causa síntomas de malestar, trastornos visuales e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial en la superficie ocular. Va acompañada por un incremento en la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular”.*

Si analizamos en detalle la definición de ojo seco, encontramos que no estamos ante un trastorno solamente de la película lagrimal sino que envuelve a toda la superficie ocular, lo que se ha denominado como Unidad Funcional Lagrimal (LFU, sus siglas en inglés) (Stern, Beuerman et al. 1998a; Stern, Beuerman et al. 1998b).

Esta Unidad estaría compuesta por la superficie ocular (córnea y conjuntiva), las glándulas lagrimales, las glándulas de Meibomio, los párpados y la inervación que los conecta, tanto sensorial como motora. La Unidad controla y regula la lágrima respondiendo ante cualquier influencia ambiental o endocrina. Un daño en cualquiera de los componentes de la LFU puede desestabilizar la película lagrimal y causar una enfermedad en la superficie ocular que se presenta como ojo seco (Stern, Beuerman et al. 1998a; Stern, Beuerman et al. 1998b; Pflugfelder, Solomon et al. 2000).

Actualmente los signos oculares más relevantes se incluyen intencionadamente en la definición de ojo seco. Los pacientes con ojo seco presentan habitualmente síntomas de malestar como disconfort, sequedad, sensación de arena, irritación, sensación de cuerpo extraño, picor o sensibilidad a la luz (McMonnies 1986; Nichols, Begley et al. 1999; Schiffman, Christianson et al. 2000; Begley, Chalmers et al. 2001; Begley, Caffery et al. 2002a; Simpson, Situ et al. 2008; Johnson 2009).

En cuanto a los signos más habituales, y en función del tipo de ojo seco que presenten, los pacientes padecen hiposecreción lagrimal (Nichols, Nichols et al. 2003), inestabilidad de la película lagrimal (Goto, Zheng et al. 2003), hiperosmolaridad lagrimal (Farris, Stuchell et al. 1986; Tomlinson, Khanal et al. 2006), tinciones corneales y conjuntivales (Dursun, Ertan et al. 2003; Chen, Rao et al. 2009), pérdida de agudeza visual (Rieger 1992; Rieger 1993), aumento de las aberraciones oculares (Montes-Mico, Caliz et al. 2004a; Montes-Mico, Caliz et al. 2004b) e inflamación ocular (Tsubota, Fujihara et al. 1999; Massingale, Li et al. 2009).

### **3.3.2. Prevalencia y clasificación.**

Se considera que la prevalencia de ojo seco está entre el 5% y el 30%. Estas variaciones se deben principalmente a los diferentes cuestionarios de sintomatología que se han utilizado en cada estudio y a una diferente definición de ojo seco que hace que a un mismo sujeto se le considere paciente de ojo seco en un estudio y en otros no (Schein, Muñoz et al. 1997; McCarty, Bansal et al. 1998; Moss, Klein et al. 2000; Lin, Cheng et al. 2005; Schaumberg, Dana et al. 2009).

En España sólo existe un estudio publicado sobre la prevalencia de ojo seco (Viso, Rodriguez-Ares et al. 2009). En este estudio evaluaron a 654 sujetos entre 40 y 96 años en Santiago de Compostela, y encontraron una prevalencia de ojo seco del 11%. En un estudio realizado por Assumpta Peral y colaboradores, pendiente de su publicación, se encontró una prevalencia de ojo seco del 21% en sujetos que habitaban en Madrid y de un 13% en sujetos que tenían su residencia habitual en Alicante. Probablemente estas diferencias se deban a la zona geográfica donde se realizó el estudio.

El ojo seco se divide en dos tipos principales, el ojo seco acuodeficiente y el ojo seco evaporativo, los cuales no son independientes, sino que habitualmente los pacientes presentan eventos de los dos tipos.

El ojo seco acuodeficiente implica principalmente la disminución de la secreción lagrimal (Mathers y Daley 1996; Khanal, Tomlinson et al. 2009), que causa hiperosmolaridad y desencadena el resto de eventos que describiremos en la patogénesis del ojo seco (Li, Chen et al. 2004). Hay estudios que sugieren un aumento de la evaporación (Mathers y Daley 1996; Mathers, Lane et al. 1996a) y otros todo lo contrario, que se reduce la

evaporación (Tsubota y Yamada 1992), probablemente porque sean etapas diferentes de la enfermedad.

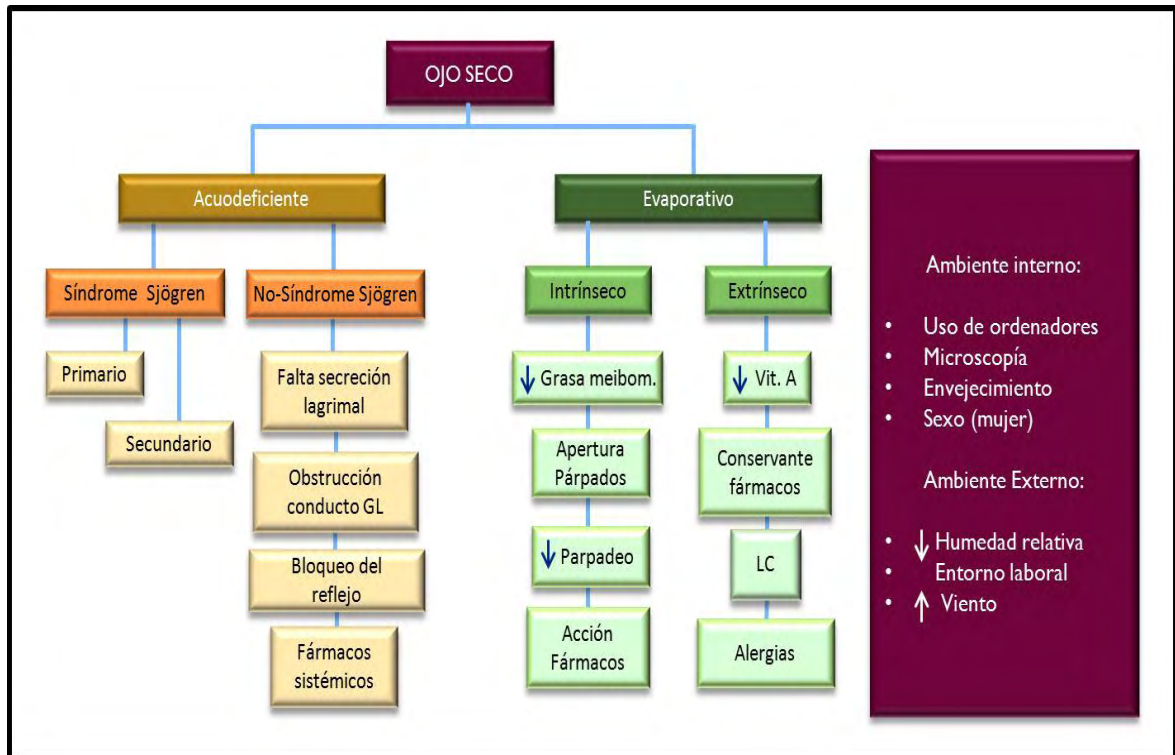


Figura 3.3. Clasificación de ojo seco.

El ojo seco acuodeficiente a su vez se divide en dos subclases, el ojo seco asociado al Síndrome de Sjögren (se describe con detalle en el apartado 3.3.6) y el ojo seco no asociado a Síndrome de Sjögren, figura 3.3.

La falta de secreción acuosa en el ojo seco no asociado a Síndrome de Sjögren más común es el relacionado con la edad (Damato, Allan et al. 1984; Obata, Yamamoto et al. 1995; Mathers, Lane et al. 1996b) , al que en el pasado se denominaba *keratoconjuntivitis sicca* (denominación que actualmente se utiliza para cualquier tipo de ojo seco) (Lemp 1995).

Otras causas de la disminución de la secreción lagrimal son infiltraciones de células inflamatorias en la glándula lagrimal que ocurre en los pacientes con sarcoidosis (Graham 1986) y SIDA (DeCarlo, Penner et al. 1995), también la obstrucción de los conductos lagrimales, como ocurre en el tracoma (Tabbara y Bobb 1980), en el eritema multiforme (Chang, Huang et al. 2007), o en el penfigoide cicatricial (Dart 2005). Un bloqueo sensorial reflejo debido a una queratitis neurotrófica (Heigle y Pflugfelder 1996), o que parece que ocurre también en la diabetes (Kaiserman, Kaiserman et al. 2005; Akinci, Cetinkaya et al. 2007; Alves Mde, Carvalheira et al. 2008) reduciría la secreción lagrimal y la frecuencia de parpadeo provocando ojo seco (Jordan y Baum 1980).

Algunos fármacos sistémicos provocan una disminución de la secreción lagrimal entre los que se encuentran los antihistamínicos, betabloqueantes, diuréticos, anticonceptivos o ansiolíticos y antidepresivos (Jaanus 1992; Sullivan, Belanger et al. 2003; Moss, Klein et al. 2004; Bielory 2006). Los conservantes de los fármacos tópicos inducen una respuesta inflamatoria en la superficie ocular que desencadenaría sintomatología de ojo seco. El más común es el cloruro de benzalconio (BAC), el cual provoca daños en las células epiteliales y queratitis punteada (Geerling, Daniels et al. 2001; Pisella, Pouliquen et al. 2002).

El otro tipo principal de ojo seco es el evaporativo, en el cual hay una pérdida de lágrima exagerada dejando la superficie ocular más expuesta a pesar de una secreción lagrimal normal. Este tipo de ojo seco se divide a su vez en intrínseco, cuando la causa es una patología o una disfunción propia del paciente, y en extrínseco, cuando algún factor externo produce la evaporación excesiva. La diferenciación entre estos dos subtipos de ojo seco evaporativo es muy difusa, al igual que entre los dos tipos principales.

Entre las causas intrínsecas de ojo seco evaporativo nos encontramos con disfunciones en las glándulas de Meibomio, que afectan a la formación de una capa lipídica uniforme y

estable, la cual es necesaria para mantener la estabilidad de la película lagrimal (Mathers 1993; Bron y Tiffany 2004). Patologías como el hipertiroidismo o el Parkinson inducen ojo seco debido a trastornos en el parpadeo o en la apertura palpebral provocan una mayor exposición de la superficie ocular, aumentando la evaporación de la lágrima (Gilbard y Farris 1983; Tamer, Melek et al. 2005).

La causa extrínseca más relevante es el uso de lentes de contacto. La prevalencia del ojo seco en usuarios de lentes de contacto está entre el 20 y el 70% de los usuarios (Caffery, Richter et al. 1998; Begley, Caffery et al. 2000; Begley, Chalmers et al. 2001; Nichols, Mitchell et al. 2002), siendo el ojo seco la principal causa de abandono de las lentes de contacto (Young, Veys et al. 2002). La lente de contacto rompe la película lagrimal, dejando una capa pre lente muy fina, con una capa lipídica irregular que provoca un aumento de la evaporación durante su uso (Nichols y Sinnott 2006).

Existen otras condiciones que se consideran de riesgo para padecer ojo seco. Se muestran en el cuadro de la derecha de la figura 3.3. existen diversos estudios que evidencian el aumento de ojo seco en mujeres, principalmente en el periodo post menopáusico (Peterson, Leshner et al. 2002; Schaumberg, Sullivan et al. 2003; Duarte, Pinto et al. 2007; Erdem, Ozdegirmenci et al. 2007; Srinivasan, Joyce et al. 2008), en sujetos que utilizan ordenadores o están expuestos a ambientes con una baja humedad relativa (Franck 1986; Tsubota y Nakamori 1993; Hagan y Lory 1998; Doughty, Blades et al. 2002; Schlote, Kadner et al. 2004; Gonzalez-Meijome, Parafita et al. 2007; Uchino, Schaumberg et al. 2008).

### 3.3.3. Patogénesis.

Existen dos mecanismos claves en el proceso del ojo seco, los cuales pueden ser iniciados o aumentados por las diferentes causas o factores de riesgo mostrados en el apartado anterior, que son la hiperosmolaridad lagrimal y la inestabilidad de la película lagrimal.

En la figura 3.4 se muestran los factores de riesgo y las causas conocidas de ojo seco, que llevan a una cascada de reacciones biológicas que crean un círculo vicioso alrededor de estos dos mecanismos principales de ojo seco.

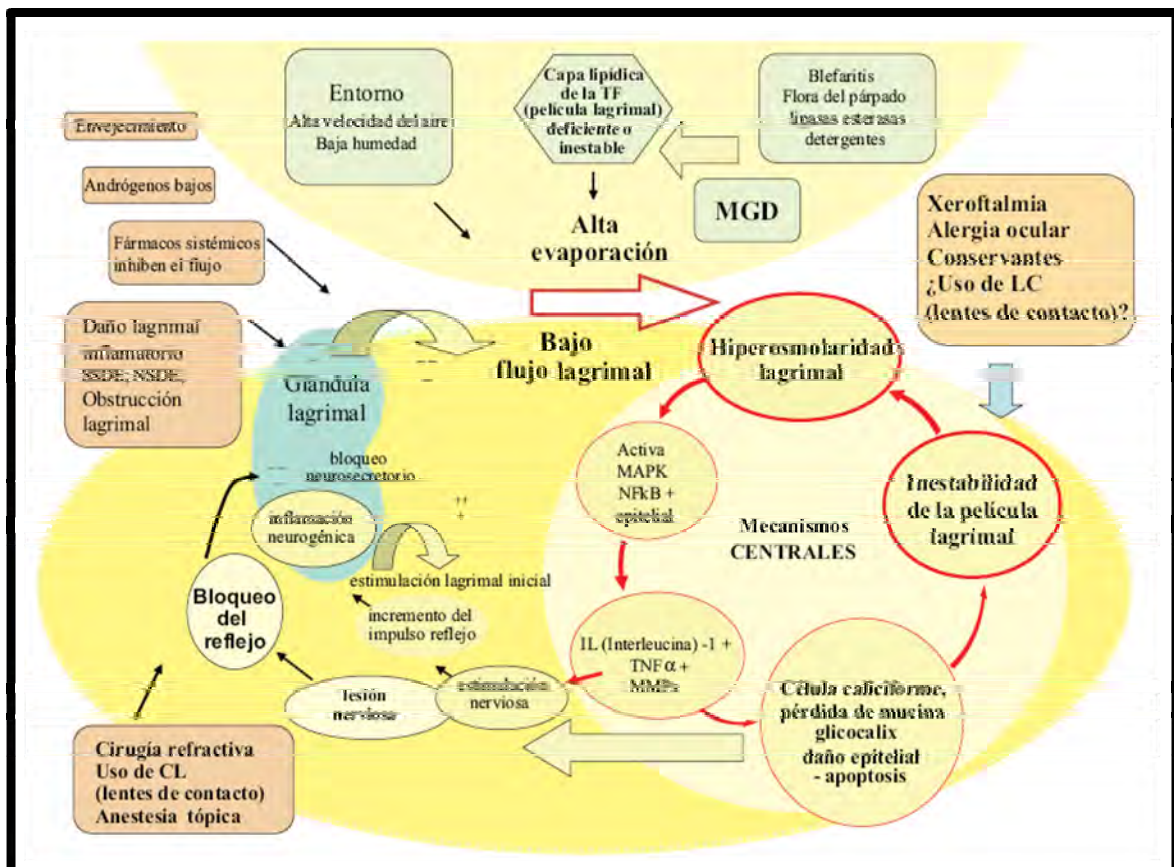


Figura 3.4. Patogénesis del ojo seco. En este esquema se muestra como diferentes eventos inician o aumentan los mecanismos principales de ojo seco, la hiperosmolaridad y la inestabilidad lagrimal, causando un círculo vicioso [Not authors listed] (2007a).

La hiperosmolaridad de la lágrima provoca daño en el epitelio de la superficie ocular al activar una cascada de eventos inflamatorios en la superficie, así como la liberación de mediadores inflamatorios a la lágrima como son las citoquinas, las metaloproteasas (MMP) o las interleuquinas (Li, Chen et al. 2004; Luo, Li et al. 2004; Luo, Li et al. 2005; De Paiva, Corrales et al. 2006). Estos eventos llevan a la apoptosis de las células caliciformes (Brignole, Pisella et al. 2000; Yeh, Song et al. 2003), lo que reduce significativamente la producción de mucina, como la MUC5AC (Zhao, Jumblatt et al. 2001). Esta disminución mucínica lleva a la inestabilidad de la película lagrimal -el otro gran mecanismo del proceso del ojo seco- cerrando el círculo vicioso, ya que una mayor evaporación de la lágrima conlleva un aumento de la osmolaridad por la disminución de la componente acuosa en la película lagrimal.

El daño superficial que se produce en la superficie ocular por los eventos inflamatorios, provoca inicialmente una estimulación de las terminaciones nerviosas corneales que aumenta la percepción de sintomatología típica de ojo seco. En un intento de disminuir la sintomatología, aumenta la secreción lagrimal refleja. En estados más avanzados de ojo seco, la acción prolongada de los mediadores inflamatorios sobre las terminaciones nerviosas reduce la sensibilidad corneal y el impulso sensorial reflejo (Xu, Yagi et al. 1996; Bourcier, Acosta et al. 2005), haciendo que la secreción lagrimal disminuya y por tanto, aumente la osmolaridad de la película lagrimal.

### 3.3.4. Diagnóstico.

El diagnóstico del ojo seco es difícil porque es una patología que presenta una gran variedad de signos y síntomas y además no existe una correlación entre ellos. Se dan casos de ojo seco con sintomatología pero sin presencia de signos ocular y viceversa (Schein, Tielsch et al. 1997; Nichols, Nichols et al. 2004).

Al no existir un prueba “*Gold standard*” para el diagnóstico del ojo seco, el subcomité de metodologías para el diagnóstico del DEWS recomienda la combinación de algunas de las siguientes pruebas [Not authors listed] (2007c):

**1.- Cuestionarios de síntomas.-** Son test diseñados para conocer la sintomatología relacionada con el ojo seco que presenta el paciente así como los factores ambientales e historia médica que supongan un factor de riesgo para el ojo seco.

Existen varios tipos de cuestionarios de ojo seco siendo el cuestionario de McMonnies (McMonnies y Ho 1987a), el cuestionario de ojo seco (DEQ, en inglés) con su versión para lentes de contacto (CLDEQ, en inglés) (Begley, Caffery et al. 2002a; Nichols, Mitchell et al. 2002), el índice de enfermedad de la superficie ocular (OSDI, en inglés) (Schiffman, Christianson et al. 2000) y el cuestionario de Schein los más utilizados (Schein, Tielsch et al. 1997). En España, contamos con un cuestionario validado desarrollado por Donate y colaboradores (Donate, Benítez del Castillo et al. 2002)

**2.- Test para evaluar la tinción corneal.-** Para determinar defectos o erosiones en la superficie ocular se utilizan colorantes como la fluoresceína para la córnea, la cual se observa mejor con un filtro amarillo, o verde de lisamina o rosa de bengala para evaluar la conjuntiva. Los sistemas más habituales para cuantificar la tinción de la superficie

ocular son el sistema de Van Bijsterveld (van Bijsterveld 1969), el sistema Oxford (Bron, Evans et al. 2003) y el sistema CLEK (Lemp 1995).

**3.- Estabilidad de la película lagrimal.-** Para la evaluación de la inestabilidad lagrimal el test más utilizado es el tiempo de rotura de la película lagrimal (TFBUT, en inglés). Para realizar esta prueba hay que instilar fluoresceína sódica en la superficie ocular. El valor de corte habitual es 10 segundos (Vitali, Moutsopoulos et al. 1994), pero más recientemente Abelson y colaboradores sugirieron que cuando se instilan volúmenes pequeños de fluoresceína (en su estudio se instilaban 2 µl con una pipeta) el valor diagnóstico debía ser 5 segundos (Abelson, Ousler et al. 2002).

Para evaluar la estabilidad lagrimal también existen pruebas no invasivas como la observación de las glándulas de Meibomio o el tiempo de rotura no invasivo (NIBUT, en inglés) (Madden, Paugh et al. 1994).

**4.- Test para evaluar el volumen lagrimal.-** Con este tipo de pruebas se determina la secreción lagrimal, tanto refleja como basal. El más común es el test de Schirmer, que se realiza con un papel Wathman no. 1. El valor de corte para esta prueba es de 5,5 mm en 5 minutos (van Bijsterveld 1969). Estudios recientes plantean la reducción del tiempo de la tira en el ojo a 1 o 2 minutos, reduciendo así la incomodidad al paciente (Karampatakis, Karamitsos et al. 2010; Kashkouli, Pakdel et al. 2010).

Otros test menos invasivos para evaluar el volumen lagrimal son el hilo de rojo fenol el índice de producción lagrimal (TTR, en inglés) o la cuantificación del menisco lagrimal (Occhipinti, Mosier et al. 1988).

**5.- Test para evaluar la osmolaridad.-** Siendo la hiperosmolaridad uno de los mecanismos centrales en la patogénesis del ojo seco, poder obtener una medida de la

osmolaridad lagrimal es una herramienta relevante para el diagnóstico del ojo seco. Hasta ahora era una prueba de laboratorio con un acceso muy limitado por los profesionales clínicos (Tomlinson, Khanal et al. 2006).

Actualmente se dispone de un osmómetro compacto que necesita muy poca cantidad de lágrima para medir la osmolaridad al instante. Este instrumento, denominado Tearlab osmolarity, es el primero de uso completamente clínico que evalúa la osmolaridad lagrimal (Benelli, Nardi et al. 2010).

### **3.3.5. Tratamiento.**

El tratamiento del ojo seco es difícil y muchas veces frustrante, ya que las causas que lo motivan en la mayoría de las ocasiones no tienen un tratamiento satisfactorio ni específico. Por ello es muy importante explicar claramente la naturaleza de la enfermedad al paciente y ofrecerle una serie de alternativas para que, en función la severidad del ojo seco, se opte por el tratamiento más correcto en cada momento de su patología.

La primera opción terapéutica ante un ojo seco leve o moderado son los lubricantes, conocidos como lágrimas artificiales a pesar de que no mimetizan la composición de la lágrima humana. Se caracterizan por ser soluciones isotónicas o algo hipotónicas, que contienen electrolitos, surfactantes, tampones y diversos tipos de agentes viscosos y lubricantes. Entre sus propiedades físico-químicas más importantes están una baja tensión superficial, un pH neutro o ligeramente alcalino y una osmolaridad similar a la lágrima humana (Motolko y Breslin 1981; Wee, Wang et al. 1995). Lo ideal es que no lleven conservantes, ya que son citotóxicos y con el uso habitual revierten el efecto del tratamiento (Albietz y Bruce 2001).

Basado en el concepto de que la inflamación de la superficie ocular es un mecanismo clave de la patogénesis del ojo seco, se han desarrollado fármacos antiinflamatorios para esta patología. Las tres familias de antiinflamatorios utilizados son la ciclosporina, los corticoides y las tetraciclinas. La ciclosporina presenta un efecto de mejora en los signos y síntomas de ojo seco después de varias semanas de tratamiento, siendo el mayor efecto más allá de los 6 meses. En España no se comercializa bajo ningún nombre comercial pero si bajo fórmula magistral al 0,05% (Stevenson, Tauber et al. 2000; Brignole, Pisella et al. 2001). Los corticoides poseen una acción anti inflamatoria más rápida que la ciclosporina, siendo otra opción de tratamiento (Pflugfelder, Maskin et al. 2004).

Además de la ciclosporina y los corticoides, las tetraciclinas y sus análogos, minociclina y doxyciclina, son usadas para el tratamiento de patologías que causan ojo seco como la acné rosácea, la blefaritis o la meibomianitis (Ta, Shine et al. 2003) . Las propiedades de estos compuestos que mejoran los signos clínicos del ojo seco son su capacidad antibacteriana, antiinflamatoria y antiangiogénica (Dougherty, McCulley et al. 1991; Shine, McCulley et al. 2003) .

La aplicación tópica de sueros biológicos como el suero sanguíneo o el suero amniótico puede mejorar los signos clínicos del ojo seco. Estos fluidos tienen una composición con ciertas similitudes a la lágrima natural y además son ricos en factores de crecimiento, vitaminas, inmunoglobulinas y otras proteínas necesarias para mantener sana la superficie ocular. El más utilizado es el suero sanguíneo del propio paciente (suero autólogo) que se prepara en concentraciones habitualmente del 20%-30% (Kobayashi, Kabuyama et al. 2002; Kojima, Higuchi et al. 2008).

Recientemente se ha incluido como una posible terapia para el ojo seco la toma de ácidos grasos esenciales como el Omega-3 (Peral, Dominguez-Godinez et al. 2008). Se

ha demostrado que el ácido linoleico y el ácido  $\gamma$ -linoleico administrado oralmente dos veces al día provoca una mejora significativa en los síntomas de irritación ocular (Barabino, Rolando et al. 2003).

El último fármaco aprobado para su comercialización es el DIQUAS, que comercializará Santen Pharmaceuticals en Japón. Es un secretagogo análogo del  $Ap_4A$ , el cual tiene la característica de estimular la secreción de los tres componentes principales de la lágrima, el agua, las mucinas y los lípidos. Los ensayos clínicos también han demostrado que reducen significativamente la tinción corneal (Tauber, Davitt et al. 2004).

Además de los tratamientos farmacológicos para el ojo seco, existen otras terapias físicas como los tapones para el punto lagrimal, las gafas con cámara de humedad o las lentes de contacto.

Los tapones del punto lagrimal están indicados en pacientes de ojo seco que tienen valores de Schirmer por debajo de 5mm en 5 minutos y con una tinción evidente en la superficie ocular. No está indicado el uso de los tapones en pacientes con alergias a los materiales, con obstrucción del conducto lagrimal, ectropión o inflamación de la superficie ocular con un pobre aclaramiento lagrimal (Baxter y Laibson 2004).

En casos de ojo seco severo, el uso de la lente de contacto con una alta permeabilidad puede ser recomendable para proteger e hidratar la superficie ocular (Bacon, Astin et al. 1994; Romero-Rangel, Stavrou et al. 2000; Rosenthal, Cotter et al. 2000; Rosenthal, Baran et al. 2009).

### **3.3.6 Síndrome de Sjögren.**

Henrik Sjögren describió en el año 1933 un síndrome que afectaba principalmente a mujeres y que padecían ojo seco, artritis reumatoide y sequedad bucal (Sjögren 1933). Unos años después, concretamente en 1965, se describió este síndrome con el nombre de su descubridor (Bloch, Buchanan et al. 1965). Este síndrome se define actualmente como una patología autoinmune en la cual el sistema inmune del cuerpo ataca erróneamente a las glándulas exocrinas, en particular a las glándulas salivares y la glándula lagrimal principal (Srinivasan y Slomovic 2007).

El Síndrome de Sjögren se clasifica en primario cuando sólo son afectadas las glándulas exocrinas del cuerpo, y en secundario cuando va asociado a otras enfermedades autoinmunes del sistema conectivo como la artritis reumatoide (Lemp 2005), el lupus eritematoso o esclerosis sistémica (Ellemann, Krogh et al. 1991; Azarisman y Heselynn 2007). Hay estudios que relatan una prevalencia del 0,5% de la población, afectando entre 1 millón y 4 millones de personas en el mundo, siendo más prevalente entre las mujeres con un ratio de 9 mujeres por cada hombre afectado ([Not authors listed] (2007b; Haugen, Peen et al. 2008; Birlik, Akar et al. 2009). Está considerada como una enfermedad rara tanto en Europa como en Estados Unidos. Una característica importante en el Síndrome de Sjögren es su predisposición genética, siendo los marcadores genéticos de esta patología los antígenos humanos de leucocito HLA-DR y HLA-DQ (Bolstad y Jonsson 2002).

La patogénesis del Síndrome de Sjögren en la unidad funcional lagrimal ha sido ampliamente descrita. Ante el ataque autoinmune de las glándulas exocrinas, los linfocitos T, en concreto linfocitos T CD4 y CD8, infiltran las glándulas lagrimales y salivales, causando la muerte celular de los acinos y los conductos. Además se produce una liberación de mediadores inflamatorios como las citoquinas que permiten la sobre

expresión de antígenos SS-A/ro y SS-B/La. Todo esto da como resultado una hiposecreción tanto lagrimal como salival (Hayashi, Arakaki et al. 2003; Nakamura, Kawakamu et al. 2006).

Los principales signos oculares en el Síndrome de Sjögren primario son la acuodeficiencia lagrimal y el daño epitelial de la superficie ocular severo. Los pacientes con Síndrome de Sjögren relatan padecer sequedad, sensación de arena y ojos irritados como los síntomas más comunes (Schein, Tielsch et al. 1997). Además presentan sintomatología sistémica como xerostomía, sequedad de la piel y de las mucosas respiratorias que en los casos más severos provocan insuficiencia respiratoria (Matteson y Ike 1990; Koseki, Maki et al. 2004). Cuando hablamos de Síndrome de Sjögren secundario hay que añadir a esta sintomatología dolor articular y muscular, vitíligo, alopecia y linfomas cutáneos, que son signos habituales de las patologías que se asocian con el Síndrome de Sjögren (Fox 2005; Nguyen y Peck 2009).

Para su diagnóstico se llegó a un consenso internacional por el que se evalúan 6 criterios diferenciados. En el primer criterio se evalúan los síntomas oculares, al menos deben llevar con sintomatología severa los últimos tres meses o tener la necesidad de utilizar lágrima artificial más de 3 veces al día. El segundo criterio se refiere a la sintomatología oral, donde al menos deben presentar la necesidad de beber líquidos para tragar los alimentos más secos o presentar sequedad bucal al menos desde hace tres meses.

Los siguientes dos criterios se refieren a los signos oculares y orales. Los pacientes deben presentar al menos un test de Schirmer sin anestesia por debajo de 5 mm en 5 minutos o una tinción con verde de lisamina o Rosa de Bengala de grado 4 según los criterios de Van Bijnsterveld. Los dos últimos criterios se refieren a presentar un resultado positivo de infiltración linfocitaria al realizar una biopsia de glándula salival y presentar anticuerpos como el anti-Ro o anti-La en una analítica sanguínea.

Para dar un diagnóstico positivo de Síndrome de Sjögren los pacientes deben presentar al menos cuatro de estos criterios incluyendo la biopsia de glándula salival o la presencia de anticuerpos en sangre (Vitali, Bombardieri et al. 2002).

### **3.3.7 Ojo seco post cirugía refractiva.**

Las técnicas quirúrgicas más comunes para la corrección de errores refractivos son el Laser in situ keratomileusis (LASIK) y la queratectomía fotorrefractiva (PRK, en inglés). Estas técnicas consiguen un alto índice de satisfacción y una importante mejora en la calidad de vida de los pacientes permitiendo la corrección de altas potencias (Tahzib, Bootsma et al. 2005; Belfort, Campos et al. 2008).

Ha cobrado un interés importante el problema del ojo seco asociado a la cirugía refractiva, por un lado debido al gran número de procedimientos de cirugía refractiva que se hacen hoy día, y por otro porque con la queratitis punctata es la complicación postoperatoria más frecuente (Ambrosio, Tervo et al. 2008). Además es la mayor causa de insatisfacción entre los pacientes y de frustración para los cirujanos (Bailey, Mitchell et al. 2004; Jabbur, Sakatani et al. 2004)

Existen muchos estudios sobre la asociación entre la cirugía refractiva y el ojo seco. Aunque no existe unanimidad, parece que el ojo seco postcirugía es más marcado en el LASIK que en la PRK. Los pacientes presentan en general un descenso de la secreción lagrimal, una menor densidad de células Goblet así como una disminución en el ratio de parpadeo que aumenta la inestabilidad lagrimal permitiendo la aparición de sintomatología de ojo seco durante el primer año postcirugía refractiva (Lee, Ryu et al. 2000; Battat, Macri et al. 2001; Benítez-del-Castillo, del Rio et al. 2001; Rodríguez-Prats, Hamdi et al. 2007).

El desencadenante que induce ojo seco tras la cirugía refractiva es el daño en la superficie ocular como en estroma que provocan ambas técnicas quirúrgicas. En el caso del LASIK, se realiza un corte con un microqueratomo para levantar una porción de la córnea (epitelio corneal y parte del estroma anterior), dejando un lecho estromal donde se aplicará el láser. En el caso de la PRK se debrida el epitelio corneal y se aplica el láser. En ambos casos, un gran número de fibras nerviosas sensoriales son dañadas causando una disminución de la sensibilidad corneal que provoca la disminución de la secreción lagrimal (Perez-Santonja, Sakla et al. 1999; Patel, Perez-Santonja et al. 2001; Belmonte, Acosta et al. 2004).

No existen consenso en cuanto al tiempo que tardan los pacientes en recuperar la sensibilidad corneal y por tanto la mejora de los signos de ojo seco tras la cirugía refractiva. La mayoría de los trabajos hablan de entre 6 y 12 meses (Perez-Santonja, Sakla et al. 1999; Battat, Macri et al. 2001; Benítez-del-Castillo, del Rio et al. 2001). Toda y colaboradores encontraron que mientras que la sensibilidad corneal se recupera a los 6 meses del LASIK en pacientes que tenían ojo seco moderado o grave preoperatoriamente, en aquellos que no lo tenían antes de la intervención la sensibilidad vuelve a sus valores normales en 3 meses (Toda, Asano-Kato et al. 2002). En cambio, otros estudios reportan que después de un año tras la cirugía refractiva se han regenerado menos de la mitad de las terminaciones nerviosas (Lee, McLaren et al. 2002).

Es importante, para evitar ojo seco severo tras la cirugía refractiva, realizar una evaluación pre operatoria de los signos de ojo seco y en el caso de que se encuentren valorar un tratamiento preventivo o descartar la cirugía (Ambrosio, Tervo et al. 2008). Parece que una prueba predictiva del ojo seco post cirugía refractiva es el test de Schirmer sin anestesia. Los pacientes que desarrollaron ojo seco tras el LASIK mostraron

un volumen lagrimal pre cirugía significativamente inferior que aquellos pacientes que no desarrollaron ojo seco después de la intervención quirúrgica (Konomi, Chen et al. 2008).

## 3.4 ANIRIDIA CONGÉNITA

### 3.4.1. Definición.

La Aniridia Congénita, descrita por primera vez por Barratta en 1818 como ausencia de iris, se define como una alteración congénita que afecta al desarrollo del ojo (Nelson, Spaeth et al. 1984; Lilakova, Hejcmanova et al. 2002). Es una enfermedad bilateral con una prevalencia entre 1:64.000 y 1:96.000, que afecta de igual manera a hombres y a mujeres y no prevalece en ninguna raza (Bremond-Gignac 2007; Eden, Iggman et al. 2008).

Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante por mutaciones en el gen PAX6, gen responsable del desarrollo del ojo, cerebro y tejido nasal, el cual se encuentra en el brazo corto del cromosoma 11 (Churchill y Booth 1996; Tiller, Odenthal et al. 2003). Recientemente se han descubierto (Secker y Daniels 2008; Villarroel, Villanueva-Mendoza et al. 2008; Neethirajan, Solomon et al. 2009; Zhang, Li et al. 2009) nuevas mutaciones en el PAX6 que provocan Aniridia. Las mutaciones en el gen PAX6 también son responsables del Síndrome de Peters (Churchill y Booth 1996).

Alrededor del 80% de los casos se presentan de manera aislada (Aniridia tipo 1) sin afectación sistémica. En el resto (Aniridia tipo 2) va acompañada de signos sistémicos como el tumor de Wilms (tumor del riñón que se desarrolla en la infancia), retraso mental y afectación genitourinaria. Esta anomalía se conoce como Síndrome de WAGR y se debe a que la mutación en el brazo corto del cromosoma 11 afecta al gen PAX6 y también al gen WT1, responsable del tumor de Wilms (Imaizumi 2000; Nada, Rattan et al. 2003; Fischbach, Trout et al. 2005).

Cuando la enfermedad no ha sido heredada, alrededor del 15% de los casos, las probabilidades de padecer el síndrome de WAGR se multiplican, alcanzando a un tercio de los afectados (Imaizumi 2000).

Existen casos esporádicos, solo el 2%, en los que la herencia es autosómica recesiva. Esta afectación se conoce como Síndrome de Gillespie, en el cual además de Aniridia se produce una ataxia cerebelosa que provoca retraso mental y falta de coordinación. Algunos estudios han demostrado que el gen PAX6 no es el responsable de este síndrome aunque se desconoce la causa que lo provoca (Glaser, Ton et al. 1994; Lilakova, Hejcmanova et al. 2002; Defreyn, Maugery et al. 2007).

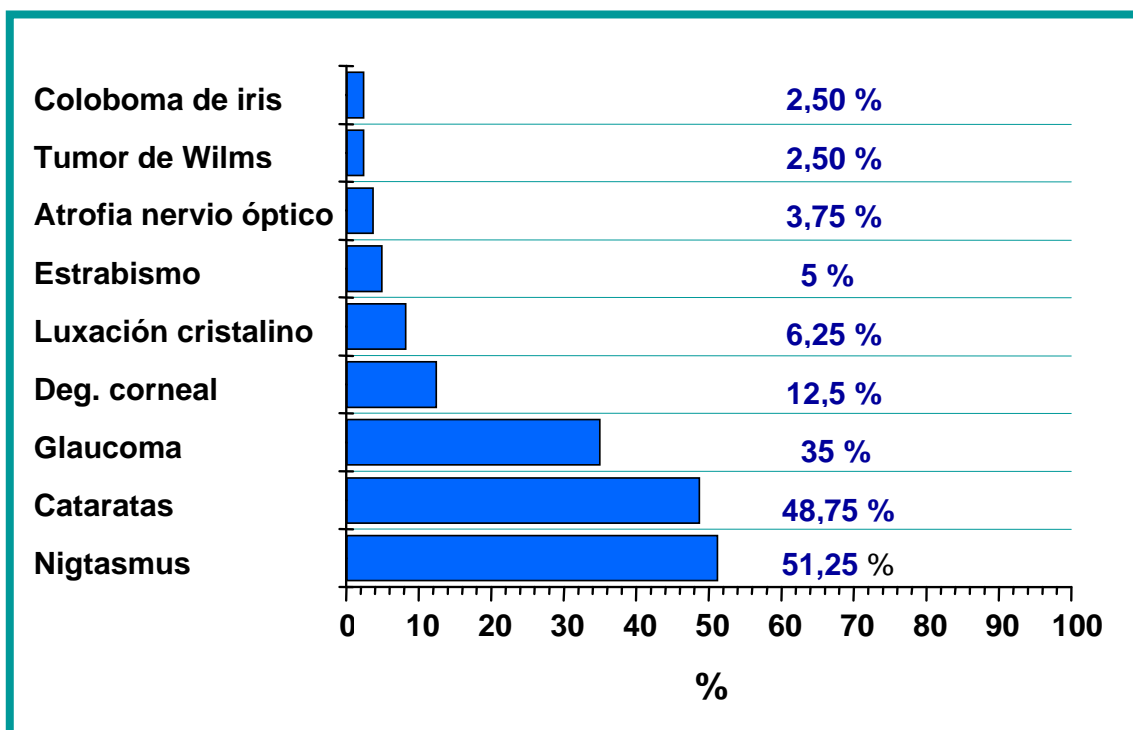
En la actualidad en España hay aproximadamente 400 afectados censados por la Asociación Española de Aniridia y figura en la lista de enfermedades raras publicada por el Ministerio de Sanidad.

### **3.4.2. Signos y síntomas de la superficie ocular.**

El signo más característico de la Aniridia, del cual proviene su nombre, es la falta total o parcial de iris. Pero la afectación del iris puede ser muy diversa, desde la ausencia total del iris hasta una ligera hipoplasia de su estroma con pupila de apariencia normal. La mayoría de los pacientes presentan iris muy poco desarrollados y prácticamente sin funcionalidad causando una fotofobia muy importante (Yang, Lu et al. 2004; Wong, Lam et al. 2005).

En la figura 3.5 se muestra las diferentes alteraciones oculares que se presentan en los pacientes con Aniridia congénita. Los porcentajes de incidencia están basados en datos recogidos entre los asociados en la Asociación Española de Aniridia pero no son

concluyentes, ya que la incidencia es muy variable dependiendo del estudio que se consulte (Nelson, Spaeth et al. 1984; Churchill y Booth 1996; Tiller, Odenthal et al. 2003).



**Figura 3.5. Porcentajes de incidencia de algunas alteraciones oculares en pacientes con Aniridia. (Datos facilitados por la Asociación Española de Aniridia).**

Si empezamos la exploración del ojo anirídico desde el polo anterior al posterior, la primera estructura afectada es la película lagrimal. Se afirma que el 56% de los anirídicos sufre ojo seco severo con un proceso mucodeficiente, según el criterio de ojo seco de Madrid, debido a una deficiencia de células caliciformes conjuntivales. El resto de los anirídicos presentan ojo seco pero de menor grado (Rivas, Murube et al. 2003; Jastaneiah y Al-Rajhi 2005).

Algunos estudios sugieren valores bajos en el test de Schirmer, y poca estabilidad de la película lagrimal, por disfunción de las glándulas de Meibomio (Mackman, Brightbill et al. 1979), aumentando el riesgo de úlceras corneales (Jastaneiah y Al-Rajhi 2005), pero

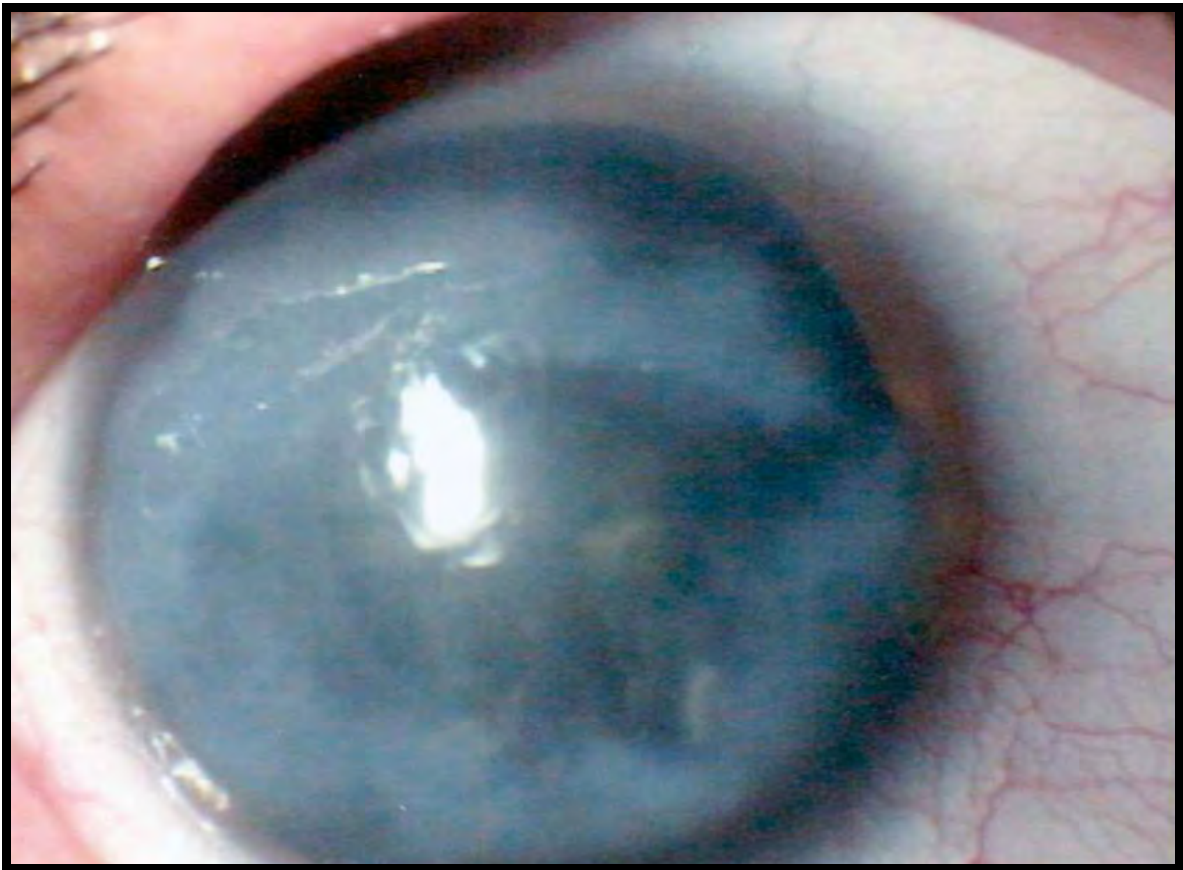
otros no encuentran valores anómalos en el volumen lagrimal (Lopez-Garcia, Rivas et al. 2008).

Sequedad ocular, irritación y picor son los síntomas más habituales entre los pacientes con Aniridia que presentan ojo seco. La gran mayoría de los afectados utilizan lágrimas artificiales sin conservantes para mejorar su sintomatología (Rivas, Murube et al. 2003).

La córnea es la estructura ocular más afectada, excluyendo el iris. Las mutaciones en el PAX6 provocan un desarrollo deficiente de las células Stem, responsable de la proliferación de células epiteliales corneales, en el limbo esclerocorneal y de la migración de las células epiteliales. Así, en los anirídicos, no hay una regeneración correcta del epitelio corneal causando queratopatías de diverso grado (Dua, Saini et al. 2000).

Los primeros signos de alteraciones corneales aparecen en los dos primeros años de vida, en los cuales se produce un adelgazamiento del epitelio y los vasos sanguíneos empiezan a invadir capas superficiales en la zona inferior y superior de la córnea, terminando por cubrir toda la periferia, alteración conocida como pannus corneal (Lopez-Garcia, Rivas et al. 2008).

La neovascularización corneal avanza irremediablemente hacia el centro de la córnea, aparecen estrías en la membrana de Bowman, manchas de Bitot en la conjuntiva y células epiteliales conjuntivales invaden epitelio corneal. En los grados más severos de insuficiencia de células Stem en el limbo la córnea se opacifica por completo, impidiendo la visión (Figura 3.6). Además, algunos autores relatan la presencia de microcórnea, hipoplasia de la membrana de Bowman y queratitis ulcerosas en algunos pacientes con Aniridia (Nelson, Spaeth et al. 1984; Jastaneiah y Al-Rajhi 2005).



**Figura 3.6. Paciente anirídico con opacidad corneal debido a la deficiencia de células Stem en el limbo corneal. (Foto cedida por Asociación española de Aniridia).**

La mayoría de los pacientes anirídicos necesitan tratamientos farmacológicos para el ojo seco (lágrimas artificiales, suero autólogo, pomadas reepitelizantes,...). En los casos de degeneración corneal severa, en los que la agudeza visual está muy mermada, hay que realizar trasplante de córnea y de limbo esclerocorneal o el implante de una membrana amniótica (Holland, Djalilian et al. 2003; Mayer, Nordlund et al. 2003; Tiller, Odenthal et al. 2003). El riesgo de rechazo cuando se realiza un trasplante de limbo es alto debido a que es una zona muy vascularizada y los pacientes operados deben seguir un tratamiento con inmunodepresores (Holland, Djalilian et al. 2003).

### **3.4.3. Otros signos oculares.**

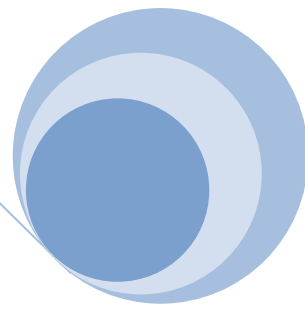
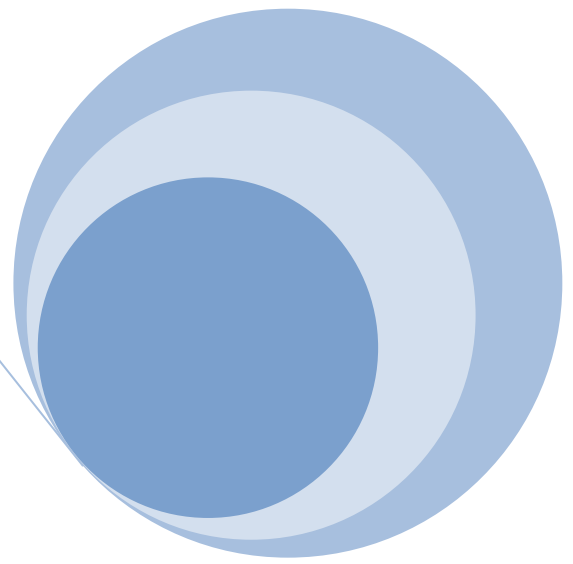
Las alteraciones corneales no son la única causa de pérdida de visión. Diversos estudios calculan que el 75% de los anirídicos padecen glaucoma. La mayoría de los casos se presentan en edad adolescente siendo raro en niños o recién nacidos. La aparición del glaucoma en la segunda década de vida se debe a un progresivo desplazamiento hacia delante por parte del tejido rudimentario del iris, debido a la contracción de las fibras preexistentes que pasan sobre el ángulo, y que termina taponando la malla trabecular (Bremond-Gignac 2007) .

Cuando el glaucoma es congénito el mecanismo que lo provoca es diferente. En este caso no existe invasión del ángulo iridocorneal por parte del tejido rudimentario del iris sino que durante el desarrollo ocular se forma una capa vascularizada que cubre todo el ángulo, impidiendo el drenaje del humor acuoso (Yi, Kelly et al. 2008; Diago, Harto et al. 2009).

Además, recientemente se ha demostrado que el espesor corneal en pacientes con Aniridia congénita es sensiblemente superior a pacientes no anirídicos (Lopes, Wilson et al. 2007). Esta característica de la córnea hay que considerarla a la hora de medir la PIO ya que interfiere en la medida, dando valores más elevados de lo normal.

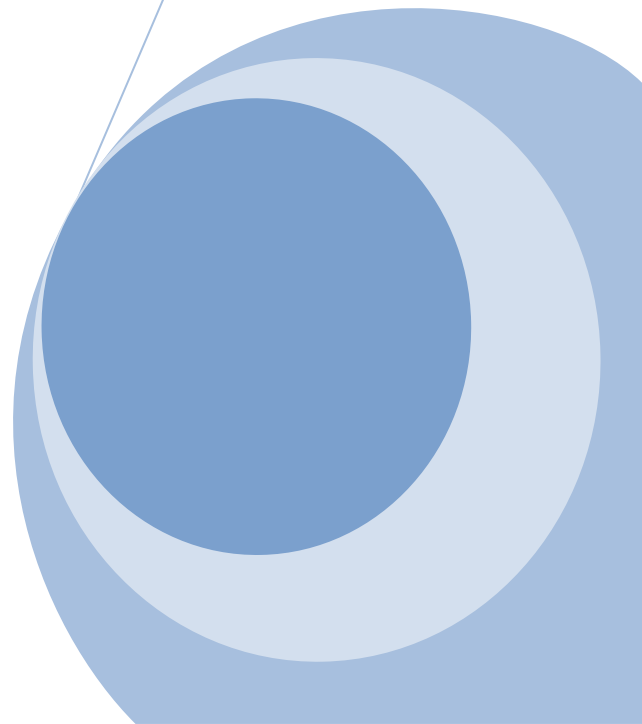
Entre el 50% y el 85% de los pacientes con Aniridia congénita padecen cataratas, las cuales se desarrollan durante la adolescencia, aunque es habitual encontrar en los recién nacidos pequeñas opacidades en el cristalino que no comprometen la visión. A veces aparecen cataratas congénitas que hay que extraer con celeridad para evitar futuras ambliopías. Corticales, nucleares, piramidales y capsulares anteriores son los tipos de cataratas más frecuentes en pacientes anirídicos. Subluxaciones de cristalino también han sido descritas pero en casos esporádicos (Lilakova, Hejcmanova et al. 2002).

La mayoría de los anirídicos presentan algún grado de hipoplasia del nervio óptico y también de mácula. Algunos autores sugieren la relación entre el grado de hipoplasia del iris y la hipoplasia de la mácula debida a que las mutaciones en el gen PAX6 interfiere de igual manera en el desarrollo de la retina y del iris (McCulley, Mayer et al. 2005). La hipoplasia macular induce en la mayoría de los casos un nistagmus pendular y una disminución severa de la agudeza visual (Neveu, Jeffery et al. 2009).



# 4

## Hipótesis y Objetivos





## 4.1. Hipótesis.

Existen referencias de la importancia de los diadenosina polifosfatos en la fisiología ocular, fundamentalmente en el polo anterior. Como se ha descrito en la introducción, estas moléculas han sido identificadas en la lágrima de conejo y se ha demostrado su capacidad para estimular la secreción lagrimal cuando son instiladas en el ojo del conejo. Además el Up<sub>4</sub>U, un derivado del Ap<sub>4</sub>A, recientemente ha sido aprobado como fármaco para tratamiento del ojo seco por la agencia del medicamento en Japón, por sus propiedades secretagogas, estimulando la producción acuosa, mucínica y lipídica de la lágrima humana (Pintor, Peral et al. 2002; Tauber, Davitt et al. 2004).

El mecanismo de liberación de los diadenosina polifosfatos en la lágrima de conejo no ha sido del todo aclarado. Se ha hipotetizado con la posibilidad de que se liberaran de las terminales nerviosas con otros neurotransmisores, pero experimentos realizados con conejos denervados indican que no es el mecanismo principal de liberación. En estos estudios se ha sugerido la posibilidad de que la liberación de estas moléculas a la lágrima se deba a un estrés mecánico sobre las células epiteliales de la superficie ocular. Srinivas y colaboradores en el año 2002 describieron la liberación de ATP al inducir un estrés mecánico en células epiteliales corneales de conejo y Tsubota y colaboradores han descrito un aumento en la frecuencia de parpadeo en pacientes con ojo seco respecto a pacientes control (Tsubota, Hata et al. 1996; Srinivas, Mutharasan et al. 2002).

Ante estas evidencias, nuestra primera hipótesis es que, al igual que en la lágrima del conejo, los diadenosina polifosfatos están presentes en la lágrima humana. Además, creemos que la liberación de los diadenosina polifosfatos, al igual que el ATP, se realiza principalmente por una fricción mecánica del parpado sobre la superficie ocular durante la acción del parpadeo y no desde las terminales nerviosas de la superficie ocular.

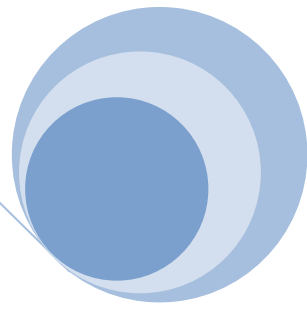
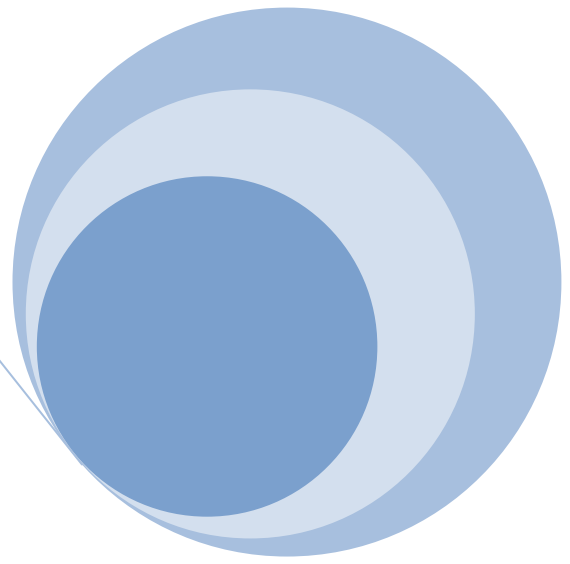
Debido a las propiedades secretoras del  $Ap_4A$  cuando se instila en el ojo, creemos que los diadenosina polifosfatos presentes en la lágrima cumplen una función relevante en la secreción lagrimal, que su presencia está relacionada con el parpadeo y que por tanto, a tenor de lo descrito por Tsubota y colaboradores, debería haber diferencias en sus concentraciones ante la presencia de ojo seco, pudiendo ser marcadores moleculares de la patología.

## **4.2. Objetivos.**

Nuestros objetivos por tanto son:

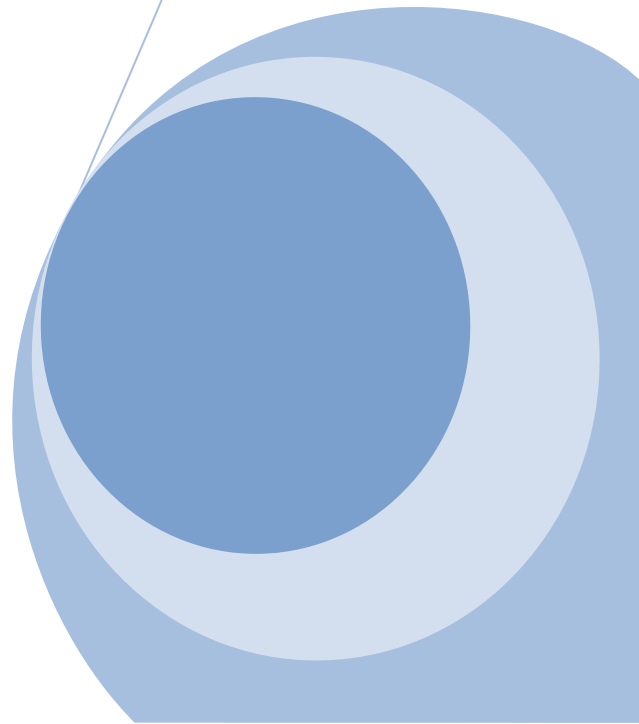
- 1.- Identificar la presencia de diadenosina polifosfatos en la lágrima humana y determinar si existen diferencias en su concentración en función de la edad y el sexo.
  
- 2.- Determinar el mecanismo de liberación de los diadenosina polifosfatos en la lágrima humana.
  
- 3.- Evaluar las concentraciones de diadenosina polifosfatos en diferentes grados de severidad de ojo seco, en patologías de ojo seco y en sujetos operados con cirugía refractiva con el propósito de determinar su potencial uso como marcadores moleculares de la patología.





**5**

**Material  
y  
Métodos**





## 5.1. Diseño del estudio.

El estudio de los diadenosina polifosfatos en la lágrima humana se dividió en tres fases bien diferenciadas (Figura 5.1):

**1ª fase.-** La primera fase del estudio fue verificar la presencia de diadenosina polifosfatos en lágrima humana. Para ello se diseñó un estudio observacional descriptivo.

Una vez que demostramos la presencia de diadenosina polifosfatos en lágrima humana (ver resultados), se amplió el rango de edades de los sujetos participantes en el estudio con el propósito de evaluar si existía relación entre las concentraciones de diadenosina polifosfatos y la edad y el sexo del sujeto.

**2ª fase.-** La segunda fase del estudio Se dividió en dos etapas:

En la primera etapa se evaluó si el mecanismo de liberación de los diadenosina polifosfatos se debía a un estrés mecánico sobre las células epiteliales corneales. Estos estudios se realizaron tanto *in Vitro* como *in Vivo*.

En la segunda etapa se realizó un estudio prospectivo de casos-contróles donde se evaluó la relación de las concentraciones de los diadenosina polifosfatos, en concreto el  $Ap_4A$  y el  $Ap_5A$ , con la sintomatología de ojo seco. Además, se estudió si la liberación de estas moléculas en la lágrima se debía únicamente a un efecto mecánico sobre la superficie ocular o por el contrario se liberaban también por una estimulación mecánica de las terminales nerviosas de la córnea.

**3ª fase.-** A tenor de los resultados obtenidos en la segunda fase, se realizó una última fase para estudiar las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en patologías relacionadas con el ojo seco, Aniridia congénita y Síndrome de Sjögren, en queratoconos y en pacientes operados con cirugía refractiva.

En el caso de los pacientes de cirugía refractiva se estudió la variación de las concentraciones de los diadenosina antes de la cirugía y a lo largo de los 3 meses siguientes a la intervención mediante un estudio prospectivo longitudinal.

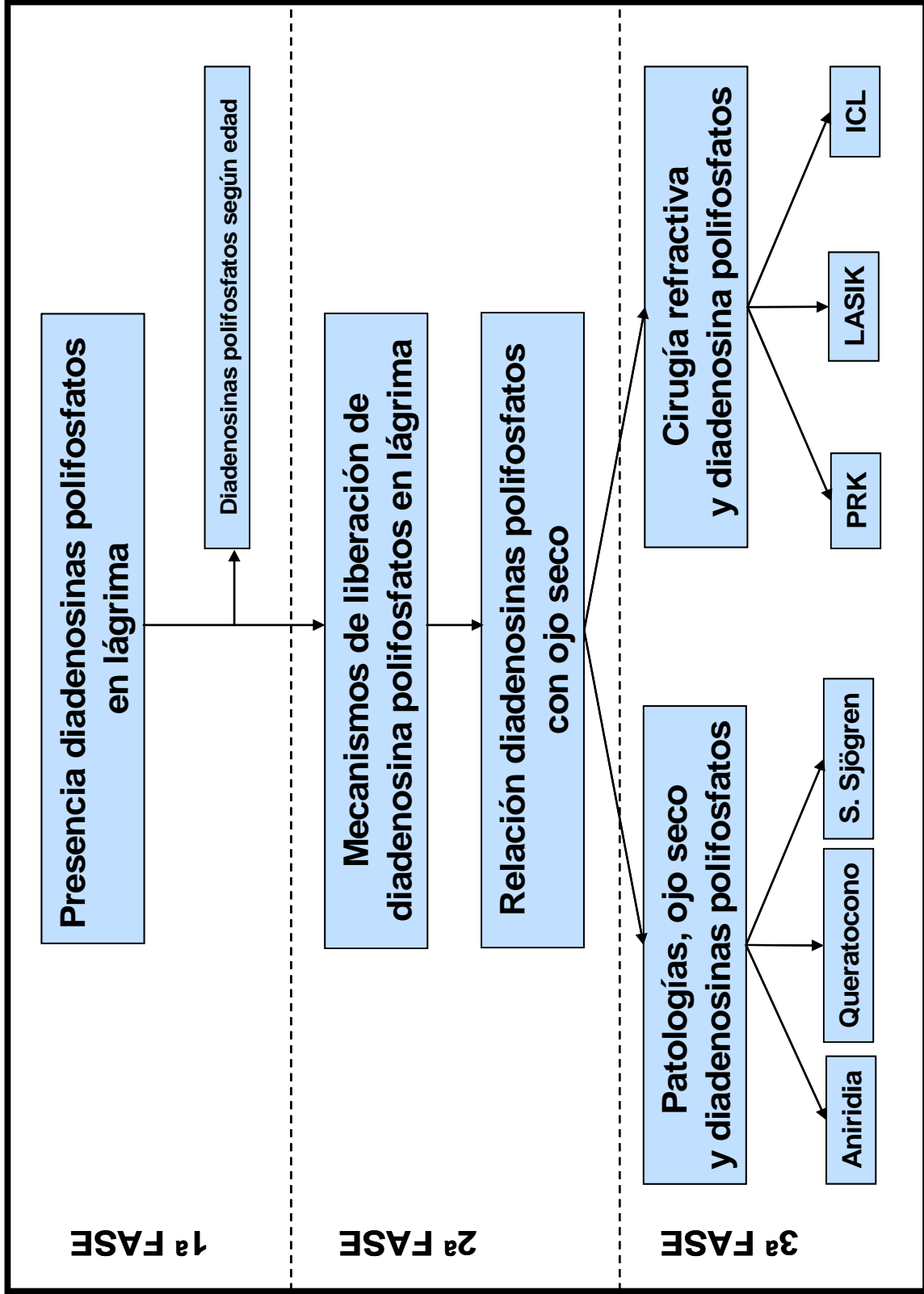


Figura 5.1. Diagrama de flujo de las diferentes fases de la investigación

## 5.2. Grupo muestral.

Todos los sujetos participaron voluntariamente en el estudio y tuvieron la libertad de abandonar el mismo cuando lo desearan sin justificación. Todos ellos firmaron un consentimiento informado, en el cual se les explicaba la naturaleza y el procedimiento de esta investigación, así como los posibles riesgos de su participación. Este estudio siguió los criterios de la declaración de Helsinki (WMA, 2008). Exceptuando los pacientes del estudio de la estimulación mecánica de las terminales nerviosas de la córnea y su efecto sobre la liberación de diadenosina polifosfatos, los pacientes de queratocono y los operados con cirugía refractiva, todos los pacientes fueron evaluados en la Escuela Universitaria de Óptica de la Universidad Complutense de Madrid.

El cálculo muestral en las diferentes fases se realizó con el programa estadístico Granmo 6.0 desarrollado en el año 2000 por Jaume Marrugat (Marugat, Vila et al. 1998) y fueron propuestos por la Dra. Carmen Nieto Zayas del Departamento de Estadística e Investigación Operativa III de la Escuela Universitaria de Estadística de la Universidad Complutense de Madrid.

Para la detección de la presencia de diadenosina polifosfatos en lágrima humana se utilizó el cálculo de medias observadas respecto a una referencia con un resultado de al menos 18 sujetos. Se realizó aceptando un riesgo alfa de 0,05 y una potencia estadística del 80%, para detectar diferencias iguales a la precisión del aparato de medida.

En el caso de evaluación de diadenosina polifosfatos en pacientes sintomáticos de ojo seco, como en los pacientes con queratocono, se realizó el cálculo de tamaño de muestra para dos medias independientes con un resultado de al menos 12 individuos por grupo. También se asumió un riesgo alfa de 0,05, una potencia estadística del 80% y una

relación 1:1 entre grupos. Se tuvo en cuenta la información obtenida en la primera fase para determinar la diferencia mínima a detectar y la desviación estándar común.

Para el cálculo muestral en los estudios con pacientes de Aniridia congénita y Síndrome de Sjögren primario se utilizó la misma técnica descrita anteriormente pero considerando una relación del grupo control con el grupo a estudiar de 2:1. Esto se debe a que ambas patologías son consideradas enfermedades raras y por tanto la población a estudiar es muy limitada. Se precisó un mínimo de 18 pacientes en el grupo control y de 9 en el grupo a estudiar.

Por último, el cálculo muestral en los pacientes de cirugía refractiva se realizó con la herramienta de cálculo del software Granmo 6.0, medias apareadas repetidas en un grupo. Se asumieron las mismas condiciones que en los cálculos anteriores obteniendo un mínimo de 13 sujetos.

Los criterios generales de inclusión para los grupos control fueron:

- Sujetos sanos.
- Edades comprendidas dentro del mismo rango que el grupo a estudiar.
- Entender y firmar el consentimiento informado.

Los criterios generales de exclusión para los grupos control fueron:

- Cualquier enfermedad de la superficie ocular que tuviera relación con el ojo seco.
- Embarazo o lactancia.
- Aplicación de medicación tópica.
- Glaucoma.

### **5.2.1. Identificación de los diadenosin polifosfatos en lágrima humana.**

Para esta primera fase se reclutaron 30 individuos con edades comprendidas entre 18 y 35 años (media  $25,15 \pm 3,34$  años).

En una segunda parte de la identificación de los diadenosina polifosfatos en la lágrima humana, se evaluó si existían cambios en función de la edad. Para ello, se recogieron muestras de lágrima en 93 voluntarios sanos de ambos sexos (47 hombres y 46 mujeres) con edades comprendidas entre los 7 y 90 años (media  $43,23 \pm 1,87$  años).

Como criterios de inclusión se precisaba ser un sujeto adulto, sano y entender y firmar el consentimiento informado. Fueron excluidos del estudio todos aquellos voluntarios que padecieran alguna patología de la superficie ocular o estuvieran utilizando medicación tópica ocular.

### **5.2.2. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes sintomáticos de ojo seco.**

En la segunda fase del estudio participaron 97 sujetos de ambos sexos (27 hombres y 70 mujeres) con edades comprendidas entre 20 y 36 años (media  $27,00 \pm 1,00$  años). Estos pacientes se dividieron en dos grupos en función de los resultados obtenidos con el test de McMonnies. Aquellos que puntuaron en este test por encima de 10 se consideraron pacientes sintomáticos de ojo seco. Los pacientes que tuvieron una puntuación inferior a 10 se incluyeron en el grupo de pacientes asintomáticos (McMonnies y Ho 1987b).

Dentro del grupo de asintomáticos, 8 de ellos participaron en el estudio *in Vivo* para determinar el efecto del estrés mecánico sobre las células epiteliales para la liberación de

diadenosina polifosfatos en la lágrima, y otros 6 pacientes asintomáticos participaron en el estudio de la estimulación mecánica de las terminales nerviosas de la córnea y su efecto sobre la liberación de diadenosina polifosfatos. Estos últimos fueron reclutados y se recogieron las muestras de lágrima en el Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-CSIC de Alicante en colaboración con los doctores Carlos Belmonte y Juana Gallar.

### **5.2.3. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en patologías oculares.**

Para estudiar los niveles de diadenosina polifosfatos en el Síndrome de Sjögren primario (SS-p) se reclutaron 12 pacientes de ambos sexos (4 hombres y 8 mujeres) con edades comprendidas entre 35 y 66 años (media  $52,77 \pm 4,15$  años), pertenecientes a la Asociación Española de Síndrome de Sjögren. Todos los pacientes fueron diagnosticados de SS primario basándose en los criterios de diagnósticos para Síndrome de Sjögren acordados por la American–European Consensus Group (AECG) (Vitali, Bombardieri et al. 2002).

El grupo control se formó con 20 sujetos sanos (9 hombres y 11 mujeres) con edades comprendidas entre 34 y 63 años (media  $41,72 \pm 1,68$  años), los cuales no presentaban ningún síntoma ni signo de ojo seco.

En el caso del estudio de los diadenosina polifosfatos en la Aniridia congénita, participaron voluntariamente 15 pacientes de esta patología, 5 mujeres y 10 hombres, con edades comprendidas entre los 8 y 52 años con una media de  $25,47 \pm 15,56$  años. Todos los participantes pertenecían a la Asociación Española de Aniridia Congénita.

40 sujetos sanos (24 hombres y 16 mujeres) con edades comprendidas entre 9 y 63 años (media  $29,02 \pm 1,30$  años), los cuales no presentaban ningún síntoma ni signo de ojo seco formaron parte del grupo control.

Los pacientes de queratocono fueron reclutados en el Laboratorio de Investigaçã em Optometria Clínica e Experimental del Centro de Física de la Universidade do Minho. Participaron en el estudio 16 pacientes (13 hombres y 5 mujeres) con edades comprendidas entre 20 y los 59 años (media  $29,75 \pm 9,41$  años), todos ellos diagnosticados de queratocono en diferentes fases de severidad.

14 sujetos sanos (8 hombres y 6 mujeres) con edades comprendidas entre 19 y 36 años (media  $24,29 \pm 1,12$  años), los cuales no presentaban ningún síntoma ni signo de queratocono formaron parte del grupo control.

#### **5.2.4. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes de cirugía refractiva.**

En esta fase de la investigación, los pacientes fueron reclutados en el Instituto Balear de Oftalmología (IBO) en Palma de Mallorca bajo la supervisión *in situ* de la Dra. Isabel Cacho Bobillo.

Participaron 46 pacientes operados LASIK, 22 hombres y 24 mujeres, con edades comprendidas entre 20 y 61 años con una media de  $34,53 \pm 9,24$  años. El grupo de pacientes operados con PRK lo formaron 15 pacientes, 8 hombres y 7 mujeres) con edades comprendidas entre 24 y 63 años (media  $34,64 \pm 9,85$  años). Por último, participaron 15 pacientes, 7 hombres y 8 mujeres, operados con lente refractiva

intraocular (ICL), los cuales tenían edades comprendidas entre 19 y 49 años con una media de  $32,03 \pm 8,19$  años.

Se excluyeron del estudio todos aquellos pacientes que hubieran sido diagnosticados de ojo seco, así como todos aquellos que estuvieran utilizando medicación tópica ocular anteriormente a la cirugía refractiva.

El resumen de las características demográficas de los pacientes que participaron del estudio se muestra en la tabla 5.1.

	Grupo muestral	N	Hombres	Mujeres	Edad (media $\pm$ SEM)	Edad (rango)
1ª FASE	Identificación diadenosina polifosfatos	30	---	---	25,15 $\pm$ 3,34	18-35
	Diadenosina polifosfatos según la edad	93	47	46	43,23 $\pm$ 1,87	7-90
2ª FASE	Diadenosina polifosfatos en pacientes sintomáticos de ojo seco,	97	27	70	27,00 $\pm$ 1,00	20-36
3ª FASE	Síndrome de Sjögren	12	4	8	52,77 $\pm$ 4,15	35-66
	Grupo control Síndrome de Sjögren	20	9	11	41,72 $\pm$ 1,68	34-63
	Aniridia Congénita	15	10	5	25,25 $\pm$ 3,35	8-52
	Grupo control Aniridia congénita	40	24	16	29,02 $\pm$ 1,30	7-49
	Queratocono	16	11	5	29,75 $\pm$ 2,35	20-59
	Grupo control queratocono	14	8	6	24,29 $\pm$ 1,12	19-36
	LASIK	46	22	24	34,53 $\pm$ 1,36	20-61
	PRK	15	8	7	34,64 $\pm$ 2,54	24-63
	ICL	15	7	8	32,03 $\pm$ 2,11	19-49
	TOTAL		413	177	206	33,28 $\pm$ 0,86

Tabla 5.1. Características demográficas de los pacientes del estudio.

### 5.3. Material.

En las siguientes tablas se enumera todo el material que se ha utilizado para recoger las muestras y realizar las pruebas diagnósticas, así como el utilizado en el laboratorio para el análisis de los diadenosina polifosfatos en lágrima.

#### 5.3.1. Material e instrumentos de las pruebas diagnósticas.

<b>Reactivos generales y material</b>	<b>Casa comercial</b>
Fluoresceína sódica	Chauvin
Solución salina	Braun
Colircusí anestésico doble (Oxibuprocaina/Tetracaína)	Alcon
Tiras de Schirmer	HUB pharmaceuticals

Tabla 5.2. Material utilizado para realizar las pruebas diagnósticas.

<b>Instrumentos</b>	<b>Casa comercial</b>
Lámpara de hendidura SL-8Z	Topcon
Filtro amarillo Wratten 12	Kodak
Estesiómetro de gas de Belmonte	

Tabla 5.3. Instrumentos utilizados durante las pruebas diagnósticas.

### 5.3.2. Material e instrumentos de laboratorio.

Reactivos generales Y material	Casa comercial
Acetonitrilo	Scharlau
Metanol	Scharlau
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MERCK
TBA	Sigma-Aldrich
KOH	Panreac
KCl	Panreac
HCl	Panreac
Ap <sub>4</sub> A	Sigma-Aldrich
Ap <sub>5</sub> A	Sigma-Aldrich
Ap <sub>3</sub> A	Sigma-Aldrich
ATP	Sigma-Aldrich
Fosfodiesterasa ( <i>Crotalus Adamanteus</i> )	Sigma-Aldrich
Fosfodiesterasa ( <i>Crotalus Durissus</i> )	Sigma-Aldrich
Microtubos 1ml Eppendorf	Eppendorf

Tabla 5.4. Reactivos y material utilizado para el análisis de las muestras de lágrima en el laboratorio.

<b>Instrumentos</b>	<b>Casa comercial</b>
HPLC	Waters
Columna Novapack Sunfire C18 5µl	Waters
Sep-Pack Acell QMA	Waters
Centrifuga de sobremesa Picofuge.	Hareus
PHmetro	Crison
Bascula precisión	Mettler
Pipetas	Eppendorf
Congelador -20°C	Bosch
Vortex	Heidolph
Baño termostatzado	Labnet
Sonicador ultrasónico	Selecta

**Tabla 5.5. Instrumentos de laboratorio utilizados para el análisis de las muestras de lágrima.**

## **5.4. Pruebas diagnósticas.**

A todos los pacientes que participaron en el estudio se les realizaron al menos el test de Schirmer, con el propósito de recoger lágrima para su análisis en el laboratorio, y un cuestionario de sintomatología de ojo seco. Debido a las características singulares del experimento realizado con pacientes de cirugía refractiva, a estos pacientes también se les midió el tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) y las tinciones corneales.

### **5.4.1. Test de Schirmer.**

El test de Schirmer es la prueba más utilizada para medir el volumen lagrimal. El test de Schirmer I, es la variante que se realiza sin anestesia y el test de Schirmer basal es la variante que se utiliza un anestésico para evitar la lacrimación refleja y cuantificar solo la lacrimación basal (van Bijsterveld 1969).

A todos los pacientes se les ha realizado el test de Schirmer I (sin anestesia). En el caso del estudio para la identificación de los diadenosina polifosfatos y en el estudio *In Vivo* de la liberación de los diadenosina polifosfatos se realizó también el test de Schirmer basal con el propósito de evaluar el mecanismo de liberación de los diadenosina polifosfatos en la lágrima.

En una habitación con la luz tenue, se coloca una tira de Schirmer (papel Wathman n.41, Tear Flo, HUB pharmaceuticals, USA) al paciente en el canto medio externo del párpado inferior, con cuidado para dañar lo menos posible la conjuntiva y minimizar el lagrimeo reflejo. Se pide al paciente que mantenga los ojos cerrados sin hacer presión con los párpados. A los 5 minutos se retira la tira, y con una regla milimetrada se mide la porción de la tira que se ha humectado anotando los milímetros recogidos. Estas tiras se

introducirán en unos eppendorf con 500 µl de agua ultrapura para su posterior análisis en el laboratorio. A continuación se congelaron las muestras hasta su análisis con el HPLC.

En el caso del test de Schirmer basal se repite el proceso anterior 2 minutos después de la instilación de 10 µl un anestésico (oxibuprocaina/tetracaina, 4 mg/1 mg, Alcon Cusí, Spain).

#### **5.4.2. Test de sintomatología de ojo seco.**

En aquellos estudios en los que uno de los objetivos era relacionar las concentraciones de diadenosina polifosfatos con el grado de sequedad, en pacientes que no estaban diagnosticados de ojo seco, se utilizó el test de McMonnies. En concreto se utilizó en la segunda fase y con los pacientes de Aniridia congénita y queratocono de la tercera fase.

El test de McMonnies consiste en 12 preguntas sobre síntomas típicos del ojo seco además de cuestiones relacionadas con patologías, medicamentos y hábitos de vida que pueden aumentar el riesgo de padecer ojo seco. Posee una escala de puntuación siendo la puntuación máxima de 35 puntos. Puntuaciones por entre 10 y 20 se considera ojo seco marginal y puntuaciones por encima de 20 es indicativo de ojo seco (McMonnies y Ho 1987b).

En los pacientes con Síndrome de Sjögren y en el estudio con pacientes de cirugía refractiva se utilizó el test Dry Eye Questionnaire (DEQ) elaborado por Caroline Begley y colaboradores (Begley, Caffery et al. 2002a) debido a que el objetivo en estos pacientes no era cuantificar el grado de sequedad sino caracterizar los síntomas de ojo seco que padecen e intentar relacionar algún síntoma concreto con las concentraciones de diadenosina polifosfatos.

EL DEQ fue diseñado para evaluar la prevalencia, frecuencia e intensidad de la molestia de los síntomas más habituales en el ojo seco (Figura 5.2). Se realizan preguntas sobre discomfort, sequedad, sensación de arena, ardor, ojos cansados, visión borrosa, picor, sensación de cuerpo extraño, ojos irritados y sensibilidad a la luz. El cuestionario también incluye preguntas sobre el uso de ordenadores, alergias, medicación y patologías relacionadas con el ojo seco así como de las condiciones ambientales que causan síntomas de ojo seco.

12. Preguntas relativas a la <b>SENSACIÓN DE PICOR</b> en los ojos:	13. Preguntas relativas a la <b>SENSACIÓN DE CUERPO EXTRAÑO</b> en los ojos:
<p>a. En un día normal, ¿ con qué frecuencia sientes picor en los ojos?</p> <p>0 Nunca</p> <p>1 Casi nunca</p> <p>2 A veces</p> <p>3 Con frecuencia</p> <p>4 Constantemente</p>	<p>a. En un día normal, ¿ con qué frecuencia parece que tienes un cuerpo extraño en el ojo?</p> <p>0 Nunca</p> <p>1 Casi nunca</p> <p>2 A veces</p> <p>3 Con frecuencia</p> <p>4 Constantemente</p>
<p>Cuando notas picor en los ojos, <b>¿cómo es de intensa esa sensación de picor...</b></p> <p>b. ¿durante las dos primeras horas después de levantarse por la mañana?</p>	<p>Cuando notas esa sensación de cuerpo extraño, <b>¿cómo es de intensa esa sensación...</b></p> <p>b. ¿durante las dos primeras horas después de levantarse por la mañana?</p>
<p>Nada Poco intensa Muy intensa</p> <p>0 1 2 3 4 5</p>	<p>Nada Poco intensa Muy intensa</p> <p>0 1 2 3 4 5</p>
<p>c. ¿al final del día, en las dos horas anteriores antes de acostarnos?</p> <p>Nada Poco intensa Muy intensa</p> <p>0 1 2 3 4 5</p>	<p>c. ¿al final del día, en las dos horas anteriores antes de acostarnos?</p> <p>Nada Poco intensa Muy intensa</p> <p>0 1 2 3 4 5</p>
<p>d. Cuando te pican los ojos, ¿en qué medida te resulta molesto?</p> <p>Nada Poco molesto Muy molesto</p> <p>0 1 2 3 4 5</p>	<p>d. Cuando sientes un cuerpo extraño en el ojo, ¿en qué medida te resulta molesto?</p> <p>Nada Poco molesto Muy molesto</p> <p>0 1 2 3 4 5</p>

Figura 5.2. Ejemplo de pregunta en el cuestionario Dry Eye Questionnaire.

### **5.4.3. TBUT y tinciones corneales.**

Estas pruebas se realizaron a los pacientes con queratocono y a los operados de cirugía refractiva.

Para evaluar el tiempo de ruptura lagrimal y las tinciones corneales se aplicó fluoresceína sódica al 2% (Fluorets, Chauvin, Francia). Para maximizar la repetibilidad de la prueba, se preparó la fluoresceína sódica diluida en solución salina (NaCl 0,9%, B/Braun, Barcelona) al 10%. Se aplicó con una micropipeta 5 µl de ésta disolución en el saco conjuntival inferior y 20 segundos más tarde y después de indicar al paciente que parpadeara dos veces, se cuantificó el TBUT (Johnson y Murphy 2005).

La zona de rotura en la película lagrimal se observó con 10x en la lámpara de hendidura y con los filtros azul cobalto y el filtro amarillo (Kodak 12 de Wratten) (Nichols, Mitchell et al. 2004). El tiempo de rotura se midió 3 veces, anotando la media.

Para observar la tinción en córnea se utilizó el mismo procedimiento de instilación de fluoresceína sódica. Se dividió la córnea en 5 zonas (central, superior, inferior, nasal y temporal) y cada zona fue graduada de 0 a 4 en pasos de 0,5 siguiendo los criterios de la escala de Efron. Se anotó la suma de las puntuaciones obtenidas en cada zona (Barr, Schechtman et al. 1999).

### **5.4.4. Estesimetría.**

El estesiómetro de gas de Belmonte se compone de dos bombonas, una con aire y otra con un 98,5% de CO<sub>2</sub> conectadas cada una a un regulador de presión y ambas a una válvula electrónica de control de flujo, la cual controla de manera independiente el flujo del

aire y de CO<sub>2</sub>. Esto genera una mezcla gaseosa en la que podemos controlar la proporción tanto de aire como de CO<sub>2</sub>. El flujo de gas llega al ojo a través de una sonda montada en la lámpara de hendidura. En el interior de la sonda lleva instalado un sistema para controlar la temperatura del gas que se aplica al ojo. Con este instrumento se puede evaluar la sensibilidad corneal ante un estímulo mecánico, ante un estímulo químico y ante cambios de temperatura (Belmonte, Acosta et al. 1999).

Se utilizó el estesiómetro de gas de Belmonte para efectuar el estímulo mecánico sobre las terminales nerviosas del epitelio corneal. Justo antes de realizar el test de Schirmer para medir el volumen lagrimal y recoger la muestra de lágrima para su posterior análisis en el laboratorio, se estimuló mecánicamente la córnea con tres pulsos de gas, de tres segundos de duración cada uno en el centro de la córnea. Se aplicaron dos tipos de flujos de gas diferentes, uno moderado a 170 ml/min. y otro más severo, a 260 ml/min. Los sujetos debían evitar parpadear durante la aplicación del flujo de gas.

## **5.5. Análisis de lágrima.**

### **5.5.1. Procesado de las muestras de lágrima.**

El análisis de las muestras de lágrima recogidas con las tiras de Schirmer, según el procedimiento descrito en la sección 5.4.1., y guardadas en unos microtubos de Eppendorf con 500 µl de agua ultrapura se realizó con Cromatografía de Líquida de Alta Presión (HPLC). Para ello, primero se descongelaron las muestras y se utilizaron uno de los dos protocolos que a continuación se describen para preparar las muestras para su análisis.

Las muestras se agitaron durante 5 minutos con el vortex. Con mucho cuidado, se retiraron las tiras de Schirmer de los eppendorf y el líquido restante se calentó durante 20 minutos a 100 °C con el objetivo de precipitar las proteínas. Para amontonar las proteínas, los eppendorf fueron centrifugados durante 30 minutos a 4.000 rpm. Pintor y col. demostraron que los diadenosina polifosfatos apenas se degradan (aprox. un 4%) después de este proceso (Pintor, Torres et al. 1991b).

El otro protocolo realizado para preparar las muestras para el análisis en HPLC fue propuesto por el Dr. Lazarowsky. Después de la descongelación, las muestras se agitaron 5 minutos en el vortex. Con cuidado, se retiraron las tiras de Schirmer de los eppendorf y el líquido restante se calentó en baño seco durante 2 minutos a 98 °C. A continuación, se colocaron los eppendorf en hielo durante 5 minutos. Por último, se centrifugaron los eppendorf durante 5 minutos a 13.000 rpm.

Del sobrenadante obtenido por los procesos anteriormente descritos se cromatografiaron 250 µl a través de la columna SEP-PAK Accell QMA, que fue previamente equilibrada

con 3 ml de agua ultrapura. Los nucleótidos fueron extraídos con 1 ml de KCl 0,2 M, HCl 0,1 M. La muestra obtenida se neutralizó con KOH. En el HPLC se inyectaron 100  $\mu$ l del eluyente obtenido para analizar las concentraciones de los diadenosina polifosfatos (Rotllan Pascual, Ramos Carrillo et al. 1991).

### 5.5.2. Cuantificación de los diadenosin polifosfatos en HPLC.

El HPLC es un sistema cromatográfico que consiste en una bomba Waters 1515 isocratic HPLC, con un detector de absorbancia 2487 dual y un inyector autosampler 717plus de Waters con el que podemos inyectar 48 muestras automáticamente. Todo el sistema se controla desde un ordenador con el software Breeze de Waters. La columna empleada para la detección es Novapack C18 Sunfire (15 cm de largo y 0,4 cm de diámetro). (Figura 5.3.)

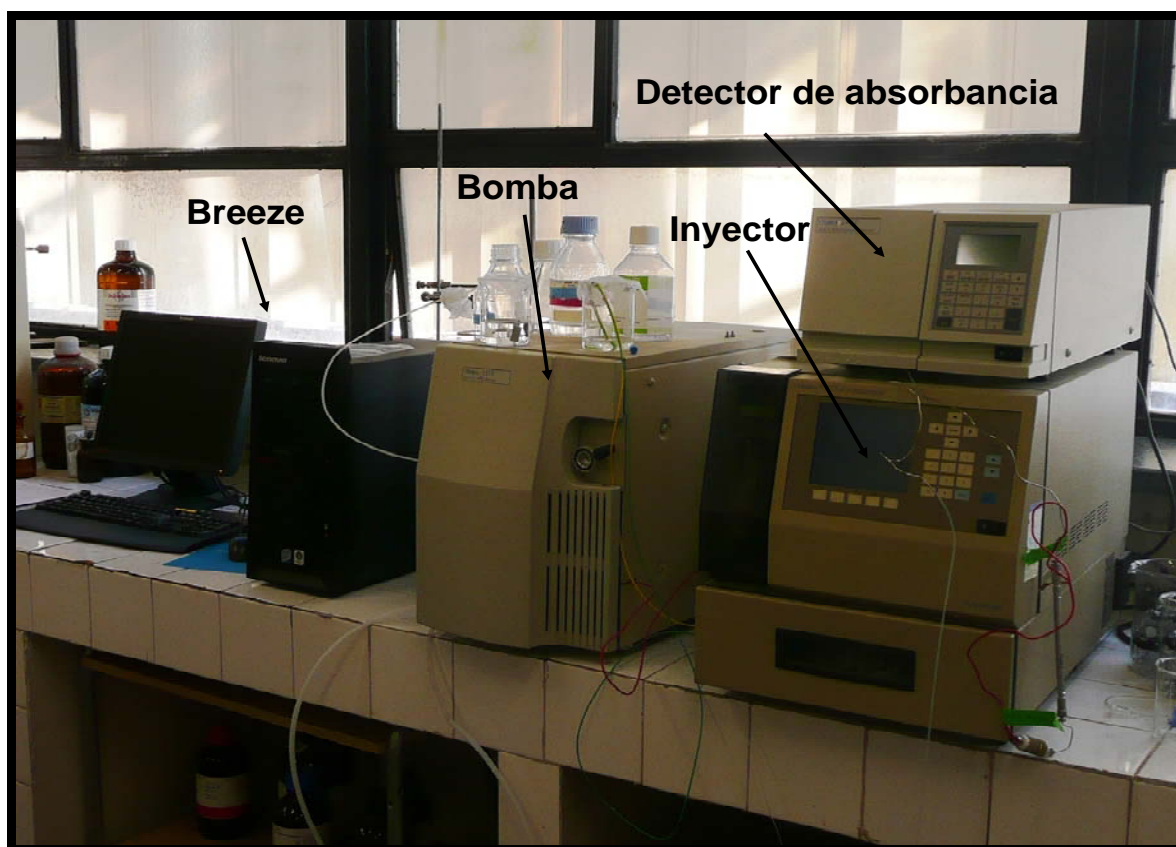


Figura 5.3. HPLC utilizado para el análisis de diadenosina polifosfatos.

Para cuantificar diadenosina polifosfatos en el HPLC, el sistema se equilibra durante la noche con una fase móvil. En la primera fase del estudio se utilizó una fase móvil sin par iónico compuesta por 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y un 3% de metanol. El resto de muestras se analizaron con una segunda fase móvil con par iónico compuesta por 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM tetrabutil amonio (TBA), 17 % acetonitrilo, pH = 7,5. La diferencia entre una fase y otra es el orden en el que salen los diadenosina polifosfatos en el cromatograma. En la fase móvil sin par iónico salen antes los diadenosina con la cadena de fosfatos más larga, en cambio en la fase con par iónico es al contrario, los diadenosina con la cadena de fosfatos más larga tardan más tiempo en aparecer en el cromatograma.

Para la fase móvil con par iónico se preparaban 2 litros para cada experimento, siguiendo el siguiente protocolo:

- En un vaso de precipitados se pesan 2,72 g. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,358 g de TBA.
- Añadimos 1500 ml de agua ultrapura y agitamos hasta que se disuelvan el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y el TBA.
- A continuación añadimos 340 ml de Acetonitrilo y ajustamos el pH de la disolución a 7,5 con KOH.
- Una vez ajustado el pH, añadimos agua ultrapura hasta completar los 2 litros de la preparación.
- Filtramos la disolución para eliminar impurezas y por último la sometemos a durante 15 minutos ultrasonidos para eliminar burbujas que afecte al correcto funcionamiento del HPLC.

La detección de los diadenosina polifosfatos se realiza a una longitud de onda de 260 nm. Los picos que se obtienen se transforman en concentraciones gracias a la comparación con controles estándar inyectados en el HPLC de concentración conocida (10  $\mu\text{l}$  de una

solución 10  $\mu$ M: 100 pmol) y teniendo en cuenta el volumen lagrimal obtenido con la tira de Schirmer.

### 5.5.3. Métodos de verificación de los diadenosin polifosfatos en HPLC.

Para verificar que los picos observados con el HPLC corresponden con los diadenosina polifosfatos estudiados, utilizamos dos métodos de confirmación:

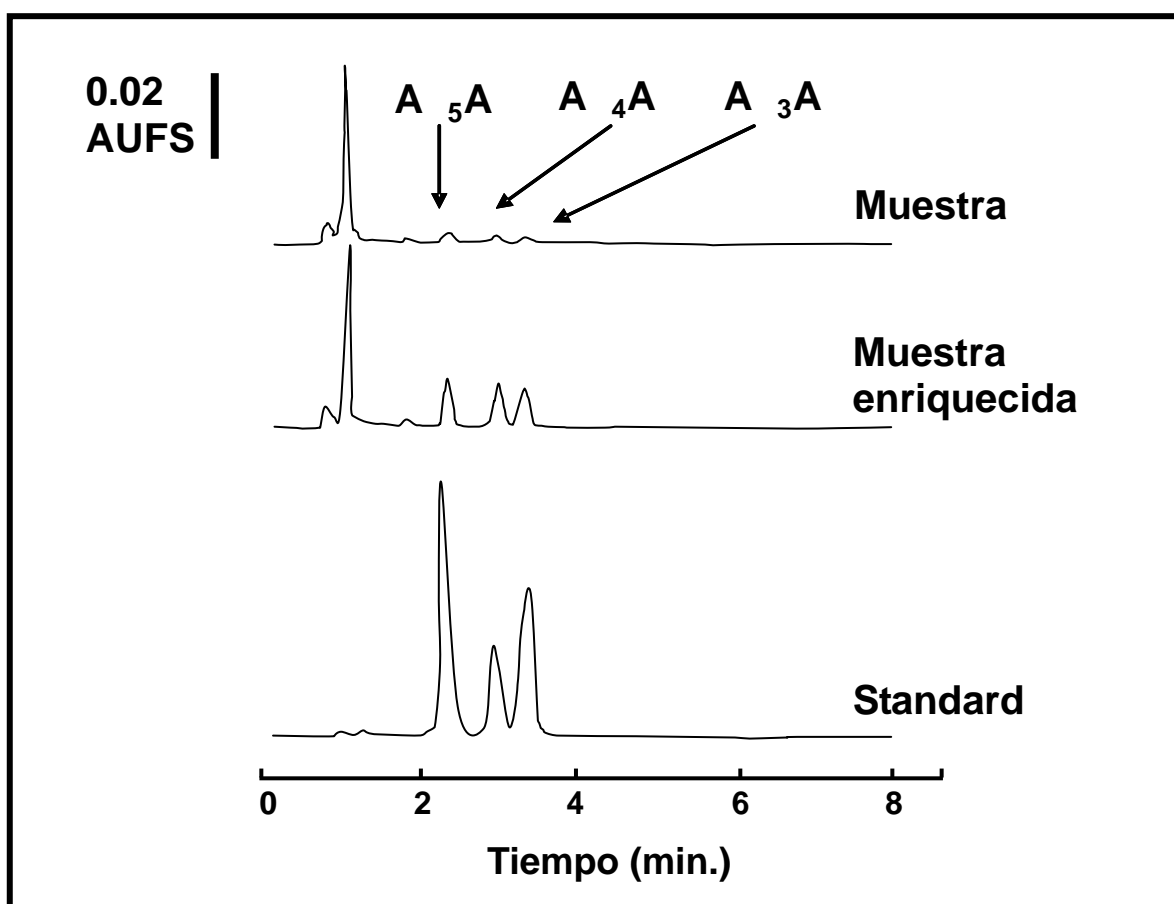


Figura 5.4. En el primer cromatograma observamos un ejemplo los picos obtenidos de la muestra a estudiar. En el segundo, se observan los mismos picos enriquecidos con diadenosina polifosfatos y en el último cromatograma se observa el cromatograma obtenido al inyectar controles estándar.

Las muestras recogidas con las tiras de Schirmer, una vez realizado todo el procesado para su inyección en el HPLC, fueron enriquecidas con estándares comerciales de los diadenosina polifosfatos supuestamente encontrados en la lágrima humana. De esta

manera si los picos encontrados son realmente diadenosina polifosfatos seguirán apareciendo pero con mayor altura de pico (Figura 5.4). Por el contrario si no fueran diadenosina polifosfatos, aparecerían otros picos correspondientes a los estándares comerciales.

Para confirmar por completo que los picos encontrados son diadenosina polifosfatos, las muestras de lágrima recogidas son sometidas a un tratamiento con fosfodiesterasa. Cada dinucleótido encontrado en lágrima humana fue separado del resto de la muestra y tratado con fosfodiesterasa procedente de *Crotalus durissus* a una concentración de 1,0 U/mL e incubado a temperatura ambiente durante 30 minutos. La acción de esta enzima rompe el diadenosin polifosfato en adenosina monofosfato (AMP) y otro nucleótido de adenina, dependiendo de la longitud de la cadena de fosfatos del diadenosin original. Debido a que la fosfodiesterasa procedente de *Crotalus durissus* se dejó de comercializar, este método de verificación en los experimentos de la fase 3 se realizó con fosfodiesterasa procedente de *Crotalus adamanteus*.

Cuando el  $Ap_3A$  es sometido a este tratamiento se produce AMP y adenosinas difosfato (ADP). El  $Ap_4A$  produce AMP y adenosina trifosfato (ATP) y el tratamiento sobre  $Ap_5A$  da lugar a AMP y adenosina tetrafosfato ( $Ap_4$ ). Comparando estos picos con estándares comerciales de las diferentes adenosinas polifosfatos podemos confirmar que los picos originales corresponden a los diadenosina polifosfatos estudiados (Figura 5.5).

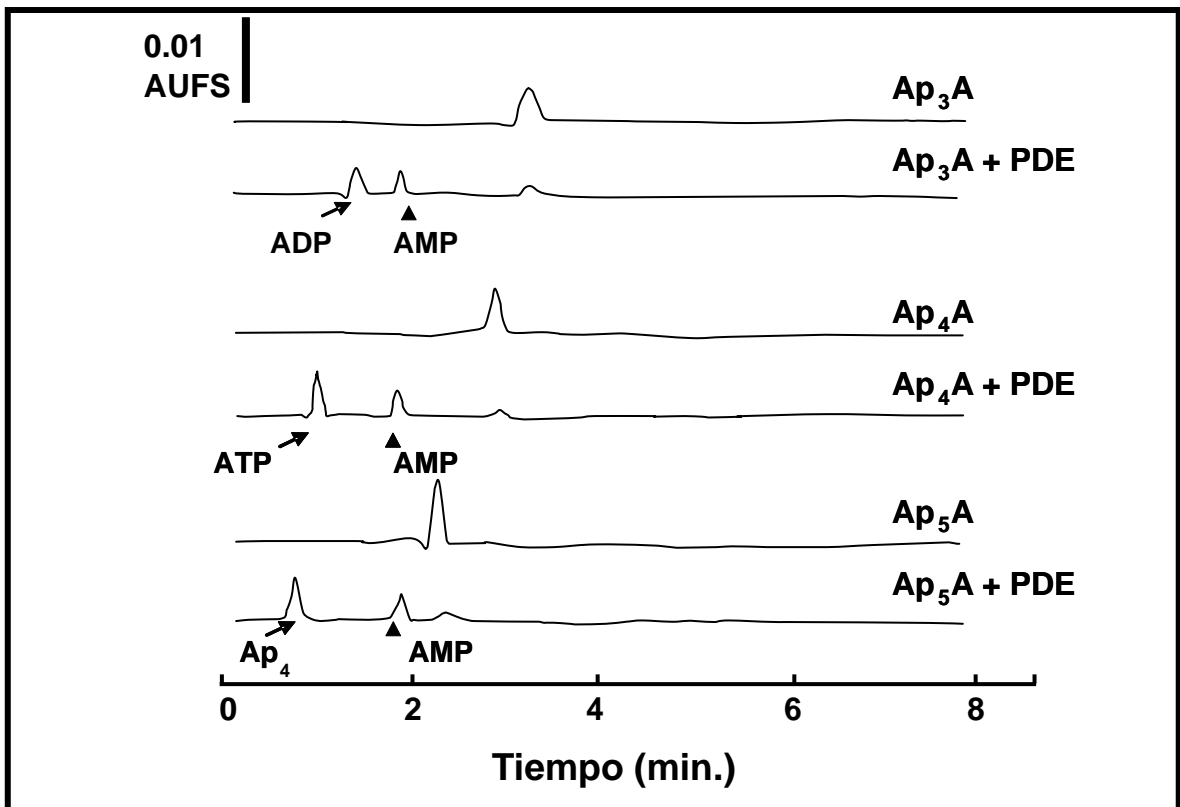


Figura 5.5. Picos obtenidos con HPLC al tratar Ap<sub>3</sub>A, Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A con fosfodiesterasa (PDE).

## 5.6. Procedimiento.

Las pruebas realizadas a todos los voluntarios en este estudio se realizaron en una sola visita, excepto a los pacientes operados con cirugía refractiva que se realizaron medidas en 5 ocasiones.

Los pacientes que participaron en la primera fase del estudio firmaron el consentimiento informado y a continuación se les realizó el test de Schirmer sin anestésico. Pasados 15 minutos, se les aplicó el anestésico tópico y se volvió a medir el volumen lagrimal con la tira de Schirmer. Ambas tiras de Schirmer se introdujeron en los eppendorf con agua ultrapura y se congelaron para su posterior análisis en el HPLC. Al grupo de pacientes que participaron en el estudio para evaluar posibles variaciones de los diadenosina polifosfatos según la edad se les realizó únicamente el test de Schirmer sin anestésico.

Los pacientes de la segunda fase, firmaron el consentimiento y rellenaron el test de McMonnies para ubicarlos en el grupo de sintomáticos o de asintomáticos. A todos se les realizó el test de Schirmer sin anestésico y se guardaron las muestras de lágrima.

Los voluntarios que participaron en el estudio in Vivo de liberación de diadenosina polifosfatos, se les realizó el test de Schirmer I y el basal en 3 ocasiones más, con 12, 30 y 60 parpadeos por minuto durante la prueba, con una diferencia de 15 minutos entre cada medida.

En el caso de los pacientes que participaron en el estudio de la estimulación mecánica de las terminales nerviosas de la córnea y su efecto sobre la liberación de diadenosina polifosfatos, se tomaron muestras de lágrima con el test de Schirmer en dos ocasiones,

una después de estimular con un pulso de aire de 170 ml/min, y después de un impulso de aire de 260 ml/min.

Los pacientes de Aniridia congénita, siguiendo el mismo protocolo que en grupos anteriores, firmaron un consentimiento informado y rellenaron el test de McMonnies. A continuación se llevó a cabo el test de Schirmer.

Los pacientes de Síndrome de Sjögren realizaron la visita para el estudio a primera hora de la mañana antes de la utilización de medicación tópica que pudiera afectar a las concentraciones de diadenosina polifosfatos. En este caso el test de sintomatología que tuvieron que rellenar fue el DEQ. A continuación se realizó el test de Schirmer y se congelaron las muestras para su análisis en el HPLC.

Los pacientes de Queratocono siguieron el mismo protocolo que los pacientes de Aniridia congénita, leyeron y firmaron el consentimiento informado, rellenaron el test de McMonnies y se les hizo el test de Schirmer sin anestésico. Por último se tiñó la superficie corneal con fluoresceína y se midió el TBUT y se evaluaron las tinciones corneales.

Para evaluar las variaciones de las concentraciones de diadenosina polifosfatos en la lágrima de los operados con cirugía refractiva se realizaron las pruebas en 5 visitas, una antes de la cirugía, al día siguiente de la operación, a las 2 semanas, al mes y a los tres meses.

En todas las visitas se siguió el mismo protocolo de actuación, excepto que solo en la primera visita (antes de la cirugía) los pacientes debían leer y firmar un consentimiento informado.

Primero rellenaban el test de sintomatología DEQ y a continuación se les realizaba el test de Schirmer sin anestésico y por último se medía el TBUT y las tinciones corneales.

En la tabla 5.6 se esquematiza las pruebas que se les realizó a cada uno de los grupos participantes.

### **5.6.1. Procedimientos quirúrgicos.**

Todas las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas por el mismo cirujano, el Doctor Juan Sánchez Navés en el Instituto Balear de Oftalmología (IBO). El láser excimer utilizado fue el Technolas 217 versión V 312.383 (BAUSCH&LOMB, Irvine, CA, USA). Los parámetros utilizados en el láser fueron:

- Longitud de onda de 193 nm.
- Exposición radiante por pulso de 160 mJ/cm<sup>2</sup>.
- Ratio de repetición del pulso de 50 Hz.
- Ablación media profundidad/pulso de 0,25 µm.
- Diámetro de zona de ablación entre 6,5 y 7,0 mm con una zona de transición de 0,5 mm.

En todos los casos la refracción manifiesta preoperativa fue la seleccionada para corregir.

#### **5.6.1.1. Procedimiento quirúrgico LASIK.**

En los pacientes operados con el procedimiento LASIK, se utilizó el microqueratomo XP automático de B&L (BAUSCH&LOMB, Irvine, CA, USA) para realizar el flap con bisagra en la zona superior con un espesor entre 120 y 140 µm. A todos los pacientes se les

prescribió un antibiótico con corticosteroide en gotas (Tobradex, Alcon, TX, USA) cada 6 horas durante los 5 días posteriores a la intervención.

Una lágrima artificial (Oculotec, Novartis) fue prescrita durante 6 semanas con un uso mínimo de 4 veces al día, pudiendo aumentar la administración en el caso de un incremento en la sensación de sequedad. En los casos en los que la sintomatología o los signos de ojo seco se agravaran, se les cambiaban la lágrima artificial por otra con ácido hialurónico (Hyaback, Thea).

#### **5.6.1.2. Procedimiento quirúrgico PRK.**

Esta técnica quirúrgica solo se aplicó a pacientes que tuvieran como máximo -3.00 dioptrías. Para debilitar el epitelio corneal se utilizó únicamente solución salina balanceada (BSS), sin ningún tipo de alcohol ni mitomicina C, y a continuación se utilizó una cuchilla para eliminarlo.

Después de la intervención se prescribió Tobradex en gotas durante un mes, con una dosis de 4 veces al día durante la primera semana, reduciendo 1 vez al día cada semana para terminar con 1 vez al día la última semana de tratamiento. La lágrima artificial fue prescrita siguiendo los mismos criterios que en los pacientes operados con LASIK. Además debieron llevar una lente de contacto terapéutica durante los 5 días posteriores a la cirugía.

### **5.6.1.3. Procedimiento quirúrgico ICL.**

La lente intraocular utilizada ha sido el modelo STAAR (Surgical Monrovia, CA, USA). Se implantó en los pacientes en los que cualquiera de las dos técnicas arriba descritas no estaban indicadas como miopías o hipermetropías elevadas.

A los pacientes se les realizó una incisión de 3 mm en el meridiano corneal más curvo para introducir la lente y dos incisiones de 1.5 mm para ayudar a la colocación de la lente a 180° de la incisión principal. Después de la intervención quirúrgica, se prescribió a los pacientes Tobradex y Oftalar cada 6 horas durante tres semanas.

Grupo muestral	Nº visitas	Test de McMonnies	DEQ	Test de Schirmer	Test de Schirmer basal	TBUT	Tinciones corneales
<b>1ª FASE</b>	Identificación diadenosinas polifosfatos	1		X	X		
	Diadenosinas polifosfatos según la edad	1		X			
<b>2ª FASE</b>	Diadenosinas polifosfatos en pacientes sintomáticos de ojo seco.	1	X	X			
	Estudio <i>in Vivo</i> de liberación de diadenosinas polifosfatos	1		X (4 veces)*	X (4 veces)*		
<b>3ª FASE</b>	Estudio de la estimulación mecánica de las terminales nerviosas de la cornea	1		X (2 veces)**			
	Síndrome de Sjögren	1	X	X			
<b>3ª FASE</b>	Aniridia Congénita	1		X			
	Queratocono	1		X		X	X
	LASIK	5		X		X	X
	PRK	5		X		X	X
	ICL	5		X		X	X

5.6. Esquema de pruebas y visitas realizadas por los diferentes grupos del estudio. \* sin parpadear, 12, 30 y 60 parpadeos por minuto. \*\* Con un estímulo de 170 ml/min. y otro con 260 ml/min.

## 5.7. Estudio in Vitro de la liberación de diadenosina polifosfatos en lágrima.

### 5.7.1. Material.

Material	Casa comercial
HPLC	Waters
Columna Novapack Sunfire C18 5µl	Waters
Sep-Pack Acell QMA	Waters
Centrifuga de sobremesa Picofuge.	Hareus
PHmetro	Crison
Estufa Heracell	Mettler
Pipetas	Eppendorf
Micro tubos Eppendorf	Eppendorf
Campana flujo laminal	Hareus
Placas 12 pocillos	Cultek
Defined Keratinocyte-SFM	GIBCO

Tabla 5.7. Reactivos, material e instrumentación utilizados para el estudio de la liberación de diadenosina polifosfatos In Vitro

### 5.7.2. Cultivo celular.

Para las medidas de liberación de diadenosina polifosfatos In Vitro se sembraron células de epitelio corneal humano en una placa de 12 pocillos con 18 ml de medio Defined Keratinocyte-SFM (GIBCO). Se mantuvieron en dicho medio durante una semana en la estufa de cultivos a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad hasta confluencia

Para conseguir un epitelio estratificado de 4-5 capas de células, se cambia el medio Defined Keratinocyte-SFM (GIBCO) por un medio de estratificación (DMEM/F12 con 10% de suero bovino + 10ng/ml EGF). Las células antes de su utilización para el experimento se mantienen en este medio durante una semana más.

El cultivo celular fue realizado por Patricia Loma Lozano bajo la supervisión de la Dra. Ana Isabel Guzmán Aranguéz.

### **5.7.3. Recogida de muestras.**

Con el cultivo celular se han obtenido aprox. 100.000 células por pocillo. En el momento que están preparadas para el estudio, se extraen de la estufa y se realizan 3 lavados con PBS 1x teniendo mucho cuidado para no estimular la liberación de nucleótidos. Después de los lavados se cubren las células con 1 ml de PBS (tampón fosfato alcalino) 1x y se coloca la placa multiwell otra vez en la estufa a 37 °C durante 30 minutos

Pasado ese tiempo, se recogen 100 µl del sobrenadante de cada pocillo y se congelan en eppendorf para su posterior análisis en el HPLC. En estas muestras tendremos la liberación basal de diadenosina polifosfatos por las células epiteliales humanas.

Para estimular la liberación de forma mecánica utilizaremos una pipeta y realizaremos 3 lavados en cada pocillo con 1 ml de PBS 1x, irrigando el líquido sobre las células con fuerza. Pasados 2 minutos de la estimulación, recogeremos una muestra de 100 µl de cada pocillo que guardaremos en eppendorf para analizar posteriormente.

#### **5.7.4. Análisis HPLC.**

Para analizar las muestras en el HPLC procedemos a su descongelación. A continuación se centrifugan durante 5 minutos a 13.000 rpm y se recogen 75  $\mu$ l del sobrenadante que se colocan en los viales del inyector del HPLC. Para el análisis de cada muestra el inyector recogerá 20  $\mu$ l.

La fase móvil con par iónico estaba compuesta por 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM tetrabutil amonio (TBA), 20 % acetonitrilo y un pH de 7,5.

## 5.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó bajo la supervisión y las recomendaciones de la Dra. Carmen Nieto Zayas del Departamento de Estadística e Investigación Operativa III de la Escuela Universitaria de Estadística de la Universidad Complutense de Madrid.

Todo el análisis estadístico se realizó con el software SPSS 15.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). Se utilizaron diferentes técnicas de análisis en función de los grupos analizar y del tipo de prueba realizada. Los resultados obtenidos y analizados estadísticamente se expresaron media  $\pm$  error estándar de la media (S.E.M).

En la primera y segunda fase del estudio se utilizaron técnicas paramétricas para analizar los resultados asumiendo normalidad en la distribución, la cual se analizó con el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov. La comparación entre grupos de las concentraciones de diadenosina polifosfatos, como del volumen lagrimal -al ser variables cuantitativas- se realizó con la t de Student para muestras independientes. En la comparación entre diferentes edades se utilizó el análisis de varianza de un solo factor (ANOVA).

En los estudios de la tercera fase relacionados con pacientes de Aniridia congénita, queratoconos y Síndrome de Sjögren primario se utilizaron test paramétricos cuando se comparó el grupo control con el grupo completo a estudiar (t de Student) y test no-paramétricos para comparaciones intra-grupos. Los test no-paramétricos son los más adecuados cuando no se asume normalidad en la muestra, analizamos variables cualitativas o el tamaño de muestra no es suficiente (Armitage y Berry 1994). La elección de este tipo de test, a pesar de asumir normalidad y que el estudio en general cumpla los requisitos del cálculo muestral, se debe a que se realizan comparaciones intragrupos en función de la edad, en el caso de la Aniridia congénita, y del volumen lagrimal, en los

pacientes con Síndrome de Sjögren, disminuyendo el “n” por debajo del tamaño muestral calculado anteriormente.

Para comparar las concentraciones de diadenosina polifosfatos, así como el volumen lagrimal (variables cuantitativas) entre subgrupos de Aniridia, queratoconos y Síndrome de Sjögren se utilizó el test de Wilcoxon Mann-Whitney U para muestras independientes. El análisis de varianza de un solo factor ANOVA (prueba paramétrica) se utilizó para comparar la evolución de las concentraciones de los diadenosina polifosfatos según la edad en los pacientes con Aniridia congénita.

Para estudiar la correlación entre variables ordinales (concentración diadenosina, volumen lagrimal, edad) se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

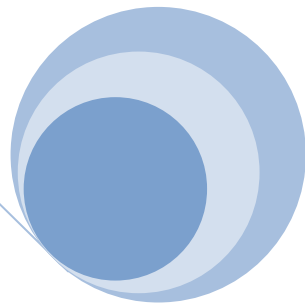
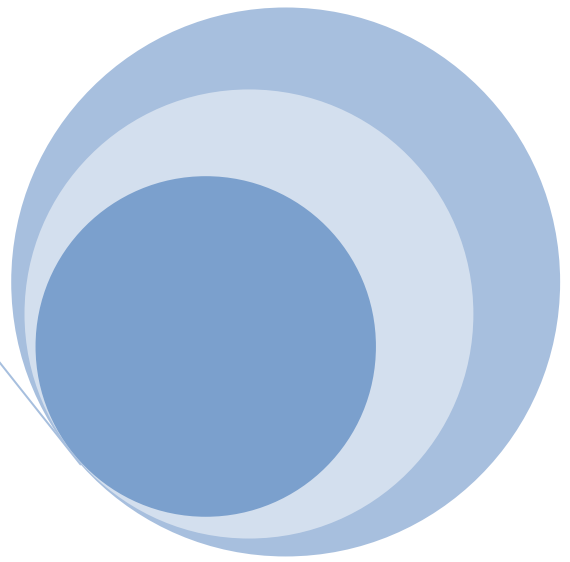
En el estudio de los diadenosina polifosfatos en pacientes de cirugía refractiva se utilizaron técnicas paramétricas para analizar las variables cuantitativas. Cuando se comparó la evolución de las variables cuantitativas en el tiempo se realizó el análisis con la t de Student para muestras pareadas, comparando con los valores pre operatorios.

Para el análisis de los síntomas evaluados con el test DEQ, se siguieron los criterios de los autores del test (Begley, Caffery et al. 2002a). Según este criterio, cuando los pacientes contestan a las preguntas relacionadas con la frecuencia de los síntomas “con frecuencia” o “constantemente”, se consideran sintomáticos. En las preguntas relacionadas con la intensidad de los síntomas, tanto por la mañana como por la tarde, se consideró como “intenso” cuando respondieron “4” o “5”, y no intenso con cualquiera de las otras opciones de respuesta. La prueba no paramétrica del  $X^2$  de Pearson fue la elegida para contrastar las frecuencias de los síntomas entre los grupos control y los grupos a estudiar. Para comparar los cambios diurnos (mañana-tarde) en la intensidad de los síntomas se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon.

Para el estudio de la relación entre la intensidad de los síntomas con las concentraciones de diadenosina polifosfatos se utilizó el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis. En el caso de la relación entre frecuencia de síntomas y concentraciones de diadenosina polifosfatos se utilizó el análisis de varianza de un solo factor (ANOVA).

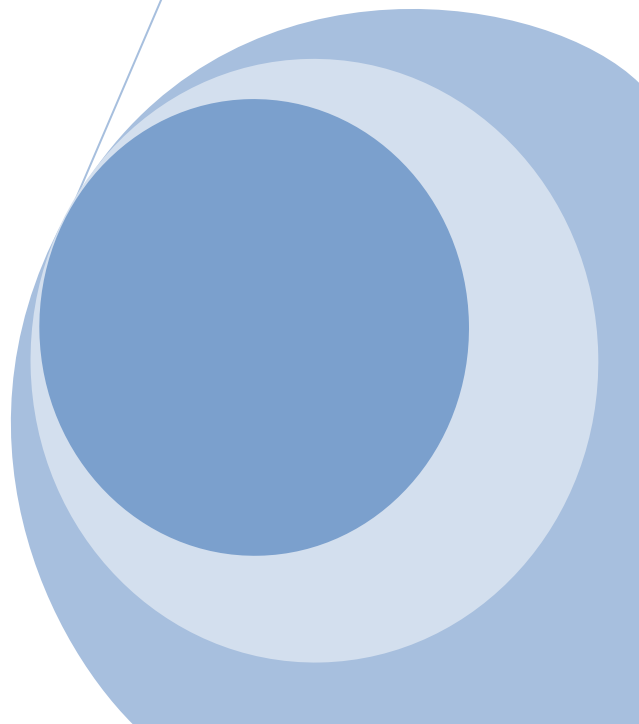
Por último, en el estudio In Vitro de la liberación de diadenosina polifosfatos se utilizó la t de Student para evaluar si existían diferencias significativas antes y después de la estimulación mecánica.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p valor fue  $p < 0,05$ .



**6**

**Resultados**





## **6.1 PRIMERA FASE: identificación de los dinucleótidos en la lágrima humana.**

### **6.1.1. Identificación de los diadenosin polifosfatos en lágrima humana.**

Al realizar el análisis de la lágrima de los sujetos voluntarios en el estudio, se pudieron identificar tres picos en el cromatograma que correspondían a el diadenosina trifosfato ( $Ap_3A$ ), a el diadenosina tetrafosfato ( $Ap_4A$ ) y a el diadenosina pentafosfato ( $Ap_5A$ ). La identificación se realizó comparando los picos obtenidos en la lágrima humana con los que se obtienen al analizar diadenosina standards inyectados en el HPLC.

Tanto en las muestras recogidas sin anestesia como con anestesia se verificó que los picos encontrados correspondían a los diadenosina polifosfatos utilizando los dos métodos de verificación expuestos en el apartado 5.5.3.

En la gráfica 6.1 podemos observar las concentraciones correspondientes a los tres diadenosina polifosfatos encontrados en lágrima humana sin anestésico. El  $Ap_4A$  es el diadenosin que se presenta con mayor concentración, en cambio el  $Ap_3A$  apenas es cuantificable por la resolución del instrumento de medida.

Con el propósito de determinar la implicación neural de la secreción lagrimal en las concentraciones de diadenosina polifosfatos en la lágrima se realizó el mismo experimento pero utilizando un anestésico tópico. El volumen lagrimal disminuyó aproximadamente en un 50% ( $p$  valor  $< 0,001$ ; tabla 6.1) y las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  aumentaron un 75% y un 200% respectivamente, mientras que la concentración de  $Ap_3A$  se mantuvo constante, como se puede apreciar en la gráfica 6.1.

	Sin anestésico	Con anestésico	p valor
<b>Schirmer</b> (media $\pm$ SEM)	25,10 $\pm$ 0,68	12,10 $\pm$ 1,02	<0,001*

Tabla 6.1. Volumen lagrimal evaluado con el test de Schirmer. p valor <0,01 (t-Student).

En la tabla 6.2 se muestran las concentraciones obtenidas en ambos experimentos así como los p-valor al comparar los diadenosina sin anestésico vs. con anestésico.

	Sin anestésico	Con anestésico	p valor
<b>Ap<sub>3</sub>A</b> (media $\pm$ SEM)	0,002 $\pm$ 0,002	0,0015 $\pm$ 0,002	0,858
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media $\pm$ SEM)	0,108 $\pm$ 0,018	0,189 $\pm$ 0,020	0,004*
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media $\pm$ SEM)	0,037 $\pm$ 0,006	0,112 $\pm$ 0,012	<0,001**

Tabla 6.2. Concentraciones de diadenosina polifosfatos en lágrima humana sin y con anestésico expresadas en  $\mu$ M. \* p valor < 0,05, \*\* p valor < 0,01 (t-Student).

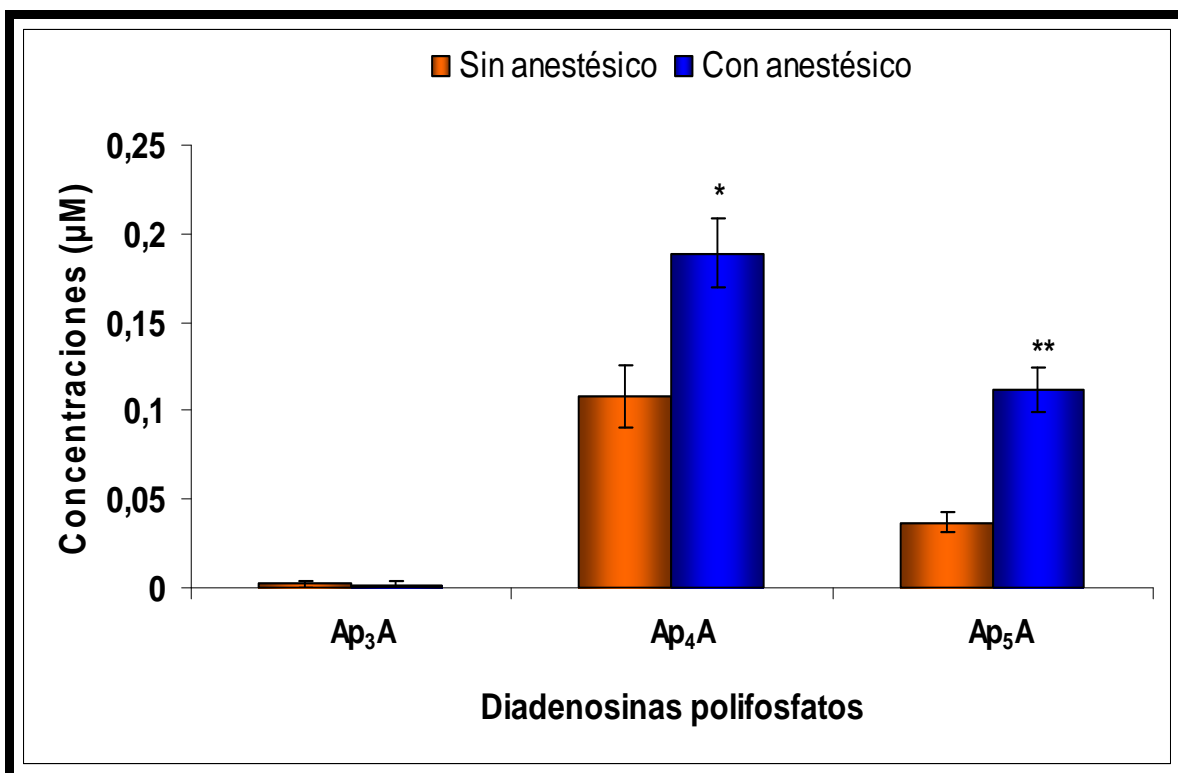


Figura 6.1 Concentraciones diadenosina polifosfatos en lágrima humana sin y con anestésico. \* p valor < 0,05, \*\* p valor < 0,01 (t-Student).

### 6.1.2. Concentraciones de los diadenosin polifosfatos según la edad y sexo.

Una vez identificada la presencia de los diadenosina polifosfatos en la lágrima humana, evaluamos si existían diferencias según la edad y el sexo. Para ello, se seleccionó a 93 voluntarios con edades comprendidas entre 7 y 90 años. Para evaluar la evolución de las concentraciones de estas moléculas según la edad, se dividió la población estudiada en grupos como se muestra en la tabla 6.3.

Analizadas las muestras en el HPLC comprobamos que el Ap<sub>3</sub>A es prácticamente indetectable por lo que se decide estudiar a partir de ahora las concentraciones del Ap<sub>4</sub>A y el Ap<sub>5</sub>A.

<b>&lt; 20 años (n=13)</b>	<b>20-30 años (n=17)</b>	<b>30-40 años n= (13)</b>	<b>40-50 años n=(17)</b>
10,33 ± 0,64	25,47 ± 0,68	33,96 ± 0,61	45,35 ± 0,74
<b>50-60 años n= (13)</b>	<b>60-70 años n= (10)</b>	<b>&gt; 70 años n= (10)</b>	
55,71 ± 1,03	64,08 ± 0,83	75,89 ± 1,63	

**Tabla 6.3. Distribución por grupos de edad de los voluntarios que participaron en el estudio y edades medias.**

Observamos en la gráfica 6.2 observamos que el Ap<sub>4</sub>A se mantiene con unas concentraciones similares hasta los 50 años y a partir de esa edad aumenta su concentración significativamente. (p valor < 0,01, ANOVA). En cambio el Ap<sub>5</sub>A no presenta cambios significativos en su concentración. (p valor =0,245, ANOVA).

En la tabla 6.4 se presentan las concentraciones de los dos diadenosina polifosfatos estudiadas en este apartado.

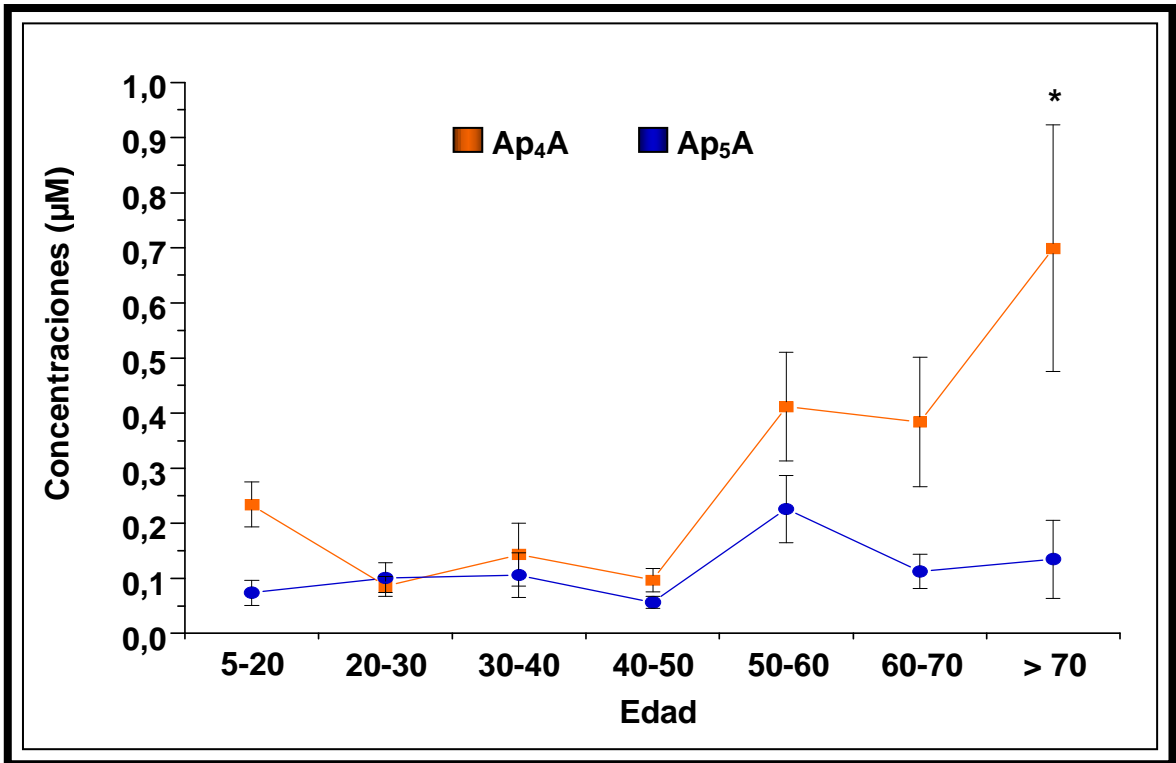


Figura 6.2. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función de la edad. \* p valor < 0,01 (ANOVA).

	Ap <sub>4</sub> A (media ± SEM)	Ap <sub>5</sub> A (media ± SEM)
< 20 años	0,234 ± 0,041	0,074 ± 0,023
20-30 años	0,086 ± 0,018	0,101 ± 0,027
30-40 años	0,143 ± 0,057	0,106 ± 0,041
40-50 años	0,097 ± 0,021	0,057 ± 0,011
50-60 años	0,412 ± 0,098	0,226 ± 0,061
60-70 años	0,384 ± 0,118	0,113 ± 0,031
> 70 años	0,699 ± 0,224	0,135 ± 0,071
P valor (ANOVA)	< 0,01*	0,245

Tabla 6.4. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en μM en función de la edad.

Si comparamos las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  entre menores y mayores de 50 años, gráfica 6.3, encontramos diferencias significativas entre ambos grupos para los dos diadenosina polifosfatos. En el caso del  $Ap_4A$  aumenta aproximadamente un 400% ( $p$  valor  $< 0,01$ ) y el  $Ap_5A$  aumenta el doble en los pacientes mayores de 50 años ( $p$  valor =  $0,015$ ).

En la tabla 6.5 se muestran las concentraciones para el grupo completo ( $n=93$ ), para los menores de 50 años ( $n=60$ ) y para los mayores de 50 años ( $n=33$ ).

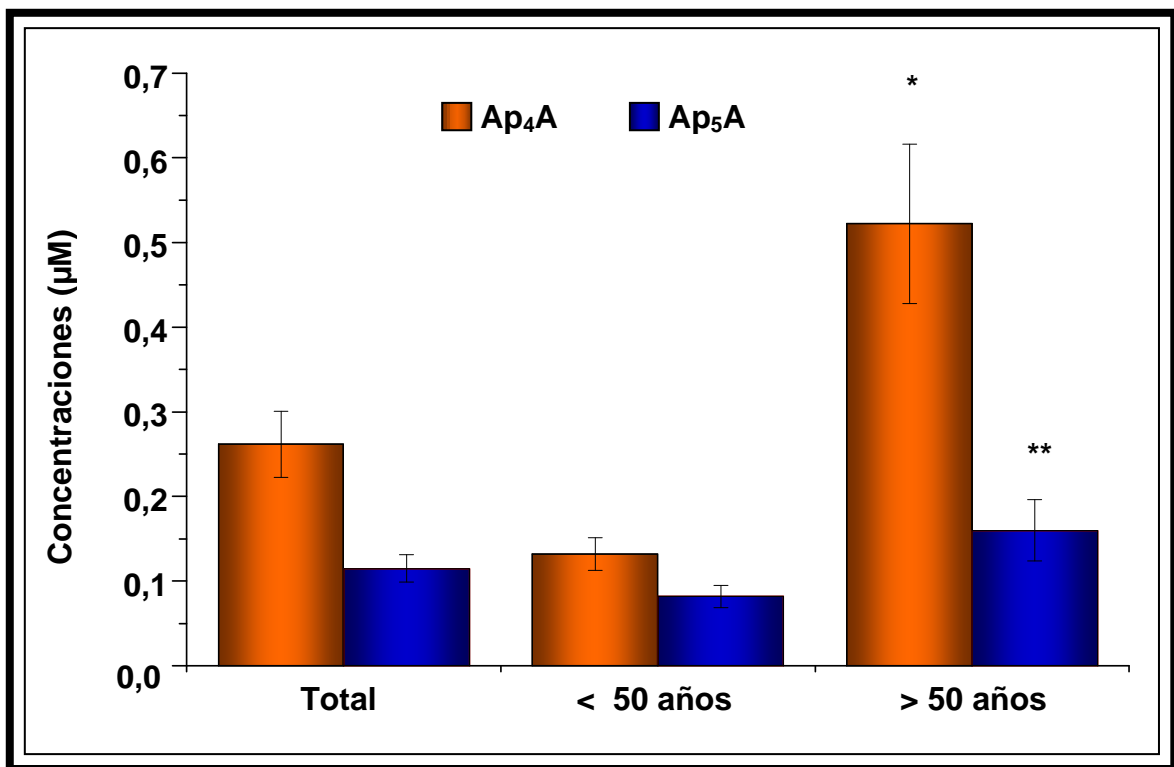


Figura 6.3. Concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  en el grupo completo y en los subgrupos de menores de 50 años y mayores de 50 años. \*  $p$  valor  $< 0,01$ , \*\*  $p$  valor  $< 0,05$  menores de 50 años vs. mayores de 50 años (t-Student).

Al comparar las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A entre sexos encontramos mayor presencia de este diadenosin polifosfato en los hombres aunque sin diferencias significativas respecto a las mujeres (p valor = 0,078; t-Student). El Ap<sub>5</sub>A se encuentra en concentraciones muy similares en ambos sexos (p valor = 0,761). Gráfica 6.4 y 6.5.

Si realizamos la comparación entre ambos sexos en los subgrupos de menores y mayores de 50 años encontramos que tampoco existen diferencias significativas entre sexos, aunque se mantiene la tendencia de mayor concentración de Ap<sub>4</sub>A en los hombres que en las mujeres. En la tabla 6.5 se recogen las concentraciones de los diadenosina polifosfatos estudiadas.

<b>Totales</b>			
	<b>Hombres (n=47)</b>	<b>Mujeres (n=46)</b>	<b>P valor</b>
<b>Ap<sub>4</sub>A (media ± SEM)</b>	0,325 ± 0,065	0,185 ± 0,044	0,078
<b>Ap<sub>5</sub>A (media ± SEM)</b>	0,107 ± 0,018	0,117 ± 0,028	0,761
<b>Menores de 50 años</b>			
	<b>Hombres (n=47)</b>	<b>Mujeres (n=46)</b>	<b>P valor</b>
<b>Ap<sub>4</sub>A (media ± SEM)</b>	0,160 ± 0,036	0,100 ± 0,016	0,122
<b>Ap<sub>5</sub>A (media ± SEM)</b>	0,092 ± 0,017	0,062 ± 0,017	0,216
<b>Mayores de 50 años</b>			
	<b>Hombres (n=47)</b>	<b>Mujeres (n=46)</b>	<b>P valor</b>
<b>Ap<sub>4</sub>A (media ± SEM)</b>	0,594 ± 0,136	0,412 ± 0,132	0,357
<b>Ap<sub>5</sub>A (media ± SEM)</b>	0,120 ± 0,033	0,224 ± 0,072	0,164

Tabla 6.5. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en µM en función del sexo. (t-Student).

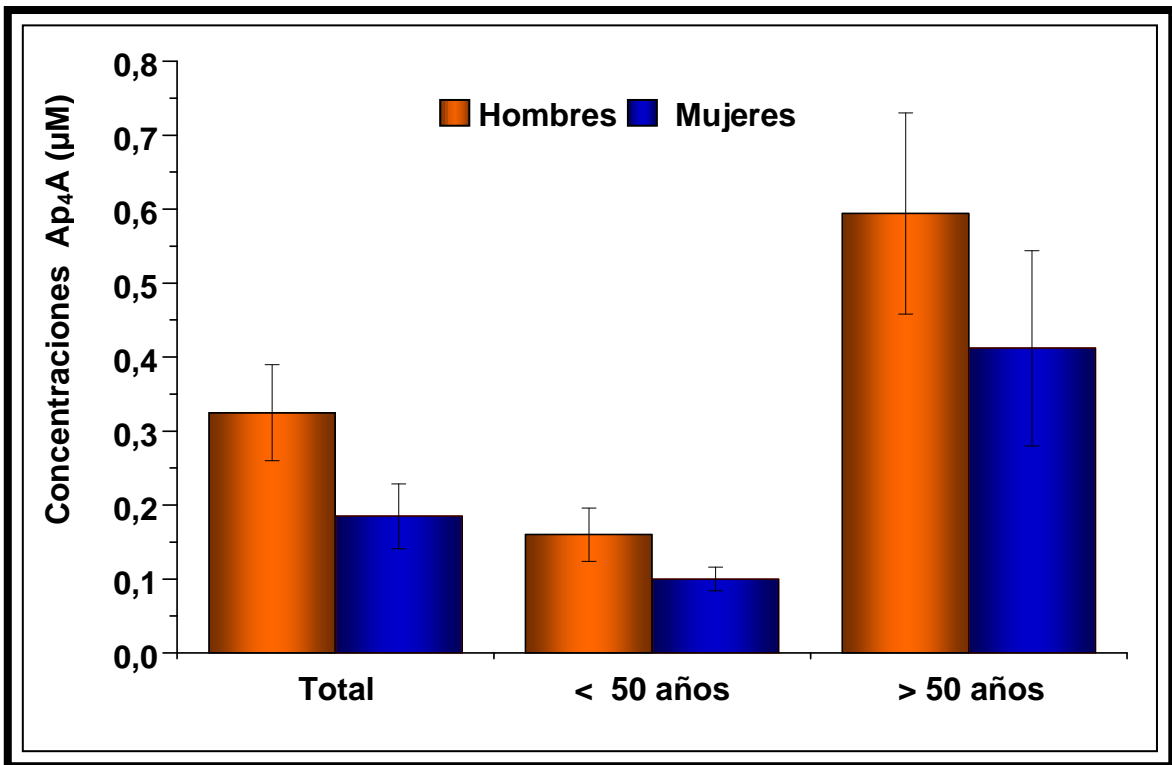


Figura 6.4. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A según el sexo en el grupo completo y en los subgrupos de menores de 50 años y mayores de 50 años.

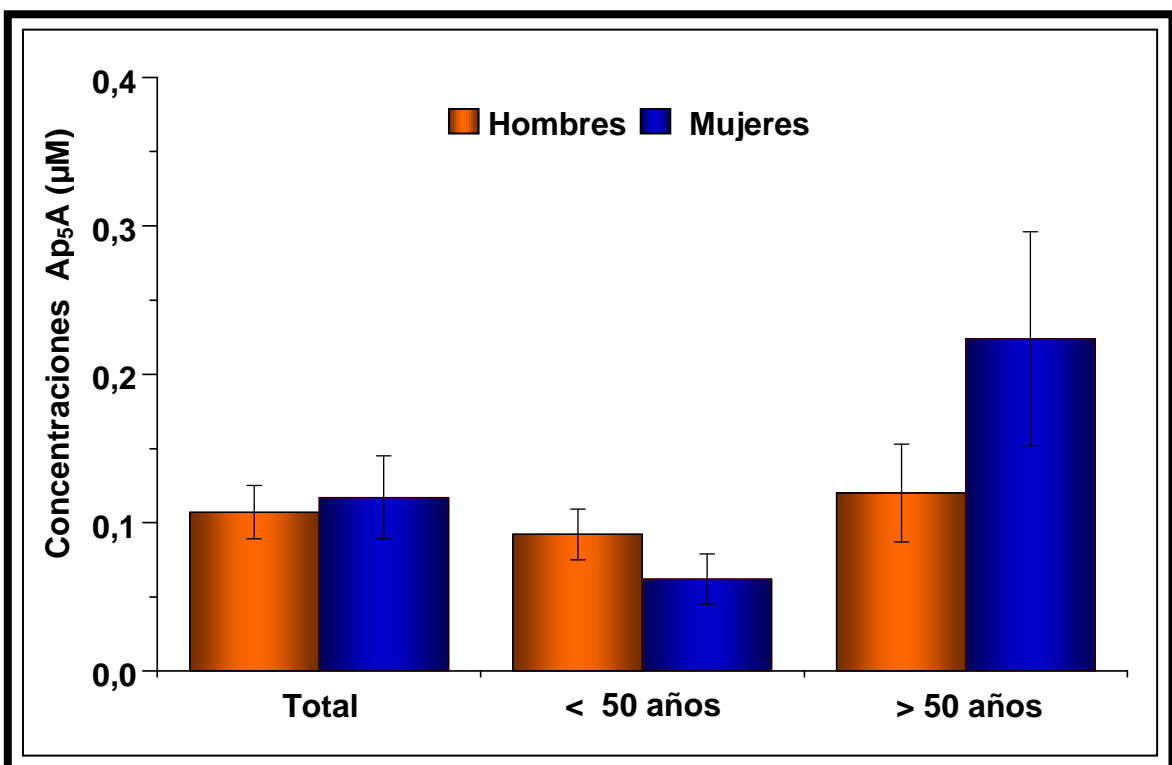


Figura 6.5. Concentraciones de Ap<sub>5</sub>A según el sexo en el grupo completo y en los subgrupos de menores de 50 años y mayores de 50 años.

## **6.2 SEGUNDA FASE: estudio de los dinucleótidos en el ojo seco y su liberación a la superficie ocular.**

Como se ha descrito en la sección de material y métodos, en esta fase del estudio participaron 97 sujetos, los cuales se dividieron en 46 sujetos sintomáticos y 51 sujetos asintomáticos en función de la puntuación obtenida en el test de McMonnies.

### **6.2.1. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes sintomáticos de ojo seco.**

Participaron en esta fase los 46 sujetos sintomáticos y 37 de los 51 sujetos asintomáticos seleccionados. El grupo de sujetos sintomáticos se dividió a su vez en sujetos con lacrimación normal los cuales presentaron un test de Schirmer  $>5$  (n=34) y en sujetos con lacrimación baja, con test de Schirmer  $\leq 5$  (n=12) Figura 6.6.

En la tabla 6. 6 se presentan los valores obtenidos por cada grupo en el test de McMonnies y los valores de secreción lagrimal. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la secreción lagrimal tanto del grupo control como del grupo de sintomáticos con lacrimación normal respecto del grupo de sintomáticos con lacrimación baja (p valor $<0,01$ ). En el caso del test de sintomatología de McMonnies las diferencias significativas se encuentran entre el grupo control y ambos grupos de sintomáticos (p valor $<0,01$ ), en cambio no existen diferencias entre los dos grupos de sintomáticos.

	Control	Sintomáticos	
		Lacrimación normal	Lacrimación baja
<b>Schirmer</b> (media ± SEM)	19,91 ± 1,18	18,51 ± 0,73	3,59 ± 0,32 *,**
<b>McMonnies</b> (media ± SEM)	5,1 ± 0,4	13,3 ± 0,4**	12,8 ± 0,5 **

Tabla 6.6. Valores obtenidos con el test de Schirmer (mm) y el cuestionario de McMonnies.  
\* p valor < 0,01 grupo sintomático lacrimación normal vs. grupo sintomático lacrimación baja; \*\* p valor < 0,01 grupo control vs. grupos sintomáticos. (t-Student).

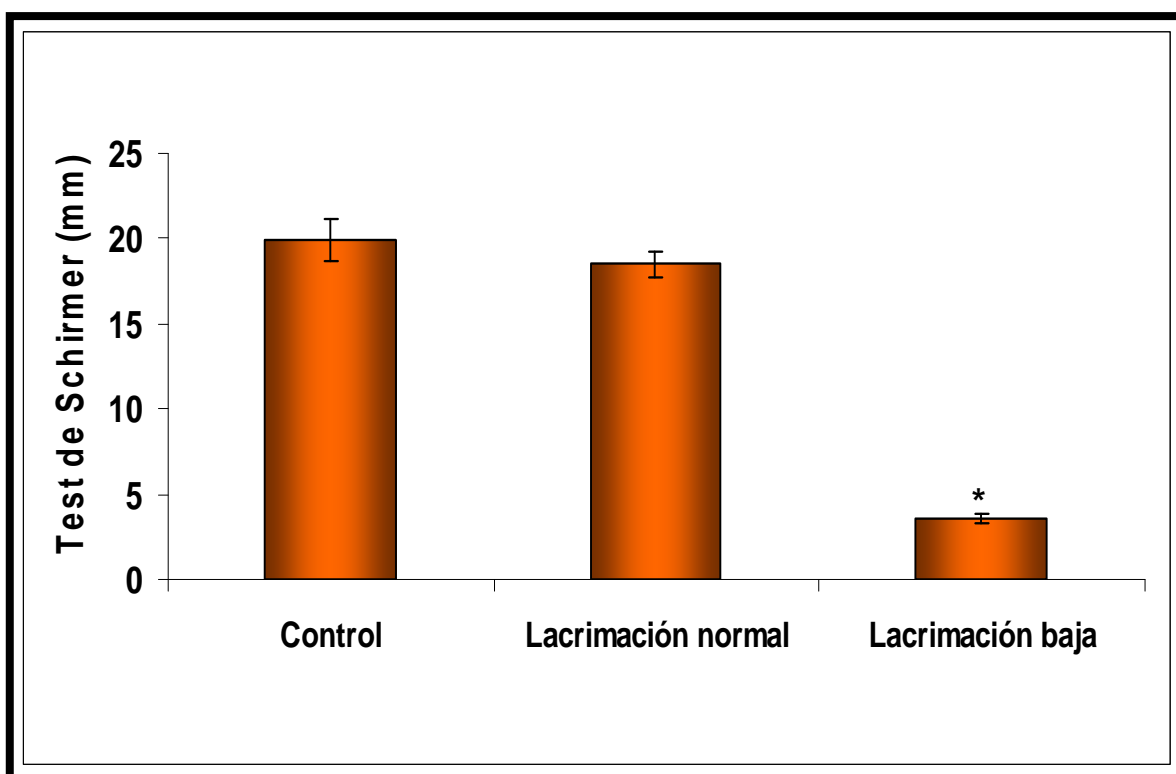


Figura 6.6. Valores obtenidos con el test de Schirmer. \* p valor < 0,01(t-Student). Grupo sintomático lacrimación baja vs. grupo control y grupo lacrimación normal.

Al analizar las muestras de lágrima en el HPLC encontramos la presencia de dos de los diadenosina polifosfatos que anteriormente hemos descrito su presencia en la lágrima, el Ap<sub>4</sub>A y el Ap<sub>5</sub>A.

En la tabla 6.7 se muestran las concentraciones obtenidas en cada uno de los grupos estudiados. Se puede observar valores en el grupo control similares a los obtenidos en la primera fase tanto para el Ap<sub>4</sub>A como para el Ap<sub>5</sub>A, confirmando estas concentraciones como las esperables en sujetos sin sequedad ocular. El grupo de sujetos sintomáticos con lacrimación normal presentaron 5 veces más concentración de Ap<sub>4</sub>A (p valor < 0,01) y un ligero aumento en el Ap<sub>5</sub>A sin ser estadísticamente significativo.

En el caso de los sujetos sintomáticos con lacrimación baja el aumento en las concentraciones de los diadenosina polifosfatos estudiadas es considerable, siendo casi 100 veces mayor en el caso del Ap<sub>4</sub>A y de más de 300 veces en el caso del Ap<sub>5</sub>A (p valor < 0,01 en ambos casos).

	Control	Sintomáticos	
		Lacrimación normal	Lacrimación baja
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media + SEM)	0,107 ± 0,048	0,590 ± 0,057**	10,680 ± 0,540 * **
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,036 ± 0,005	0,058 ± 0,030	12,450 ± 0,083 * **

**Tabla 6.7. Concentraciones de los diadenosina polifosfatos estudiadas expresadas en µM. \* p valor < 0,01 grupo sintomático lacrimación normal vs. grupo sintomático lacrimación baja; \*\* p valor < 0,01 grupo control vs. grupos sintomáticos. (t-Student).**

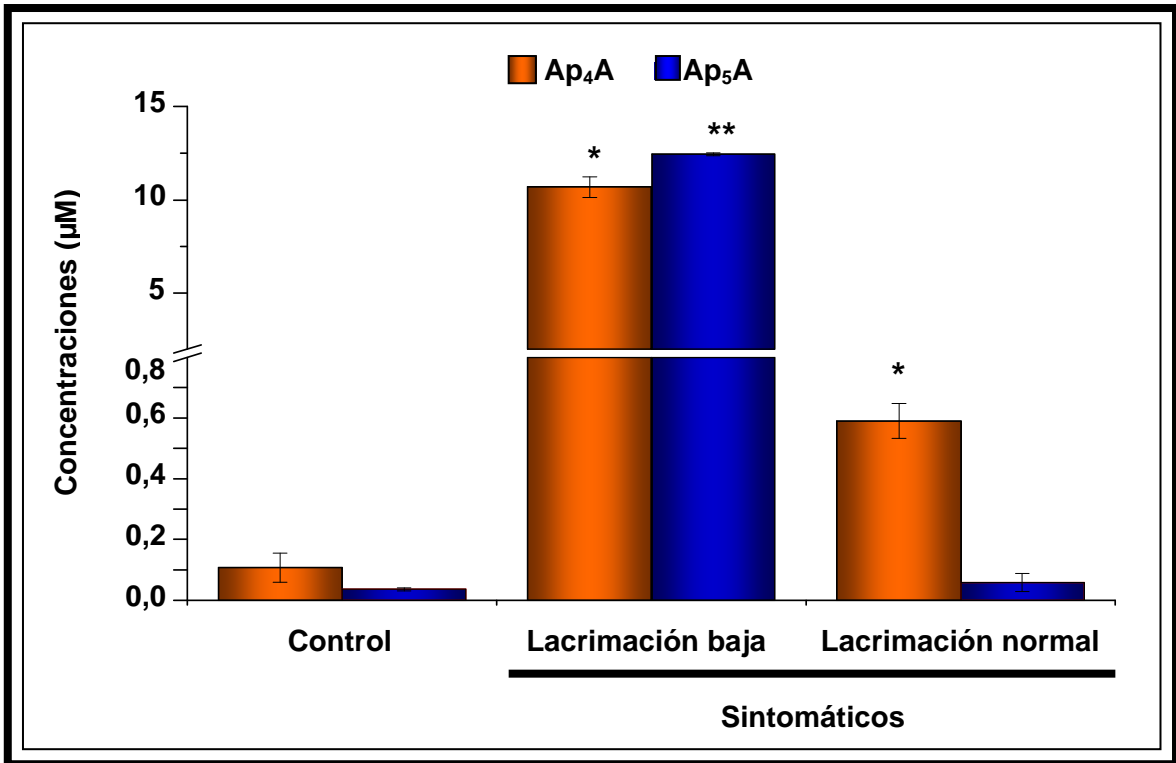


Figura 6.7. Se observa el aumento considerable de las concentraciones de diadenosina polifosfatos en el grupo de sintomáticos con lacrimación baja. \* p valor < 0,01 para el Ap<sub>4</sub>A al comparar el grupo control con los grupos sintomáticos; \*\* p valor < 0,01 para el Ap<sub>5</sub>A al comparar el grupo control con los grupos sintomáticos. (t-Student).

### 6.2.2. Estudio *in Vivo* de liberación de diadenosina polifosfatos.

El propósito de esta fase del estudio fue determinar si un estrés mecánico sobre la superficie ocular, como el parpadeo, podría ser un mecanismo de liberación de diadenosina polifosfatos en la lágrima. Participaron 8 sujetos en el estudio, todos ellos con un volumen lagrimal normal y sin presencia de sintomatología, mostrando valores en el test de McMonnies de  $5,1 \pm 2,4$ .

Cuando se realizó en test de Schirmer sin anestésico, la secreción fue aumentando según aumentaba la frecuencia de parpadeo, siendo estadísticamente significativo el aumento a partir de los 30 parpadeos por minuto (p.p.m.) con un p valor < 0,01. Al instilar

un anestésico el parpadeo no afectó a la secreción lagrimal, dando valores muy similares en todas las frecuencias de parpadeo.

	Sin parpadeo	12 p.p.m.	30 p.p.m.	60 p.p.m.
<b>Schirmer (media ± SEM)</b>	11,85 ± 0,60	13,30 ± 0,34	19,6 ± 0,43*	22,60 ± 0,69*
<b>Schirmer basal (media ± SEM)</b>	5,71 ± 0,33	6,05 ± 0,40	5,62 ± 0,42	6,47 ± 0,50

Tabla 6.8. Valores en el test de Schirmer con y sin anestésico con diferentes frecuencias de parpadeo. Valores expresados en mm. \* p valor < 0,01 vs. sin parpadeo. (t-Student).

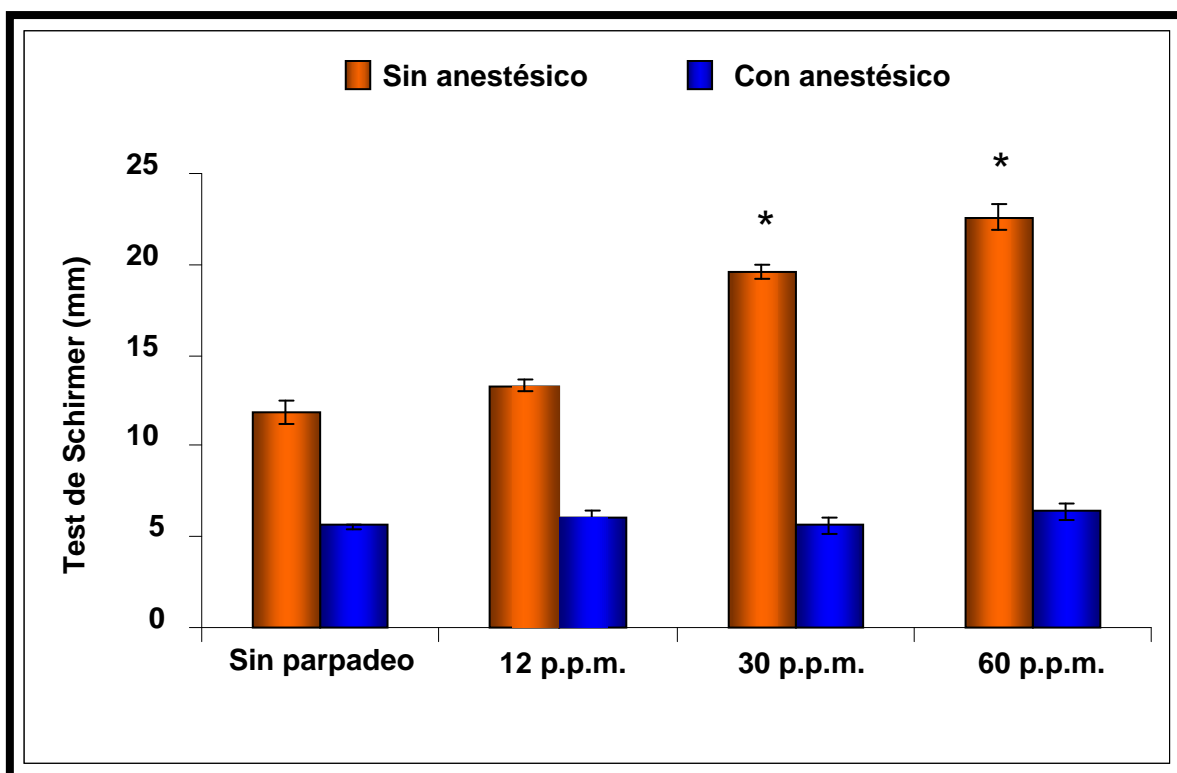


Figura 6.8. Representación gráfica de la evolución de la secreción lagrimal con el parpadeo. \* p valor < 0,01 vs. sin parpadeo. (t-Student).

Al realizar el análisis cromatográfico de la lágrima se encontró diferencias sustanciales en las concentraciones tanto de Ap<sub>4</sub>A como de Ap<sub>5</sub>A al aumentar la frecuencia de parpadeo (tabla 6.9).

En la lágrima recogida sin el uso de anestésico las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A aumentan con la frecuencia de parpadeo, con diferencias significativas a partir de los 30 parpadeos por minuto respecto a no parpadear (p valor < 0,01). El aumento con 60 parpadeos por minuto es aproximadamente de 25 y 50 veces para el Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A, respectivamente.

<b>Sin anestésico</b>				
	<b>Sin parpadeo</b>	<b>12 p.p.m</b>	<b>30 p.p.m.</b>	<b>60 p.p.m.</b>
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	0,109 ± 0,029	0,235 ± 0,047	1,114 ± 0,172*	2,853 ± 0,139*
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,041 ± 0,018	0,080 ± 0,026	0,912 ± 0,154*	2,090 ± 0,065*
<b>Con anestésico</b>				
	<b>Sin parpadeo</b>	<b>12 p.p.m</b>	<b>30 p.p.m.</b>	<b>60 p.p.m.</b>
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	0,190 ± 0,021	3,286 ± 0,224**	10,730 ± 2,384**	14,825 ± 0,628**
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,110 ± 0,049	0,559 ± 0,089**	7,418 ± 1,293**	13,763 ± 1,216**

**Tabla 6.9. Concentraciones expresadas en µM de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A tras parpadeo forzado con y sin anestésico. \* p valor < 0,01 respecto sin parpadeo en muestras sin anestésico. \*\* p valor < 0,01 respecto sin parpadeo en muestras con anestésico. (t-Student).**

Cuando se instiló el anestésico, los valores obtenidos sin parpadeo son similares a los obtenidos en la primera fase. Las concentraciones aumentaron considerablemente desde los 12 parpadeos por minuto para ambos dinucleótidos respecto a las concentraciones sin parpadear (p valor < 0,01), llegando a ser 75 veces mayor para el Ap<sub>4</sub>A y 125 veces para el Ap<sub>5</sub>A con 60 parpadeos por minuto. Este aumento de concentración es significativo ya que al tener unos valores de Schirmer similares para

todas las frecuencias de parpadeo nos indica un aumento mayor en la cantidad de diadenosina polifosfatos en la lágrima que los que se mostrarían sin el anestésico.

En las graficas 6.9 y 6.10 se puede observar esta evolución de las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  con la frecuencia de parpadeo para las lágrimas recogidas sin y con anestésico.

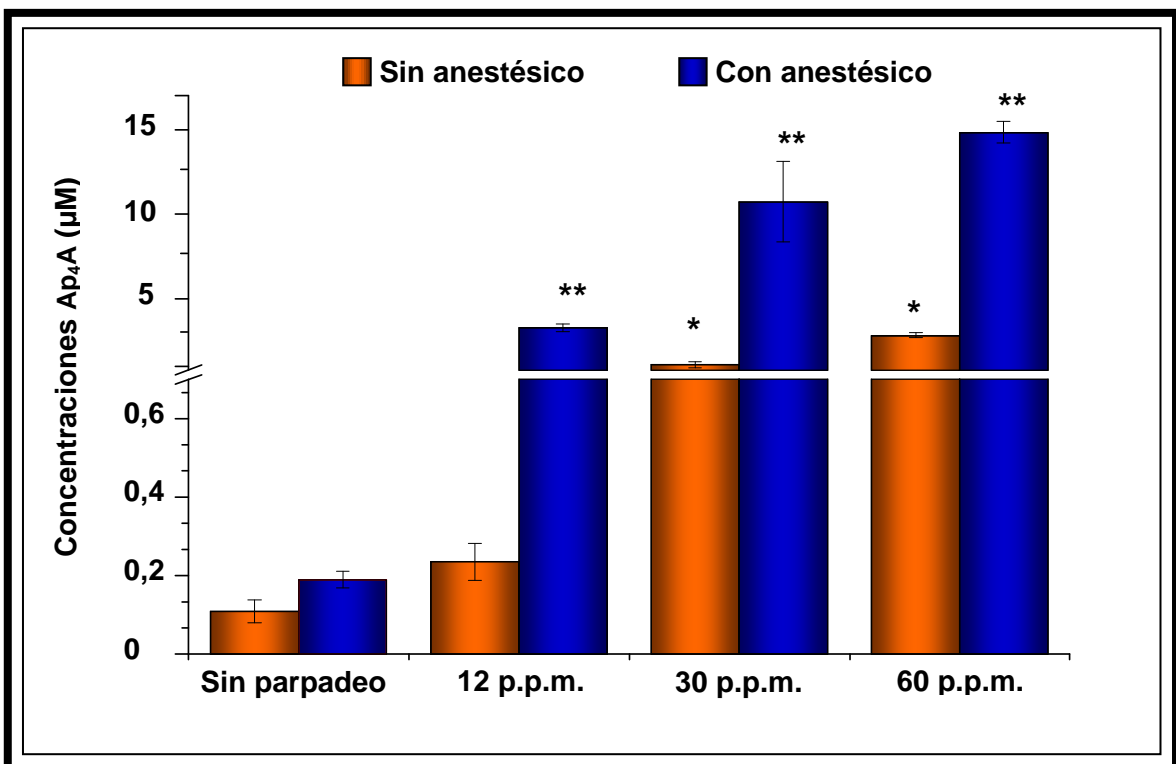


Figura 6.9. Concentraciones de  $Ap_4A$  en diferentes frecuencias de parpadeo. \* p valor < 0,01 respecto sin parpadeo en muestras sin anestésico. \*\* p valor < 0,01 respecto sin parpadeo en muestras con anestésico. (t-Student).

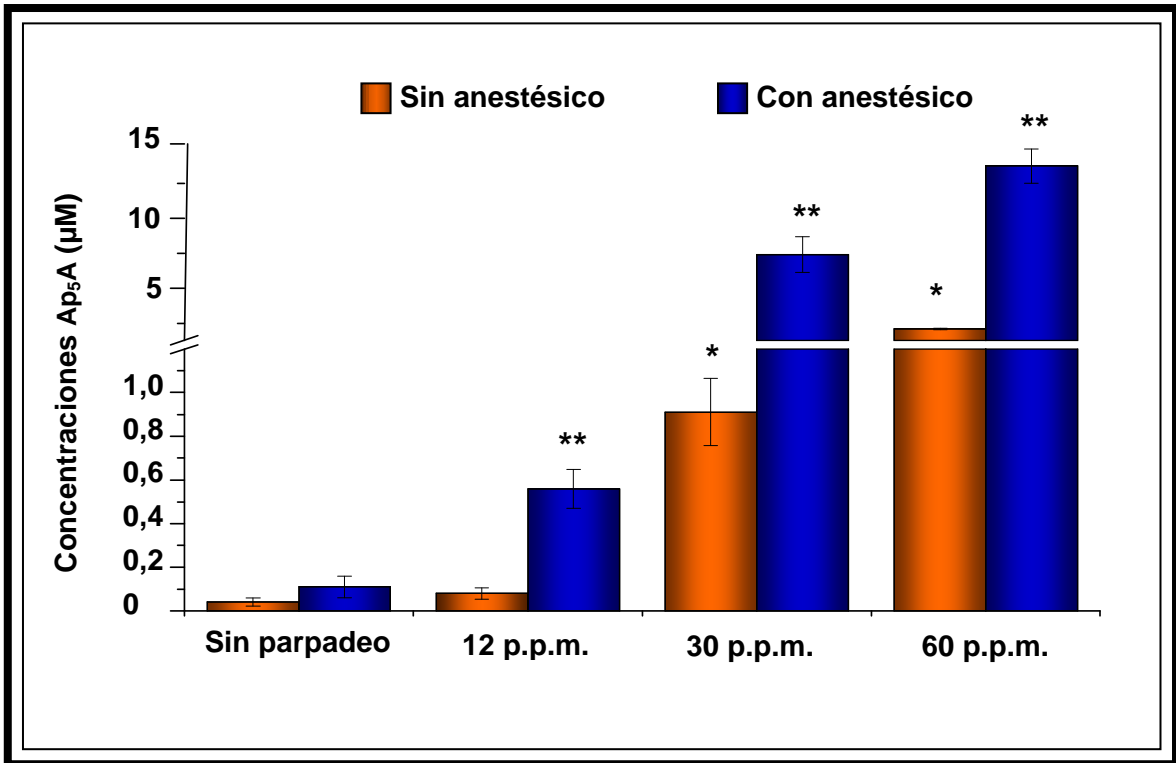


Figura 6.10. Concentraciones de Ap<sub>5</sub>A en diferentes frecuencias de parpadeo. \* p valor < 0,01 respecto sin parpadeo en muestras sin anestésico. \*\* p valor < 0,01 respecto sin parpadeo en muestras con anestésico. (t-Student).

### 6.2.3. Estudio de la estimulación mecánica de las terminales nerviosas de la córnea.

Los resultados obtenidos en los experimentos con un parpadeo forzado demuestran que el estrés mecánico provocado por el parpadeo aumenta las concentraciones de diadenosina polifosfatos en la lágrima. Para determinar si esa liberación de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A se debe simplemente a la fricción mecánica sobre las células epiteliales de la superficie ocular o también a una estimulación mecánica de las terminales nerviosas corneales se realizó el estímulo mecánico con el estesiómetro de Belmonte.

6 sujetos del grupo asintomático inicial formaron parte de este experimento. Los valores del test de McMonnies de este grupo fue  $8,1 \pm 2,1$ . Se presentan los resultados del experimento en la tabla 6.10 y en la figura 6.11.

Las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A antes de la estimulación mecánica son similares a los controles de los otros experimentos hasta ahora presentados. Las muestras de lágrima analizadas después de un estímulo mecánico moderado (170 mL/min.) muestran un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A (p valor < 0,05) mientras que el Ap<sub>5</sub>A no muestra cambios después del estímulo mecánico.

Al aplicar un estímulo mecánico más intenso (260 mL/min.) las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A no presentan variaciones respecto a los valores encontrados con un estímulo moderado. En el caso del Ap<sub>4</sub>A existen diferencias significativas respecto al control (p valor < 0,05).

	Control	170 (mL/min.)	260 (mL/min.)
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	0,107 ± 0,014	0,170 ± 0,005*	0,163 ± 0,02*
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,041 ± 0,012	0,058 ± 0,03	0,065 ± 0,003

**Tabla 6.10. Concentraciones expresadas en μM de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A antes (control) y tras la estimulación mecánica con un estesiómetro de gas. \* p valor < 0,05 control vs. estimulación mecánica. (t-Student).**

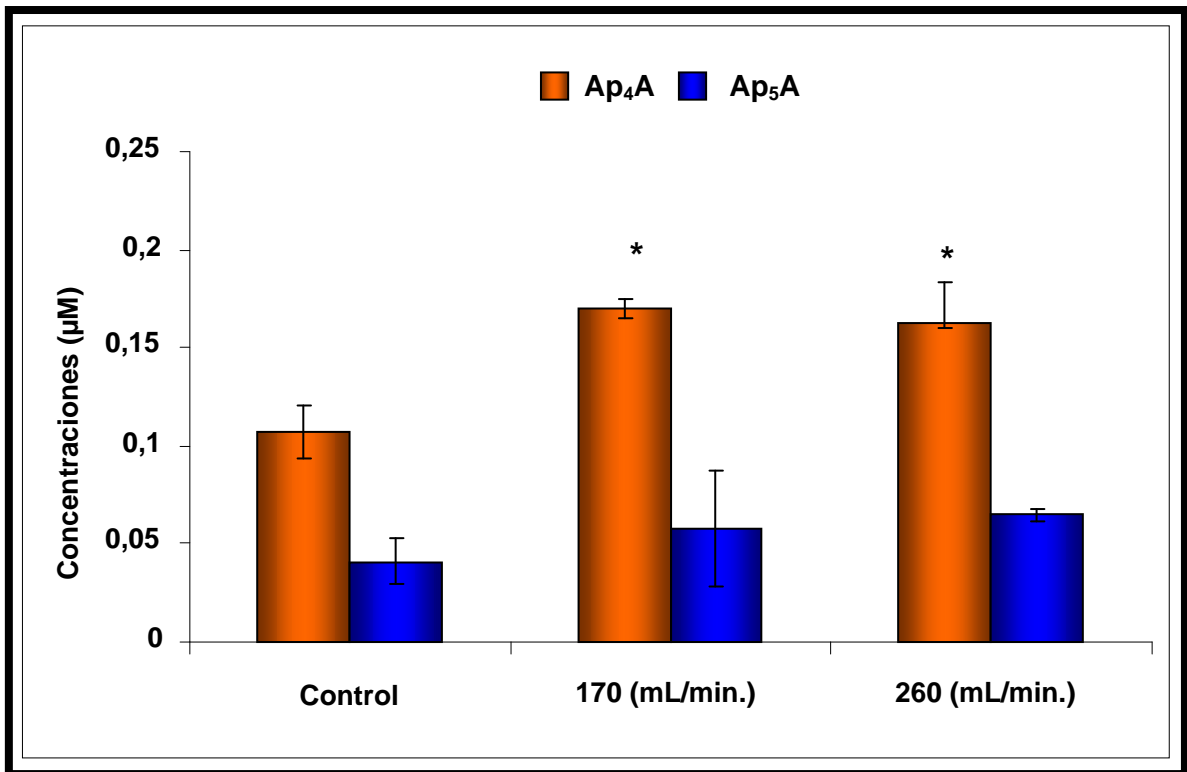


Figura 6.11. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A después de la estimulación mecánica con el +estesiómetro de gas. \* p valor < 0,05 control vs. estimulación mecánica. (t-Student).

#### 6.2.4. Estudio *In Vitro* de la liberación de los diadenosin polifosfatos.

Srinivas y colaboradores demostraron que el estrés mecánico provocaba la liberación de ATP en células epiteliales corneales de conejo (Srinivas, Mutharasan et al. 2002). Con el propósito de verificar los resultados obtenidos *In Vivo* con el parpadeo forzado y la estimulación mecánica de las terminaciones nerviosas de la córnea, se diseñó un experimento *In Vitro*, en el que se provocó la liberación de diadenosina polifosfatos induciendo un estímulo mecánico sobre un cultivo estratificado de células epiteliales corneales humanas.

Recogimos muestras antes de la estimulación mecánica, lo que llamamos “control”, y después de realizar un estrés mecánico lavando energicamente con PBS 1x las células, se volvió a recoger el sobrenadante, lo que hemos llamado “estimulado”.

Como podemos observar tanto en la tabla 6.11 como en la gráfica 6.12 el Ap<sub>4</sub>A y el Ap<sub>5</sub>A aumentan su concentración después del estímulo mecánico, siendo casi 4 veces mayor la concentración en ambos dinucleótidos. Este aumento es estadísticamente significativo tanto para el Ap<sub>4</sub>A como para el Ap<sub>5</sub>A con un p valor < 0,01.

	Control	Estimulado
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media + SEM)	3,18 ± 0,43	12,01 ± 2,19*
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media + SEM)	0,81 ± 0,13	2,83 ± 0,41*

Tabla 6.11. Concentraciones expresadas en nM de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A antes (control) y tras la estimulación mecánica con lavados enérgicos con PBS 1x. \* p valor < 0,01 control vs. estimulado. (t-Student).

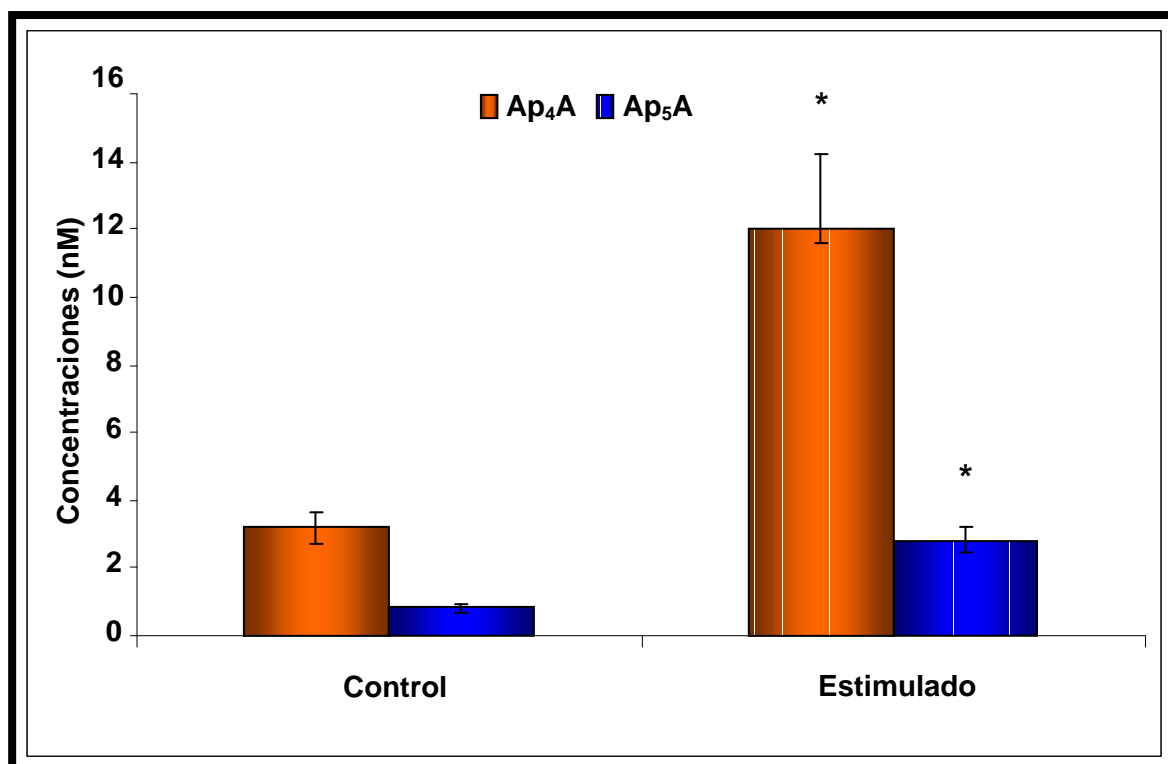


Figura 6.12. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A antes (control) y tras la estimulación mecánica con lavados enérgicos con PBS 1x. \* p valor < 0,01 control vs. Estimulado. (t-Student).

### **6.3 TERCERA FASE: estudio de los dinucleótidos en patologías oculares y cirugía refractiva.**

A la vista de los resultados obtenidos en las dos fases anteriores, se decidió hacer una tercera fase en la que estudiar las posibles variaciones en la concentración de los diadenosina polifosfatos,  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$ , en pacientes, que por sus patologías o por tratamientos, pudieran padecer ojo seco. En esta fase también se estudió las concentraciones de diadenosina polifosfatos en pacientes de queratocono, para verificar el mecanismo de liberación estudiado en la segunda fase.

#### **6.3.1. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en las patologías oculares.**

##### **6.3.1.1. Síndrome de Sjögren.**

La primera patología escogida relacionada con el ojo seco fue el Síndrome de Sjögren, que como se ha descrito en la introducción es un patología autoinmune que presenta un ojo seco acuodeficiente severo.

Los pacientes con Síndrome de Sjögren presentaron unos valores en el test de Schirmer sin anestésico tres veces inferiores a los que presentaron los pacientes del grupo control ( $p$  valor  $< 0,01$ ). Podríamos esperar que la lacrimación en estos pacientes fuera inferior a la obtenida, ya que las normas para el test de Schirmer sin anestésico establece como valor de corte 5-5,5 mm. Por esta razón decidimos a dividir este grupo en dos subgrupos, uno con aquellos pacientes que tuvieran una lacrimación por debajo de 5 mm al que llamamos subgrupo SS lacrimación baja, y otro con los pacientes con valores en el test de Schirmer por encima de 5 mm. al que denominamos subgrupo SS lacrimación normal.

En el subgrupo SS lacrimación baja lo formaron 8 pacientes, y 4 pacientes formaron el subgrupo SS lacrimación normal. La diferencia de volumen lagrimal entre ambos grupos fue estadísticamente significativa ( $p$  valor < 0,01) como podemos observar tanto en la tabla 6.12 como en la gráfica 6.13.

	Control	Grupo SS	Subgrupo SS lacrimación baja	Subgrupo SS lacrimación normal
<b>Schirmer (media <math>\pm</math> SEM)</b>	19,90 $\pm$ 2,30	6,00 $\pm$ 2,10*	1,00 $\pm$ 0,30	12,30 $\pm$ 1,20**

Tabla 6.12. Valores en el test de Schirmer expresados en mm. del grupo control, del grupo completo de pacientes con Síndrome de Sjögren y de los dos subgrupos en los que se dividió. \*  $p$  valor < 0,01 control vs. Grupo SS. (t-Student). \*\*  $p$  valor < 0,01 subgrupo SS lacrimación baja vs. subgrupo SS lacrimación normal. (Wilcoxon Mann-Withney U).

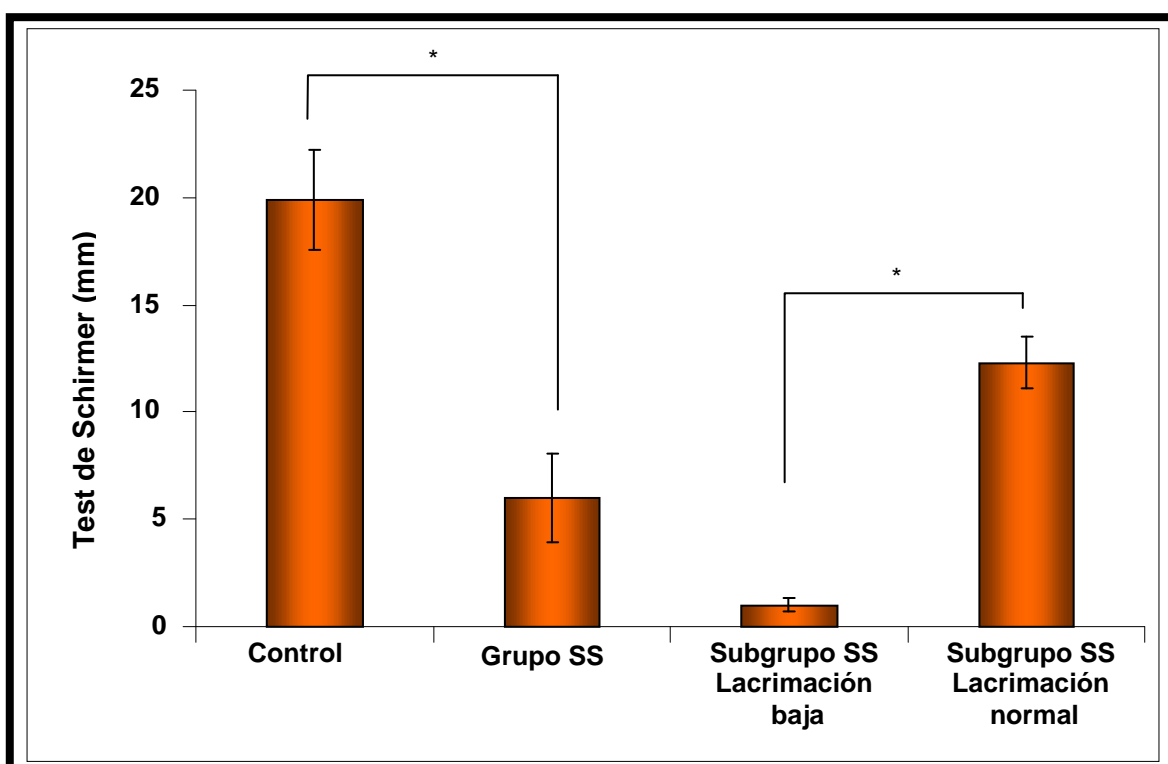


Figura 6.13. Valores en el test de Schirmer expresados en mm. del grupo control y del grupo completo de pacientes con Síndrome de Sjögren. Este último se dividió en dos subgrupos, uno de lacrimación baja y otro de lacrimación normal. \*  $p$  valor < 0,01 control vs. Grupo SS (t-Student). \*\*  $p$  valor < 0,01 subgrupo SS lacrimación baja vs. subgrupo SS lacrimación normal. (Wilcoxon Mann-Withney U).

En los pacientes con Síndrome de Sjögren encontramos un aumento muy significativo en las concentraciones de los diadenosina polifosfatos estudiadas con respecto al grupo control ( $p$  valor  $< 0,001$ ). En el caso del  $Ap_4A$  aumenta la concentración aproximadamente 42 veces y el  $Ap_5A$  alrededor de 600 veces. Tabla 6.13.

	Control	Grupo SS	Subgrupo SS lacrimación baja	Subgrupo SS lacrimación normal
<b><math>Ap_4A</math></b> (media $\pm$ SEM)	0,130 $\pm$ 0,030	2,541 $\pm$ 1,023*	4,092 $\pm$ 1,365	0,474 $\pm$ 0,204**
<b><math>Ap_5A</math></b> (media $\pm$ SEM)	0,043 $\pm$ 0,021	26,132 $\pm$ 6,951*	39,513 $\pm$ 8,453	8,302 $\pm$ 3,274**

Tabla 6.13. Concentraciones de los diadenosina polifosfatos estudiadas expresadas en  $\mu M$ . \*  $p$  valor  $< 0,05$  grupo control vs. grupo SS (t-Student). \*\* $p$  valor  $< 0,01$  subgrupo SS lacrimation baja vs. subgrupo SS lacrimation normal. (Wilcoxon Mann-Withney U).

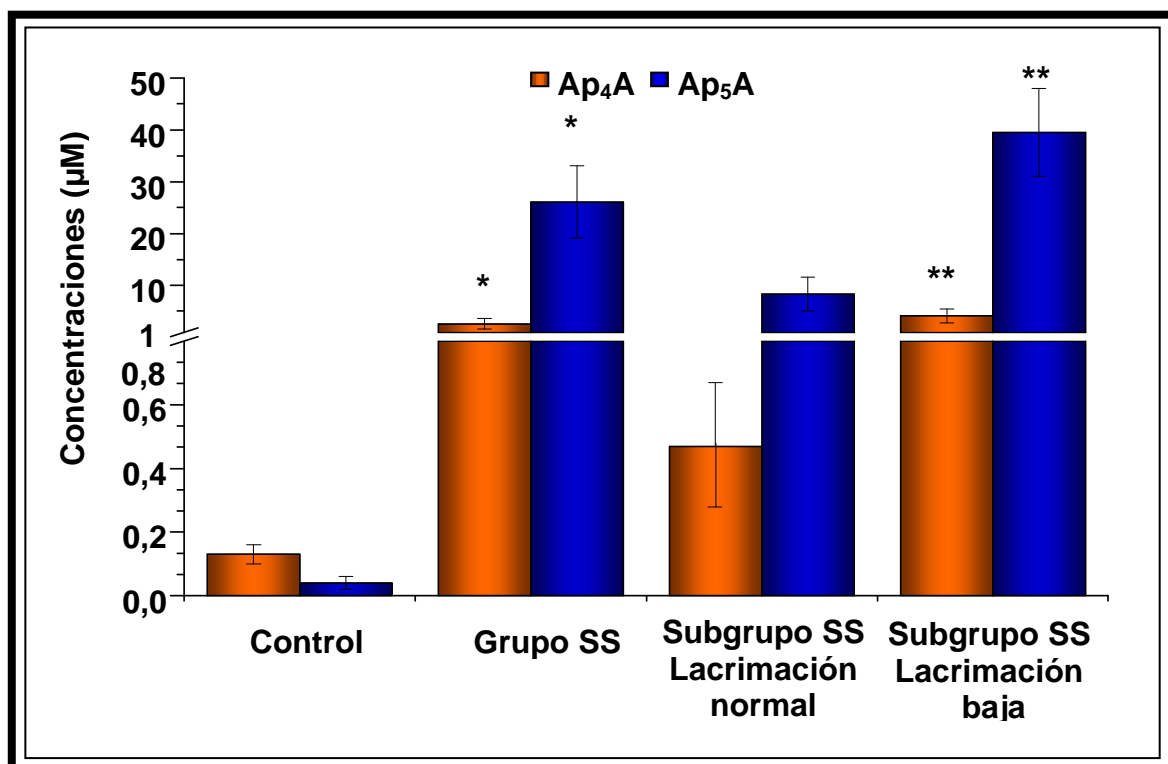


Figura 6.14. Se observa el aumento considerable de las concentraciones de diadenosina polifosfatos en el grupo de pacientes con Síndrome de Sjögren con respecto al grupo control. \*  $p$  valor  $< 0,05$  (t-Student). Al dividir en subgrupos a los pacientes con Síndrome de Sjögren también se observa un aumento significativo en las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$ ; \*\*  $p$  valor  $< 0,01$  (Wilcoxon Mann-Withney U).

Cuando comparamos los dos subgrupos de pacientes con Síndrome de Sjögren nos encontramos una tendencia similar a la de los pacientes sintomáticos de ojo seco estudiados en la segunda fase. Los pacientes con lacrimación baja tienen concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A significativamente mayores que los pacientes de Sjögren con una lacrimación normal. (p valor = 0,032 y p valor = 0,016 para Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A respectivamente).

Dentro del grupo de pacientes con síndrome de Sjögren buscamos la posible relación entre los diadenosin polifosfatos con el Schirmer y la edad. Solo encontramos una correlación alta entre los dos diadenosin estudiados con un p valor < 0,01. Entre el test de Schirmer y el Ap<sub>5</sub>A encontramos una correlación inversa, lo que nos indica que cuanto menor es el volumen lagrimal, mayor concentración de Ap<sub>5</sub>A hay en la lágrima. (Tabla 6.14).

		Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Schirmer	Edad
Ap <sub>4</sub> A	Pearson	1	0,76	-0,43	0,12
	P valor	--	<0,01*	0,11	0,67
Ap <sub>5</sub> A	Pearson	0,76	1	-0,59	0,28
	P valor	p<0,01*	--	0,02**	0,32
Schirmer	Pearson	-0,43	-0,59	1	-0,20
	P valor	0,11	0,02**	--	0,41
Edad	Pearson	0,12	0,28	-0,20	1
	P valor	0,67	0,32	0,41	--

**Tabla 6.14. Correlaciones entre las variables ordinales estudiadas en los pacientes con Síndrome de Sjögren. Se observa correlación directa entre las dos diadenosina\* y una correlación inversa entre el Ap<sub>5</sub>A y el Schirmer\*\*.**

Con el propósito de relacionar la sintomatología que presentan los pacientes con Síndrome de Sjögren y las concentraciones de diadenosina polifosfatos se les realizó el cuestionario de ojo seco DEQ. En la tabla 6.15 se muestra el porcentaje de pacientes de cada grupo que contestó “con frecuencia” o “constantemente” a la pregunta “con qué frecuencia sientes (el síntoma)”.

Síntoma	Grupo Control (n=20)	Síndrome Sjögren		
		Grupo completo (n=12)	Subgrupo lacrimación baja (n= 8)	Subgrupo lacrimación normal (n=4)
<b>Disconfort, No, (%)</b>	3 (15)	12 (100)*	8 (100)	4 (100)
<b>Sequedad, No, (%)</b>	1 (5)	9 (91,63)*	8 (100)	3 (75)
<b>S, arena, No, (%)</b>	0 (0)	6 (50)	5 (62,5)	1 (25)
<b>Ardor, No, (%)</b>	0 (0)	5 (41,66)	4 (50)	1 (25)
<b>Picor, No, (%)</b>	1 (5)	7 (66,64)*	5 (62,5)	3 (75)
<b>Cuerpo extraño, No, (%)</b>	0 (0)	8 (74,97)	5 (62,5)	4 (100)
<b>Irritados, No, (%)</b>	0 (0)	11 (91,63)	7 (87,5)	4 (100)
<b>Sensib, luz, No, (%)</b>	4 (20)	12 (100)*	8 (100)	4 (100)
<b>Borroso, No, (%)</b>	1 (5)	6 (50)*	5 (62,5)	1 (25)

**Tabla 6.15. Porcentaje de pacientes que contestaron “con frecuencia” o “constantemente” a las preguntas relativas a la frecuencia del síntoma. \* p valor < 0,01 grupo SS completo vs. grupo control (X<sup>2</sup> de Pearson).**

El disconfort, la sequedad, los ojos irritados y la sensibilidad a la luz fueron los síntomas más frecuentes en los pacientes con Síndrome de Sjögren y lacrimación baja. En el caso de los pacientes con Sjögren y lacrimación normal, todos relataron padecer con frecuencia o constantemente disconfort, cuerpo extraño, ojos irritados y sensibilidad a la luz.

En los pacientes con Síndrome de Sjögren aumenta la intensidad de la molestia al final del día de los síntomas de disconfort, sequedad, cuerpo extraño, ojos irritados y visión borrosa, siendo estadísticamente significativo en el caso del disconfort, ojos irritados y borrosidad ( $p$  valor  $< 0,05$ ). Si analizamos la intensidad de los síntomas en los subgrupos de Síndrome de Sjögren nos encontramos que en los pacientes con lacrimación baja, 4 de los 8 síntomas mostrados en la gráfica 6.15 aumentan significativamente su intensidad al final del día ( $p$  valor  $< 0,05$ ), en cambio en los paciente con lacrimación normal no existen diferencias estadísticas en ninguno de los síntomas. Tampoco encontramos diferencias estadísticas en el grupo control.

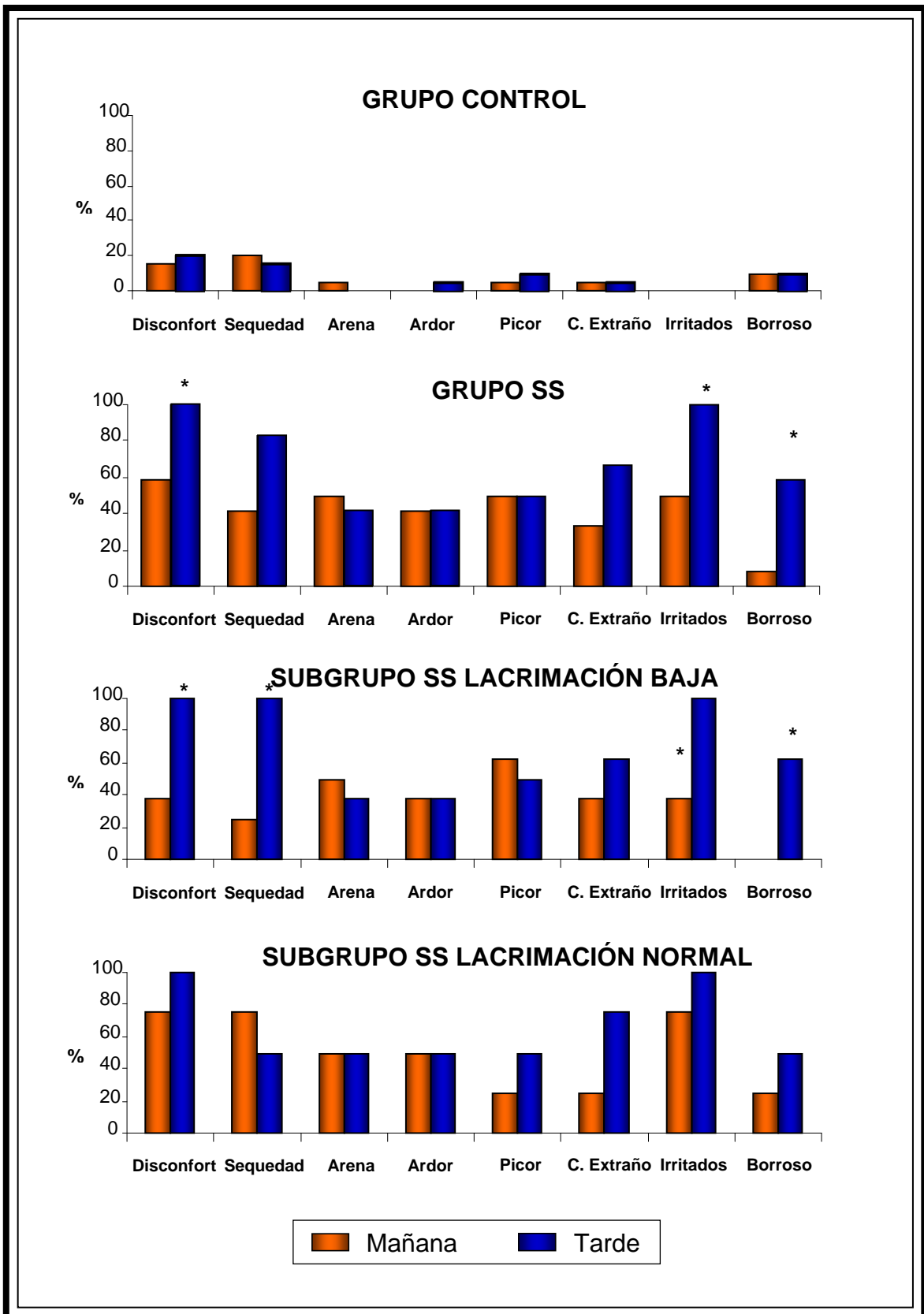


Figura 6.15. Porcentaje de pacientes que consideraban intensa la sensación de los síntomas por la mañana y por la tarde en los diferentes grupos estudiados. \* p valor < 0,05 mañana vs. tarde (test de Wilcoxon).

Para analizar si existen relación entre las concentraciones de diadenosina polifosfatos y la intensidad de los síntomas en pacientes de Síndrome de Sjögren, se calcularon las concentraciones para cada grado de intensidad del síntoma por la mañana y se les aplicó el test estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis. La elección de la intensidad de los síntomas por la mañana se debe a que corresponde con la misma franja horaria en las que se recogió las muestras de lágrima para analizar.

En la tabla 6.16 se puede observar que no hay una relación estadística entre los diadenosina y la intensidad del síntoma. Si se observa una tendencia a concentraciones mayores en las intensidades de grado 3, 4 y 5, que corresponden con altas intensidades del síntoma evaluado.

<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)						
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>P valor K-Wallis</b>
<b>Disconfort</b>	---	1,29 ± 0,76	4,17 ± 2,13	---	3,48 ± 3,48	0,558
<b>Sequedad</b>	---	1,29 ± 0,76	3,48 ± 1,87	---	3,48 ± 3,48	0,878
<b>Arena</b>	1,29 ± 0,86	1,75 ± 1,00	7,76 ± 3,96	2,32 ± 2,32	---	0,395
<b>Ardor</b>	---	---	2,57 ± 2,14	1,59 ± 0,96	2,32 ± 2,32	0,253
<b>Picor</b>	1,98 ± 1,13	---	---	3,94 ± 1,64	---	0,399
<b>Cuerpo Extraño</b>	---	0,64 ± 0,51	---	3,25 ± 3,48	3,48 ± 3,48	0,597
<b>Irritados</b>	---	---	1,75 ± 1,00	3,01 ± 1,84	3,48 ± 3,48	0,923
<b>Borrosidad</b>	---	1,93 ± 1,01	---	3,97 ± 1,66	---	0,469
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)						
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>P valor K-Wallis</b>
<b>Disconfort</b>	---	24,48 ± 8,23	22,08 ± 10,68	---	42,67 ± 37,01	0,583
<b>Sequedad</b>	---	24,47 ± 8,23	18,29 ± 9,1	---	42,53 ± 21,36	0,434
<b>Arena</b>	21,28 ± 10,99	26,38 ± 7,52	---	29,49 ± 25,1	---	0,396
<b>Ardor</b>	---	31,85 ± 5,76	35,96 ± 25,35	11,56 ± 3,06	29,34 ± 25,18	0,376
<b>Picor</b>	13,66 ± 2,87	---	18,66 ± 8,36	35,5 ± 13,5	---	0,666
<b>Cuerpo Extraño</b>	---	23,43 ± 6,31	---	23,34 ± 8,98	42,67 ± 37,01	0,750
<b>Irritados</b>	---	---	28,64 ± 6,75	16,01 ± 9,49	42,67 ± 37,01	0,249
<b>Borrosidad</b>	---	23,38 ± 12,86	---	29,02 ± 2,44	26,65 ± 4,30	0,499

**Tabla 6.16. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en µM en función de la intensidad de los síntomas. A algunas intensidades de los síntomas no se muestran concentraciones ya que no hubo ningún paciente que relatara dicha intensidad.**

### **6.3.1.2. Aniridia Congénita.**

Debido a la degeneración del epitelio corneal y al ojo seco que padecen los pacientes de Aniridia congénita, se decidió estudiar las concentraciones de los diadenosin polifosfatos en esta patología.

Los pacientes con Aniridia congénita se dividieron en tres grupos en función de la edad, menores de 15 años (n= 7), entre 15 y 40 años (n=4) y mayores de 40 años (n=4). Esta división por edades se debe a que las patologías de la superficie ocular asociadas a la Aniridia, se agravan con la edad, lo cual nos hace pensar en una posible evolución con los años en las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$ , ya sea por el ojo seco o por la pobre reepitelización corneal, en los pacientes de Aniridia congénita. El grupo control se dividió también en función de la edad quedando 11 voluntarios menores de 15 años, 19 entre 15 y 40 años y 10 voluntarios mayores de 40 años.

Tanto en los pacientes con Aniridia congénita como los voluntarios del grupo control, los valores del test de McMonnies aumentan con la edad en una proporción muy similar, teniendo en los mayores de 40 años, en ambos grupos, ojo seco marginal según los criterios de este test.

Los pacientes de Aniridia congénita presentan valores en el test de Schirmer ligeramente inferiores a los del grupo control, tanto en los grupos totales como en la división por edades, sin haber diferencias estadísticas en ninguno de ellos.

Edades				
	Total	menores 15 años	Entre 15 y 40 años	Más de 40 años
<b>Control</b> (media $\pm$ SEM)	29,02 $\pm$ 1,30	11,54 $\pm$ 0,93	30,60 $\pm$ 0,69	47,44 $\pm$ 6,55
<b>Aniridia congénita</b> (media $\pm$ SEM)	25,25 $\pm$ 3,35	10,18 $\pm$ 0,75	28,67 $\pm$ 4,03	46,00 $\pm$ 1,25

Test de McMonnies				
	Total	menores 15 años	Entre 15 y 40 años	Más de 40 años
<b>Control</b> (media $\pm$ SEM)	8,30 $\pm$ 0,86	3,51 $\pm$ 2,12	8,25 $\pm$ 0,91	12,08 $\pm$ 1,83
<b>Aniridia congénita</b> (media $\pm$ SEM)	6,86 $\pm$ 1,52	3,43 $\pm$ 1,23	7,25 $\pm$ 3,77	12,50 $\pm$ 1,85

Tabla 6.17. Edades medias de los grupos estudiados con Aniridia congénita, así como los valores obtenidos con el test de McMonnies.

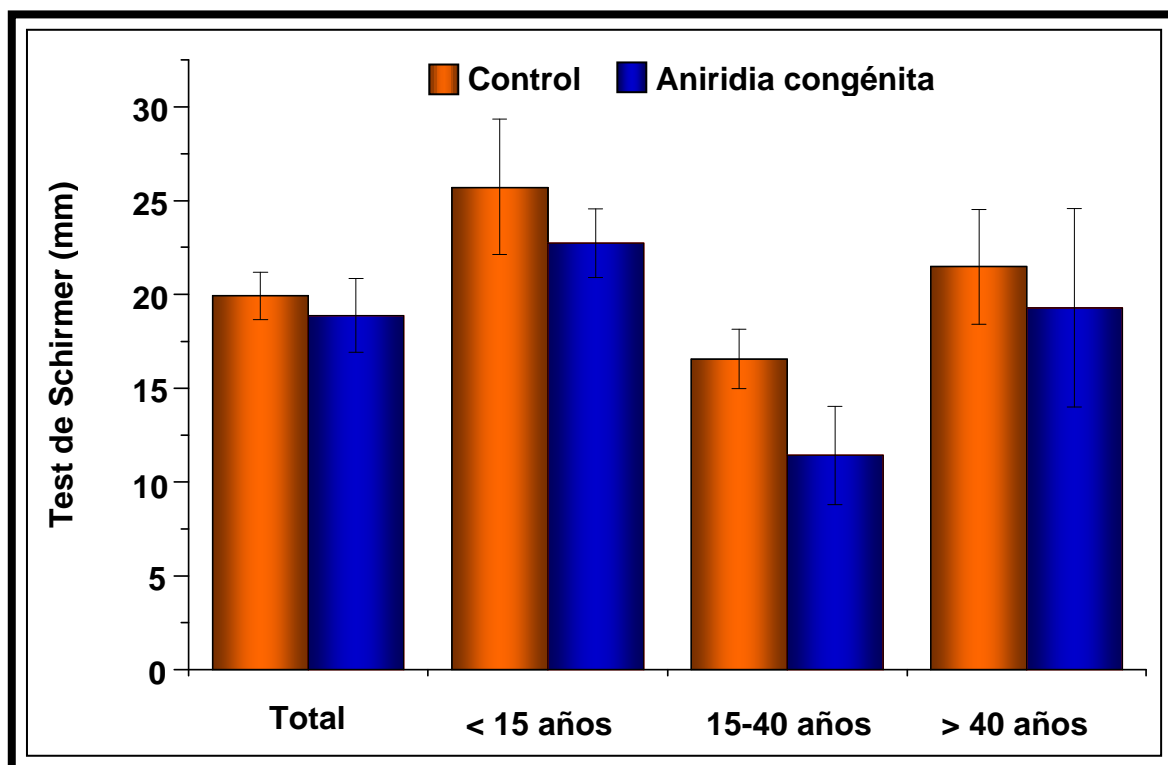


Figura 6.16. Representación de los valores del test Schirmer expresado en mm. No existen diferencias significativas entre los grupos comparados.

<b>Test de Schirmer (mm)</b>				
	<b>Total</b>	<b>menores 15 años</b>	<b>Entre 15 y 40 años</b>	<b>Más de 40 años</b>
<b>Control (media ± SEM)</b>	19,93 ± 1,26	25,72 ± 3,61	16,56 ± 1,60	21,47 ± 3,06
<b>Aniridia congénita (media ± SEM)</b>	18,89 ± 1,96	22,73 ± 1,83	11,42 ± 2,63	19,29 ± 5,30

**Tabla 6.18 Valores obtenidos de la secreción lagrimal con el test de Schirmer en los pacientes con Aniridia congénita y en el grupo control.**

Cuando analizamos las muestras de lágrima de los pacientes de Aniridia congénita en el HPLC, encontramos que los pacientes de Aniridia tienen concentraciones de Ap<sub>4</sub>A muy elevadas, que aumentan con la edad de los pacientes (p valor = 0,038; ANOVA). Al comparar las concentraciones entre los pacientes con Aniridia congénita con los del grupo control encontramos diferencias estadísticamente significativas para todas las edades (p valor < 0,01; Wilcoxon Mann-Whitney U), como en los grupos totales (p valor < 0,01; t-Student). Figura 6.16.

El Ap<sub>5</sub>A no presenta un aumento en su concentración tan marcado pero mantiene un incremento según la edad estadísticamente significativo (p valor = 0.003; ANOVA). Al comparar con el grupo control encontramos diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos menos en los pacientes menores de 15 años. Figura 6.17.

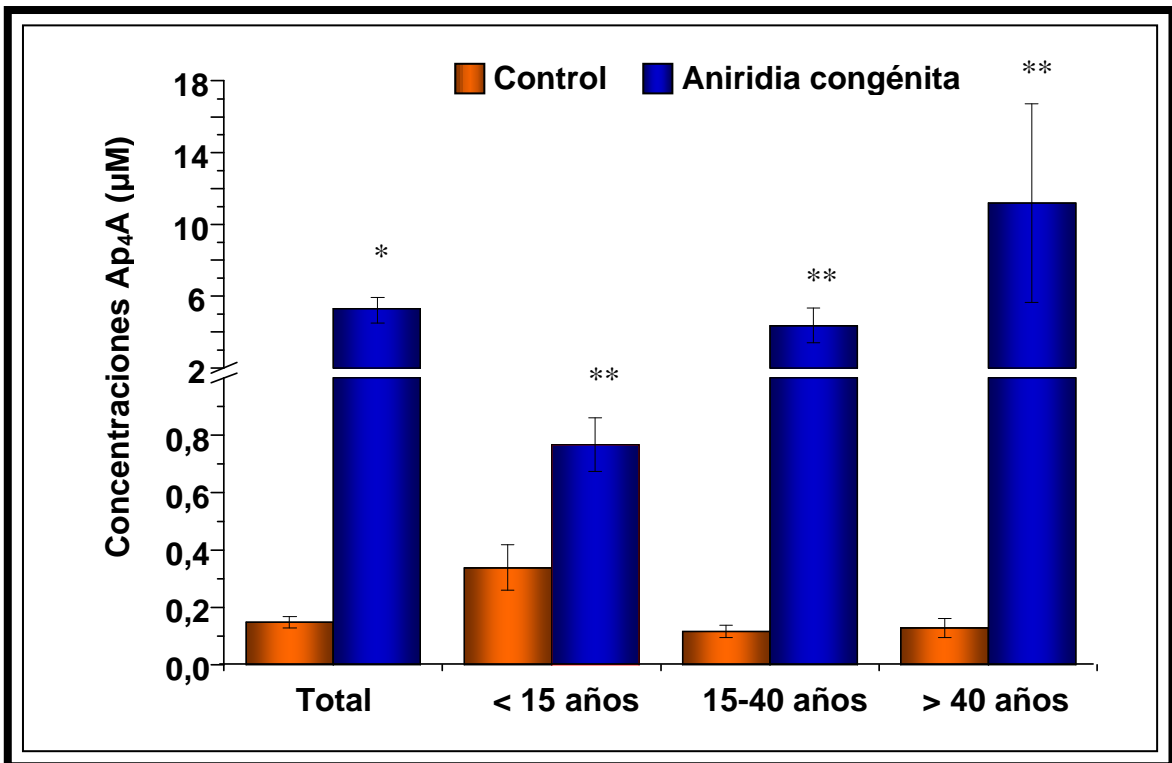


Figura 6.17. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A expresadas en µM en función de la edad de los pacientes. \* p valor < 0,01 (t-Student). \*\* p valor < 0,01 (Wilcoxon Mann-Whitney U).

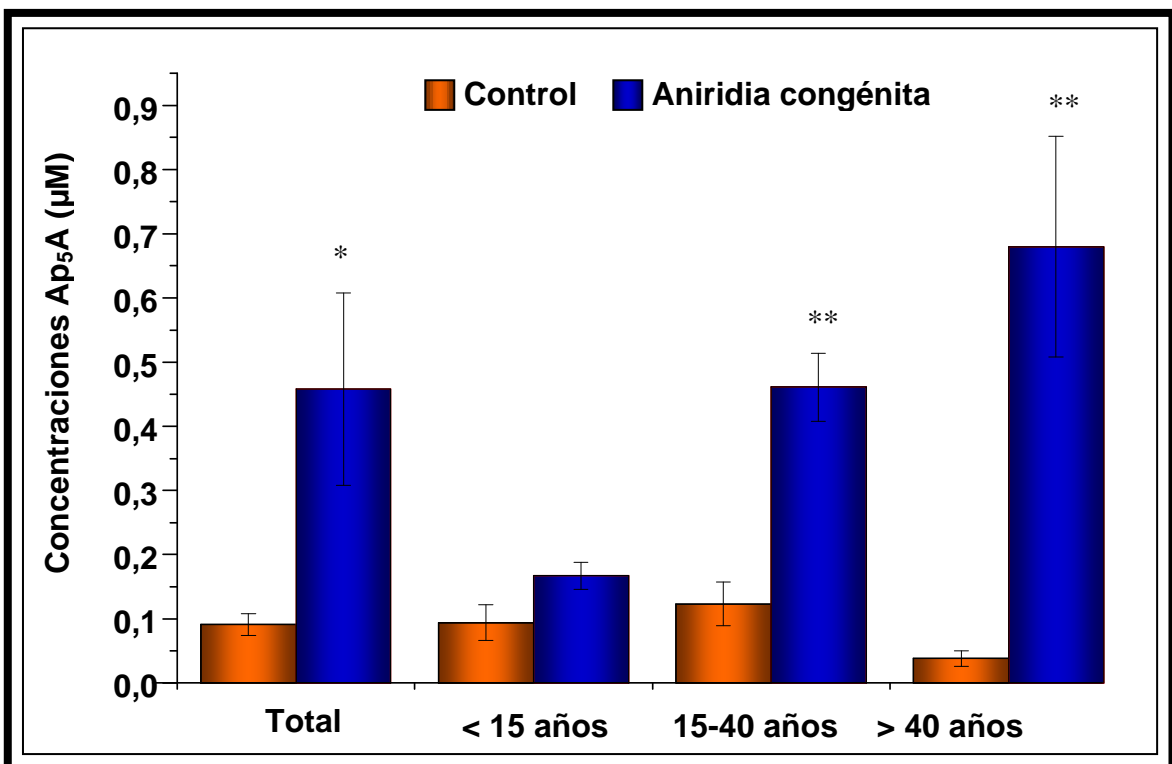


Figura 6.18. Concentraciones de Ap<sub>5</sub>A expresadas en µM en función de la edad de los pacientes. \* p valor < 0,01 (t-student). \*\* p valor < 0,01 (Wilcoxon Mann-Whitney U).

		Control			
		Total	< 15 años	15-40 años	> 40 años
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	0,149 ± 0,021	0,339 ± 0,080	0,117 ± 0,022	0,129 ± 0,033	
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,091 ± 0,017	0,094 ± 0,028	0,123 ± 0,034	0,038 ± 0,012	
		Aniridia congénita			
		Total	< 15 años	15-40 años	> 40 años
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	5,286 ± 0,774*	0,767 ± 0,094*	4,369 ± 0,966*	11,177 ± 5,533*	
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,458 ± 0,038**	0,167 ± 0,021	0,461 ± 0,053**	0,680 ± 0,172**	

Tabla 6.19. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en µM en función de la edad de los pacientes. Se encuentran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo total de los pacientes de Aniridia (t-Student) y también al comparar por grupos de edad, excepto en las concentraciones de Ap<sub>5</sub>A en los menores de 15 años (Wilcoxon Mann-Whitney U).\* comparativa para el Ap<sub>4</sub>A; \*\* comparativa para el Ap<sub>5</sub>A.

En la tabla 6.20 se muestran las correlaciones entre las variables ordinales dentro del grupo de Aniridia. El Ap<sub>4</sub>A tiene una correlación directa muy elevada con el Ap<sub>5</sub>A y una correlación inversa moderada con el test de Schirmer. El Ap<sub>5</sub>A tiene una correlación inversa moderada con el test de Schirmer, al igual que la otra diadenosina estudiada, pero también encontramos una correlación directa moderada con el test de McMonnies.

		Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	McMonnies	Schirmer
Ap <sub>4</sub> A	Pearson	1	0,929	0,276	-0,580
	P valor	--	<0,001*	0,192	0,003*
Ap <sub>5</sub> A	Pearson	0,929	1	0,459	-0,592
	P valor	p<0,01*	--	0,02*	0,002*
McMonnies	Pearson	0,276	0,459	1	-0,06
	P valor	0,192	0,02*	--	0,978
Schirmer	Pearson	-0,580	-0,592	-0,06	1
	P valor	0,003*	0,002*	0,978	--

Tabla 6.20. Correlaciones entre las variables ordinales estudiadas en los pacientes con Aniridia congénita. \* p valor <0,05.

### 6.3.1.3. Queratocono.

Debido a que los pacientes con queratocono tienen cierta predisposición a frotarse vigorosamente los ojos y a que poseen córneas más curvas, tienen un mayor rozamiento en la zona del ápex con en el parpadeo (Weed, MacEwen et al. 2008), se evaluó las concentraciones de diadenosina polifosfatos para verificar sin parpadeo forzado, el mecanismo de liberación de estos dinucleótidos estudiado en la segunda fase de este trabajo.

Se estudiaron las concentraciones de diadenosina polifosfatos y otros parámetros relacionados con el ojo seco comparándolo con un grupo control con voluntarios no diagnosticados de queratocono.

Los pacientes con queratocono presentaban, sin ser estadísticamente significativo un tiempo de rotura lagrimal mayor y un volumen lagrimal menor que los voluntarios del grupo control. En cambio en el test de McMonnies si existen diferencias significativas ( $p=0,009$ ) Tabla 6.21 A.

El grupo de pacientes con queratocono se dividió en pacientes que contestaron afirmativamente a la pregunta “¿Siente actualmente la necesidad de frotarse intensamente los ojos?” y pacientes que contestaron negativamente. Esta división se realiza para verificar si en estos pacientes un estímulo mecánico como sería el frotamiento hace aumentar la concentración de diadenosina polifosfatos en la lágrima. 9 de los pacientes formaron el grupo de SI frotamiento, y 7 el grupo de NO frotamiento. También se distribuyeron en función del porte de lente permeable al gas (RPG) o al uso de gafas como corrección habitual, siendo 7 de ellos portadores de lentes RPG y 9 usuarios de gafas.

Al evaluar los resultados al dividir el grupo por la necesidad de frotamiento el volumen lagrimal, al igual que el tiempo de rotura lagrimal, fueron más elevados en los pacientes que han tenido la necesidad de frotarse los ojos aunque no son diferencias estadísticamente significativas, pero si encontramos diferencias significativas en los valores del test de McMonnies ( $p$  valor = 0,045). Tabla 6.21 B.

Si comparamos entre los pacientes usuarios de lentes RPG y usuarios de gafas obtenemos resultados similares, con mayor volumen lagrimal y TBUT en los usuarios de gafas pero sin ser significativo. En cambio en el test de McMonnies si existen diferencias estadísticamente significativas ( $p$  valor = 0,047). Tabla 6.21 C. Todos estos resultados se representan en la figura 6.19.

Totales		A
	Control	Queratocono
Schirmer (media $\pm$ SEM)	19,61 $\pm$ 1,71	16,13 $\pm$ 1,96
TBUT (media $\pm$ SEM)	5,00 $\pm$ 0,39	6,56 $\pm$ 0,69
Tinciones (media $\pm$ SEM)	0,82 $\pm$ 0,12	0,81 $\pm$ 0,09
McMonnies (media $\pm$ SEM)	7,00 $\pm$ 0,90	10,87 $\pm$ 1,01*
Frotamiento		B
	SI	NO
Schirmer (media $\pm$ SEM)	14,12 $\pm$ 2,50	18,42 $\pm$ 3,08
TBUT (media $\pm$ SEM)	5,94 $\pm$ 0,46	7,35 $\pm$ 1,48
Tinciones (media $\pm$ SEM)	0,83 $\pm$ 0,12	0,76 $\pm$ 0,12
McMonnies (media $\pm$ SEM)	12,33 $\pm$ 1,08	9,00 $\pm$ 1,01*
Tipo de corrección		C
	Gafas	Lentes RPG
Schirmer (media $\pm$ SEM)	20,00 $\pm$ 3,94	13,28 $\pm$ 2,63
TBUT (media $\pm$ SEM)	8,00 $\pm$ 1,71	5,79 $\pm$ 0,39
Tinciones (media $\pm$ SEM)	0,75 $\pm$ 0,13	0,78 $\pm$ 0,11
McMonnies (media $\pm$ SEM)	7,83 $\pm$ 1,64	12,28 $\pm$ 1,28*

Tabla 6.21. Valores del test de Schirmer, expresado en mm, del TBUT expresado en segundos, el grado de tinción corneal y la puntuación en el test de McMonnies. \* p valor <0,05 (t-Student).

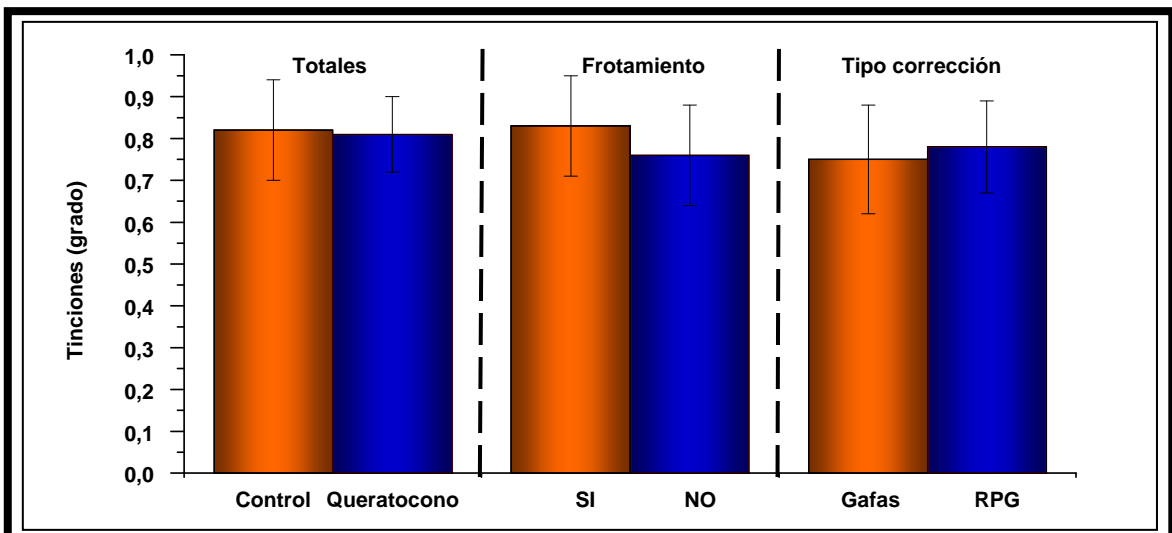
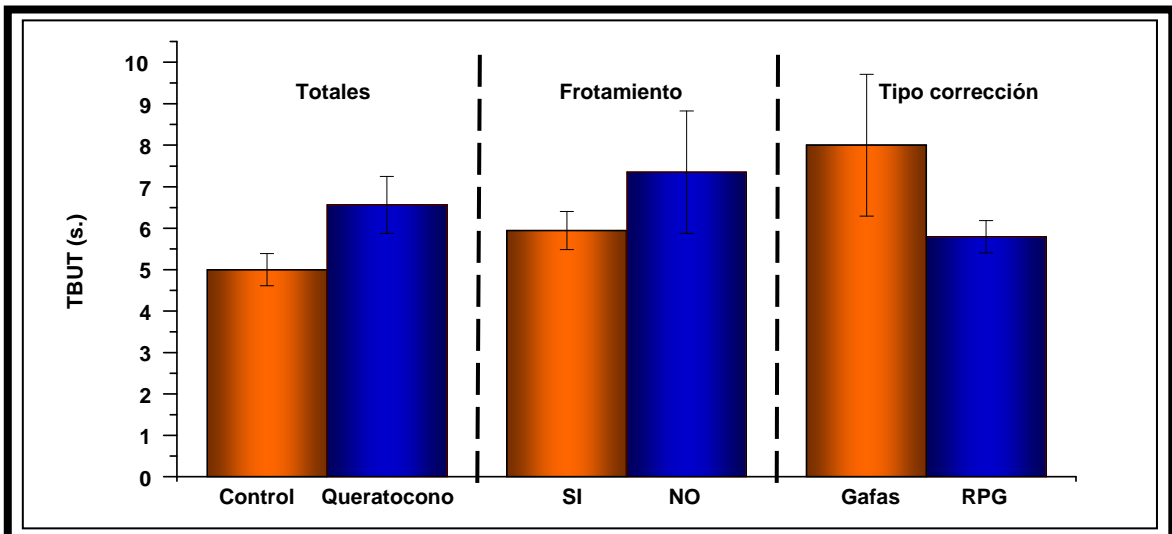
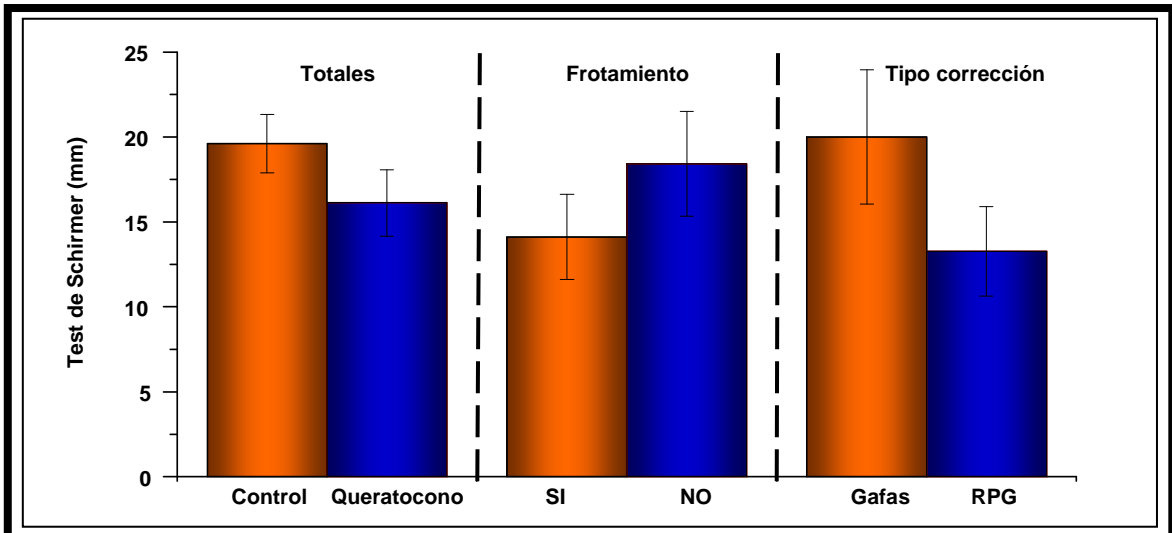


Figura 6.19. Representación gráfica del test de Schirmer, TBUT y tinciones comparando grupo control con el grupo de queratocono y las dos divisiones realizadas en el grupo de queratocono, según la necesidad de frotamiento de ojos y la corrección habitual lentes RPG o gafas.

Cuando evaluamos las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en los pacientes con queratocono nos encontramos con un aumento estadísticamente significativo en ambos diadenosin polifosfato con un p valor= 0,019 para el Ap<sub>4</sub>A y de 0,024 para el Ap<sub>5</sub>A (t-Student). Los valores y su representación están en la tabla 6.22 y figura 6.20.

Totales		
	Control	Queratocono
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	0,185 ± 0,043	0,507 ± 0,115*
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,045 ± 0,009	0,132 ± 0,033**

Tabla 6.22. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en μM. Se encuentran diferencias significativas entre el grupo control y el grupo total de los pacientes con queratocono \*,\*\* p valor < 0,05 (t-Student).

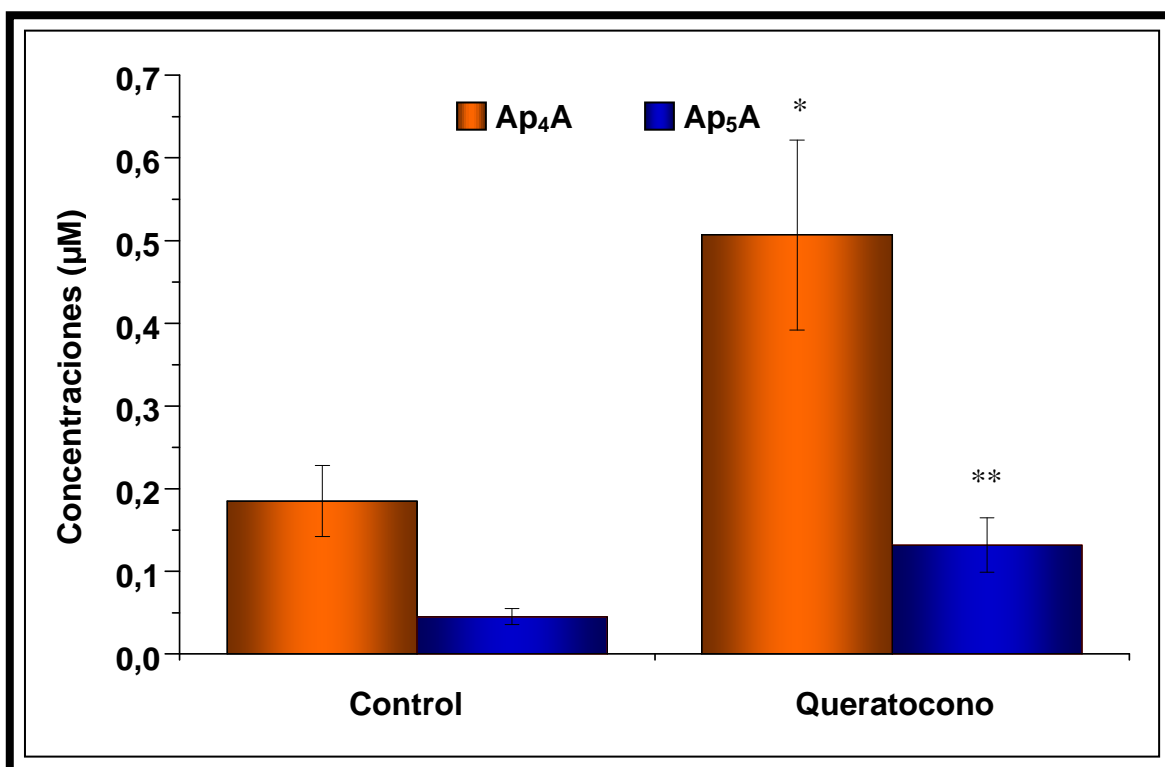


Figura 6.20. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A de pacientes con queratocono.\* p valor < 0,05. (t-Student).

Si comparamos las concentraciones de diadenosina polifosfatos al dividir el grupo de pacientes con queratocono entre los que sentían la necesidad de frotarse intensamente los ojos y los que no, encontramos un ligero aumento de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en los que si se frotaban respecto a los que no. Este aumento no es estadísticamente significativo con un p valor de 0,786 para el Ap<sub>4</sub>A y de 0,467 en el caso del Ap<sub>5</sub>A (t-Student). Los valores y su representación están en la tabla 6.23 y figura 6.21.

	Frotamiento	
	SI	NO
<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	0,535 ± 0,193	0,472 ± 0,114
<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	0,158 ± 0,054	0,106 ± 0,037

Tabla 6.23. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en μM. No se encuentran diferencias significativas entre los pacientes que se frotan intensamente los ojos y los que no se frotan los ojos.

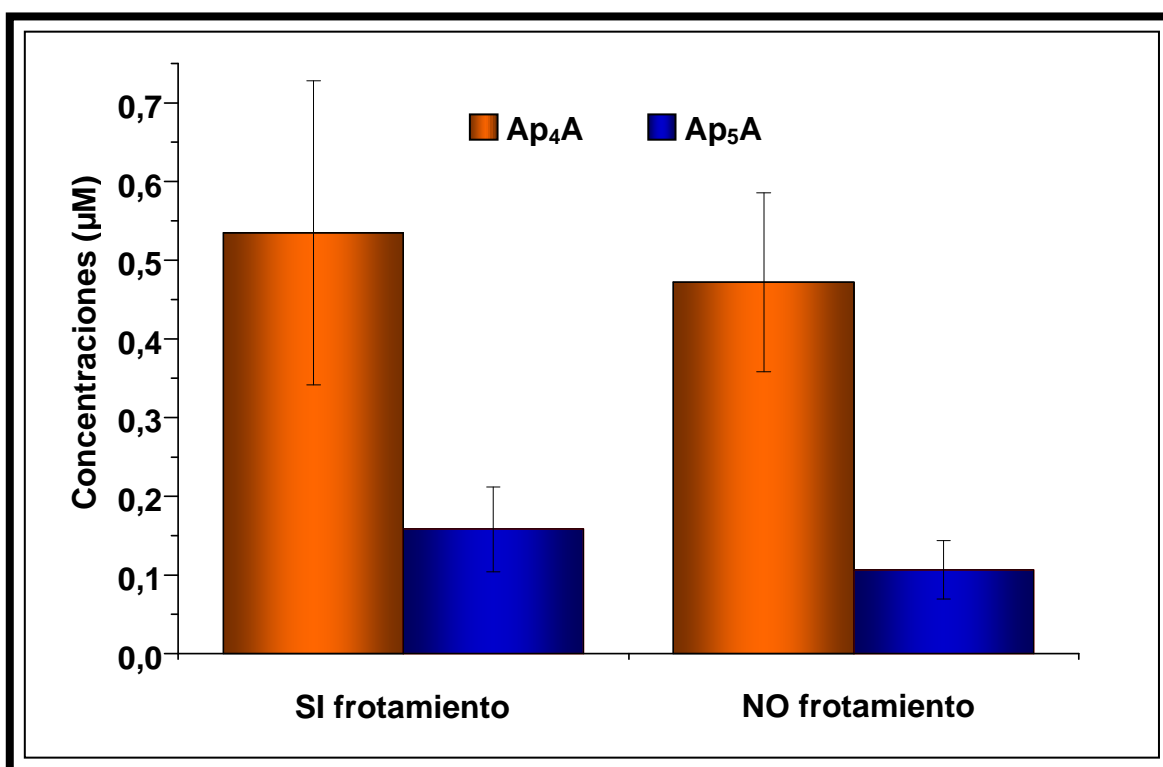
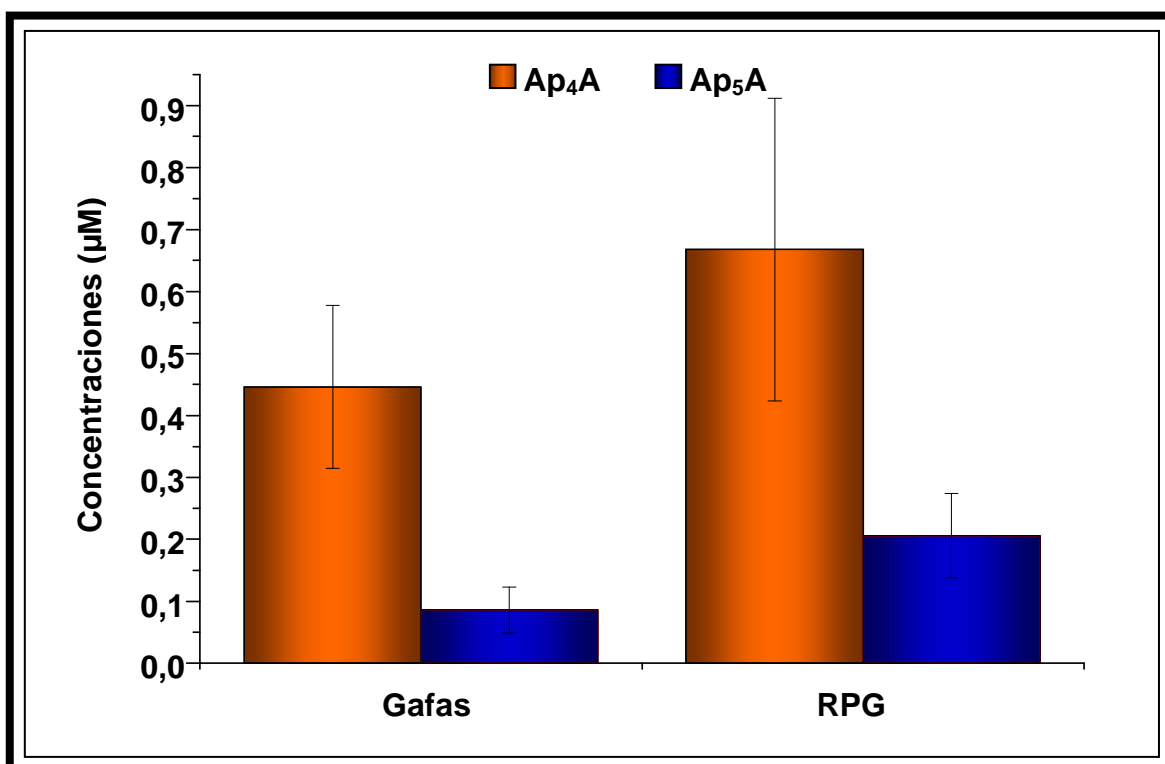


Figura 6.21. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función de si el paciente sentía o no la necesidad actualmente de frotarse intensamente los ojos.

Entre los usuarios de lentes RPG y gafas tampoco existen diferencias estadísticamente significativas (p valor = 0,409 para Ap<sub>4</sub>A y p valor = 0,121 para Ap<sub>5</sub>A; t-Student)) aunque se observa en la gráfica 6.22 un aumento en ambas diadenosina polifosfatos en los usuarios de lentes RPG.

Tipo de corrección		
	Gafas	Lentes RPG
Ap <sub>4</sub> A (media ± SEM)	0,446 ± 0,132	0,668 ± 0,244
Ap <sub>5</sub> A (media ± SEM)	0,086 ± 0,037	0,206 ± 0,068

**Tabla 6.24. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A expresadas en μM. No se encuentran diferencias significativas entre los pacientes que utilizan como corrección habitual las lentes RPG y las gafas.**



**Figura 6.22. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función del tipo de corrección habitual que usa el paciente.**

En los pacientes con queratocono no encontramos correlación entre Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A, pero si existe una correlación inversa moderada entre ambas diadenosina y el test de Schirmer. También se observar una correlación indirecta baja, pero significativa, entre el TBUT y la puntuación en el test de McMonnies y una correlación directa moderada entre el test de Schirmer y el TBUT. Tabla 6.25.

		Ap <sub>4</sub> A	Ap <sub>5</sub> A	Schirmer	TBUT	McMonnies
Ap <sub>4</sub> A	<b>Pearson</b>	1	0,355	-0,629	-0,209	-0,221
	<b>P valor</b>	--	0,114	0,002*	0,351	0,323
Ap <sub>5</sub> A	<b>Pearson</b>	0,355	1	-0,695	-0,281	0,088
	<b>P valor</b>	0,114	--	<0,001*	0,205	0,696
Schirmer	<b>Pearson</b>	-0,629	-0,695	1	0,452	-0,229
	<b>P valor</b>	0,002*	<0,001*	--	0,012	0,223
TBUT	<b>Pearson</b>	-0,209	-0,281	0,452	1	-0,371
	<b>P valor</b>	0,351	0,205	0,012*	--	0,037*
McMonnies	<b>Pearson</b>	-0,221	0,088	-0,229	-0,371	1
	<b>P valor</b>	0,323	0,696	0,223	0,037*	--

Tabla 6.25. Correlaciones entre las variables ordinales estudiadas en los pacientes con queratocono. \* p valor <0,05.

### **6.3.2. Evaluación de los diadenosin polifosfatos en pacientes de cirugía refractiva.**

Para evaluar la influencia de la cirugía refractiva en las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$ , se seleccionaron pacientes que fueran intervenidos con tres técnicas quirúrgicas que fueran diferentes en su procedimiento, LASIK, PRK e ICL.

#### **6.3.2.1. LASIK.**

Los pacientes operados con LASIK presentaron una reducción del volumen lagrimal desde el día siguiente de la cirugía, siendo estadísticamente significativa a partir de las dos semanas, con una reducción del 30% ( $p$  valor  $< 0,001$ ; t-Student muestras pareadas). A los tres meses la reducción aún es significativa, aproximadamente del 20% respecto a los valores obtenidos en el preoperatorio. Gráfica 6.23 A.

El TBUT aumenta ligeramente al día siguiente ( $p=0.04$ ; t-Student muestras pareadas) pero a las 2 semanas ya no hay diferencias significativas con el pre-operatorio. A partir del día siguiente desciende el tiempo de rotura, llegando a presentar valores por debajo del preoperatorio a los 3 meses aunque no es estadísticamente significativo. Gráfica 6.23 B.

Las tinciones aumentan significativamente durante las dos primeras semanas ( $p$  valor  $< 0,05$ ; t-Student muestras pareadas), volviendo a valores preoperatorios al mes de la intervención. Gráfica 6.23 C

Estos resultados se muestran en la tabla 6.26.

	Pre-	1 día	2 semanas	1 mes	3 meses
<b>Schirmer</b> (media $\pm$ SEM)	19,45 $\pm$ 1,46	17,76 $\pm$ 1,61	13,58 $\pm$ 1,26	16,13 $\pm$ 1,67	15,78 $\pm$ 1,36
<b>P valor</b>	---	0,358	< 0,001*	0,009*	0,006*
<b>TBUT</b> (media $\pm$ SEM)	12,00 $\pm$ 1,19	14,79 $\pm$ 1,35	13,51 $\pm$ 1,36	12,58 $\pm$ 0,87	10,87 $\pm$ 0,91
<b>P valor</b>	---	0,04*	0,147	0,430	0,401
<b>Tinciones</b> (media $\pm$ SEM)	0,52 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,11	0,99 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,09	0,59 $\pm$ 0,13
<b>P valor</b>	---	0,032*	0,002*	0,293	0,771

**Tabla 6.26. Medias obtenidas en cada visita obtenidas con el test de Schirmer (expresadas en mm), del TBUT (expresadas en segundos) y del grado de tinción corneal. \* p valor <0,05 respecto a la visita preoperatoria. (t- Student muestras pareadas).**

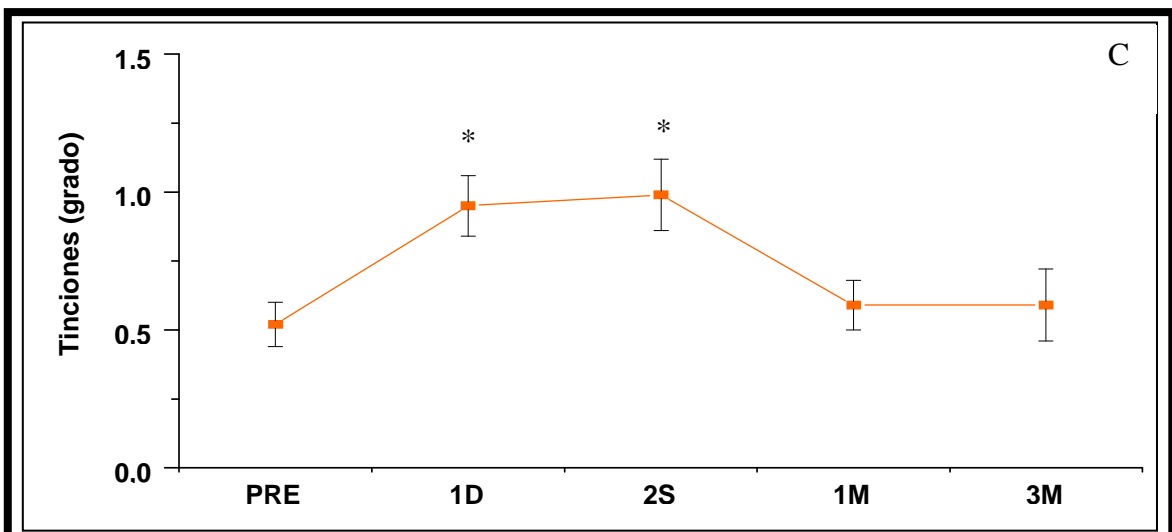
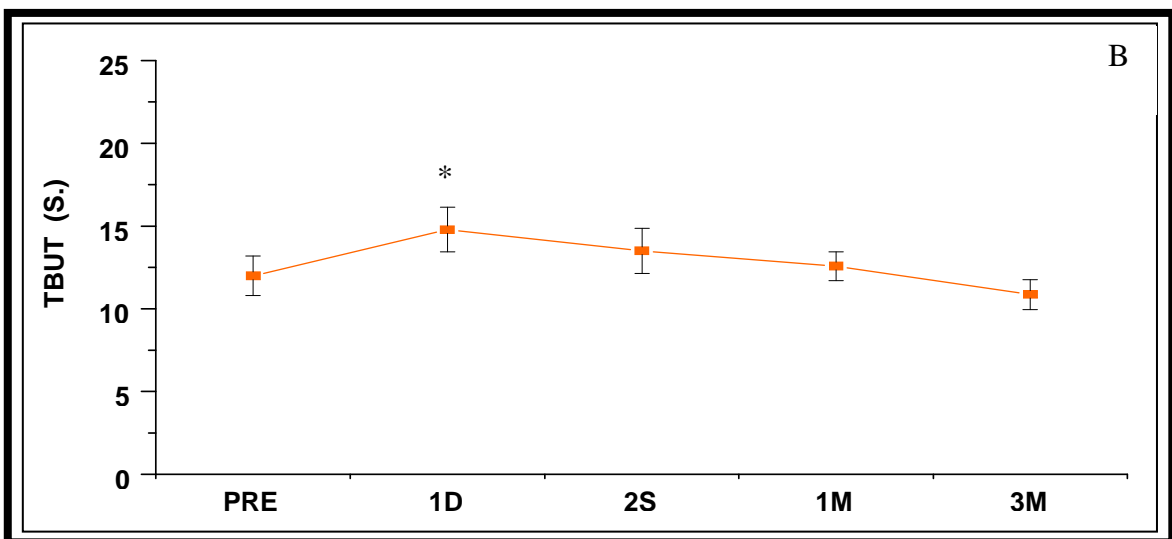
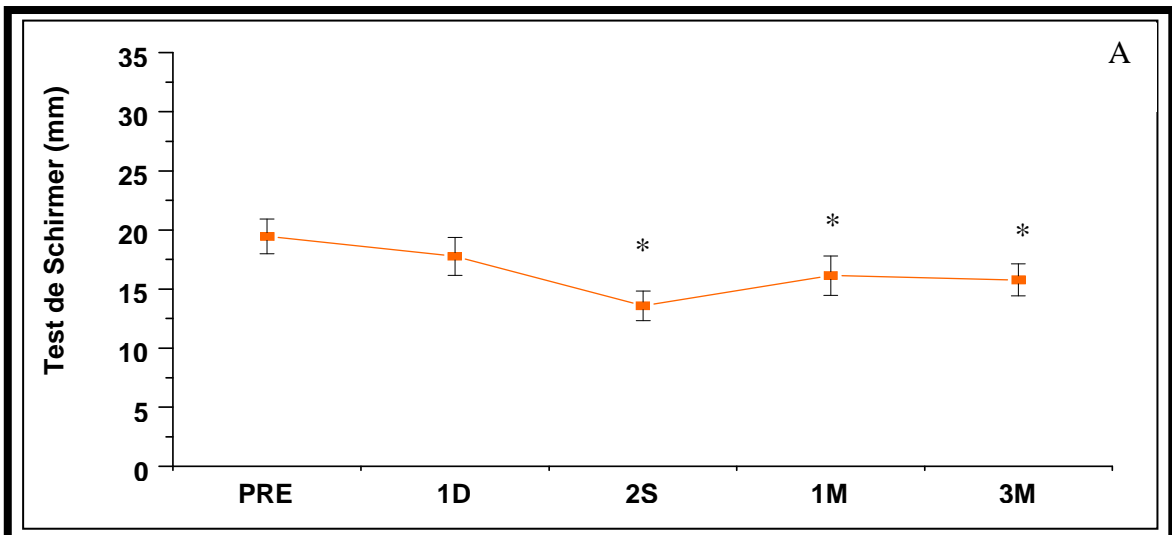


Figura 6.23. Se muestran los valores obtenidos con el test de Schirmer (A), el tiempo de rotura lagrimal (B) y el grado de las tinciones corneales (C) en las diferentes visitas de los pacientes pre y post operatorias. \* p valor < 0,05 respecto a visita preoperatoria. (t- Student muestras pareadas).

El Ap<sub>4</sub>A aumenta su concentración significativamente en la lágrima en los pacientes operados con LASIK al día siguiente de la intervención, siendo 5 veces mayor que en el pre-operatorio. Al mes sigue siendo estadísticamente significativo el aumento de la concentración de Ap<sub>4</sub>A (p=0.005; t-Student muestras pareadas).

En cuanto al Ap<sub>5</sub>A, presenta una línea descendente en su concentración desde el día siguiente de la cirugía, siendo estadísticamente significativa la diferencia con el preoperatorio a las dos semanas (p valor = 0,01; t-Student muestras pareadas). Al mes y a los 3 meses no se detectó Ap<sub>5</sub>A en la lágrima. Se muestran los resultados en la tabla 6.27 y en la figura 6.24.

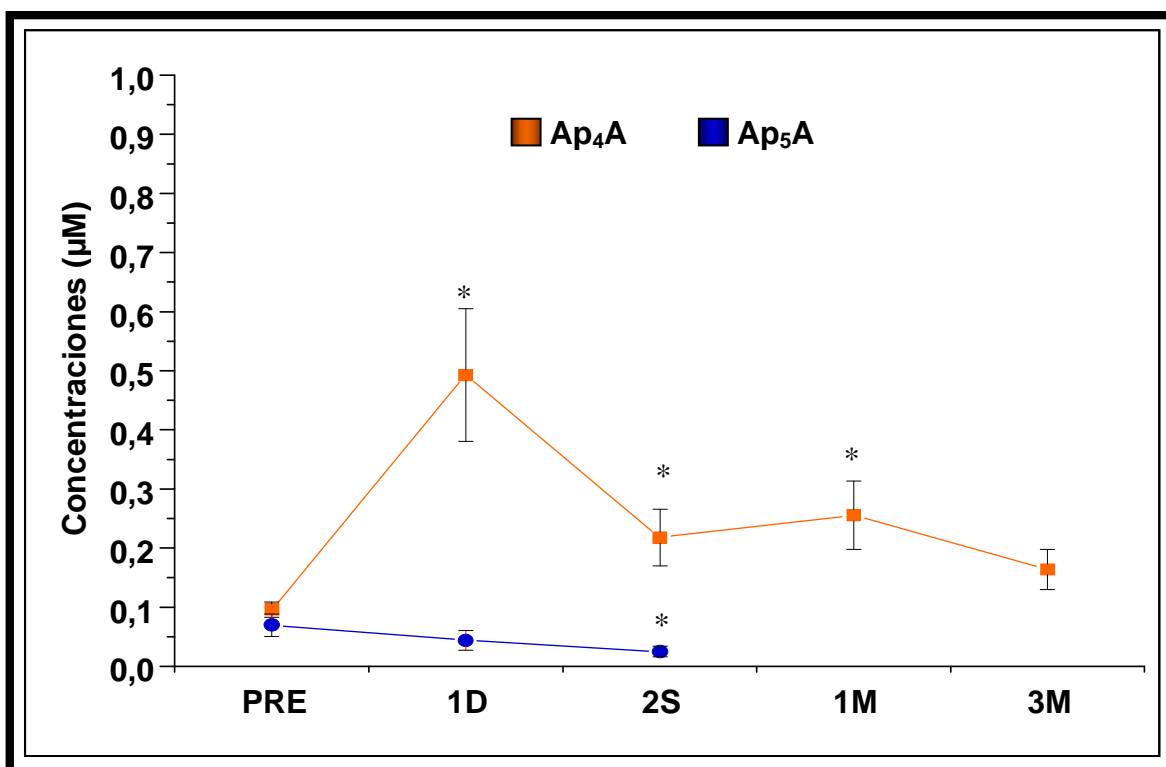


Figura 6.24. Evolución de las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A durante tres meses en pacientes sometidos a cirugía LASIK. \* p valor < 0,05 respecto a visita preoperatoria. (t-Student muestras pareadas).

	<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media ± SEM)	<b>P valor</b>	<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media ± SEM)	<b>P valor</b>
<b>Pre-</b>	0,096 ± 0,013	---	0,070 ± 0,019	---
<b>1 día</b>	0,493 ± 0,112	0,003*	0,044 ± 0,118	0,913
<b>2 semanas</b>	0,218 ± 0,048	0,006*	0,025 ± 0,063	0,01*
<b>1 mes</b>	0,256 ± 0,058	0,005*	--- ± ---	---
<b>3 meses</b>	0,164 ± 0,034	0,232	--- ± ---	---

**Tabla 6.27. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A, expresadas en μM. Al mes y lo tres meses no se detectó Ap<sub>5</sub>A.\* p valor <0,05 respecto a visita preoperatoria. (t-Student muestras pareadas).**

Todos los pacientes rellenaron en cada visita un cuestionario de sintomatología (DEQ) en el que se les preguntaba por la frecuencia e intensidad de diversos síntomas. En la tabla 6.28 se muestran los porcentajes de pacientes que se consideraron que padecían el síntoma. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la visita preoperatoria y el resto de visitas postoperatorias. Algunos síntomas, como el discomfort, la sequedad o los ojos irritados están menos presente después de la cirugía, incluso al día siguiente de la intervención.

En cambio, otros síntomas como la sensación de arena y la sensación de cuerpo extraño son relatados por más pacientes al día siguiente que en la visita preoperatoria. La sensibilidad a la luz y la borrosidad son los síntomas, que después de la cirugía, se presentan en más pacientes.

Síntoma	Pre-	1 día	2 semanas	1 mes	3 meses
Discomfort, No, (%)	12 (26,08)	6 (13,04)	4 (8,69)	3 (6,52)	0 (0)
Sequedad, No, (%)	10 (21,74)	6 (13,04)	6 (13,04)	1 (2,17)	1 (2,17)
S, arena, No, (%)	2 (4,35)	7 (15,22)	1 (2,17)	0 (0)	0 (0)
Ardor, No, (%)	1 (2,17)	1 (2,17)	0 (0)	1 (2,17)	2 (4,35)
Picor, No, (%)	5 (10,87)	3 (6,52)	1 (2,17)	1 (2,17)	1 (2,17)
Cuerpo extraño, No, (%)	3 (6,52)	8 (17,39)	1 (2,17)	0 (0)	0 (0)
Irritados, No, (%)	6 (13,04)	5 (10,87)	2 (4,35)	0 (0)	1 (2,17)
Sensib, luz, No, (%)	6 (13,04)	13 (28,26)	7 (15,22)	4 (8,69)	2 (4,35)
Borroso, No, (%)	6 (13,04)	12(26,08)	12(26,08)	10 (21,74)	7 (15,22)

**Tabla 6.28. Porcentaje de pacientes que contestaron “con frecuencia” o “constantemente” a las preguntas relativas a la frecuencia del síntoma en cada una de las visitas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las visitas postoperatorias y la visita preoperatoria.**

En la visita preoperatoria solo se encontraron diferencias entre la intensidad de la mañana y la tarde en la sequedad (p valor = 0,034; test de Wilcoxon) y en los ojos irritados (p valor = 0,046; test de Wilcoxon). En la visita del día siguiente y en la visita de 1 mes sólo el discomfort presenta diferencias estadísticas (p valor = 0,080 y p valor = 0,025 respectivamente; test de Wilcoxon). La borrosidad muestra diferencias estadísticas a las dos semanas (p valor = 0,014; test de Wilcoxon). El resto de síntomas no presentan ninguna diferencia en cuanto a la intensidad por la mañana y por la tarde durante los tres meses. Figura 6.25.

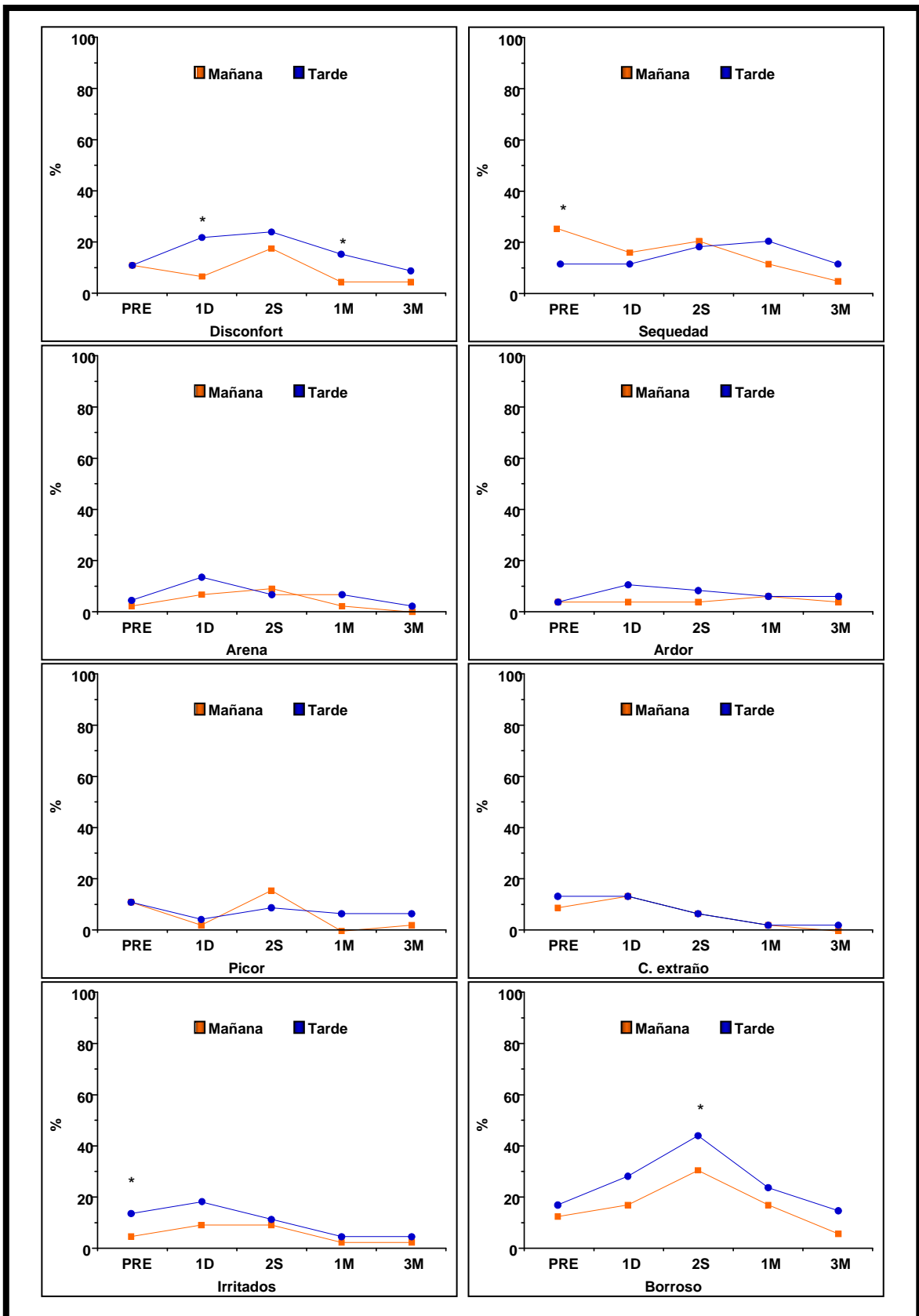


Figura 6.25. Evolución durante tres meses de estudio del porcentaje de paciente que consideraban intenso el síntoma por la mañana y por la tarde. \*  $p < 0,05$  (test de Wilcoxon).

### 6.3.2.2. PRK.

Los pacientes operados con la técnica PRK presentaron un aumento muy significativo del volumen lagrimal al día siguiente de la cirugía (p valor  $<0,001$ ; t-Student muestras pareadas), manteniéndose significativo a las dos semanas (p valor =  $0,017$ ; t-Student muestras pareadas). En la visita del mes el volumen lagrimal volvió a valores basales. Figura 6.26 A.

En el caso de la rotura lagrimal, estos pacientes al contrario de los operados con LASIK, se redujo significativamente durante las dos primeras semanas (p valor =  $0,01$ ; t-Student muestras pareadas), con un ligero aumento al mes pero sin llegar a los valores preoperatorios. Figura 6.26 B.

La tinción corneal presentó un aumento significativo el día siguiente a la intervención (p valor  $<0,05$ ; t-Student). A las dos semanas presentaron menor tinción corneal, aunque aun estadísticamente significativas (p valor =  $0,05$ ; t-Student muestras pareadas). A los tres meses las tinciones son incluso algo menores que en el preoperatorio. Figura 6.26 C.

Estos resultados se resumen en la tabla 6.29.

	Pre-	1 día	2 semanas	1 mes	3 meses
<b>Schirmer</b>					
(media $\pm$ SEM)	18,32 $\pm$ 3,43	30,50 $\pm$ 1,65	22,22 $\pm$ 2,56	17,09 $\pm$ 2,58	19,50 $\pm$ 2,49
P valor	---	< 0,001*	0,017*	0,921	0,918
<b>TBUT</b>					
(media $\pm$ SEM)	18,30 $\pm$ 3,37	12,14 $\pm$ 1,66	11,96 $\pm$ 1,52	14,36 $\pm$ 2,53	16,86 $\pm$ 2,68
P valor	---	0,039*	0,023*	0,253	0,809
<b>Tinciones</b>					
(media $\pm$ SEM)	0,44 $\pm$ 0,19	1,29 $\pm$ 0,12	1,05 $\pm$ 0,21	0,55 $\pm$ 0,17	0,33 $\pm$ 0,14
P valor	---	0,01*	0,05*	0,165	0,166

Tabla 6.29. Medias obtenidas en cada visita obtenidas con el test de Schirmer (expresadas en mm), del TBUT (expresadas en segundos) y del grado de tinción corneal. \* p valor <0,05 respecto a la visita preoperatoria. (t-Student muestras pareadas).

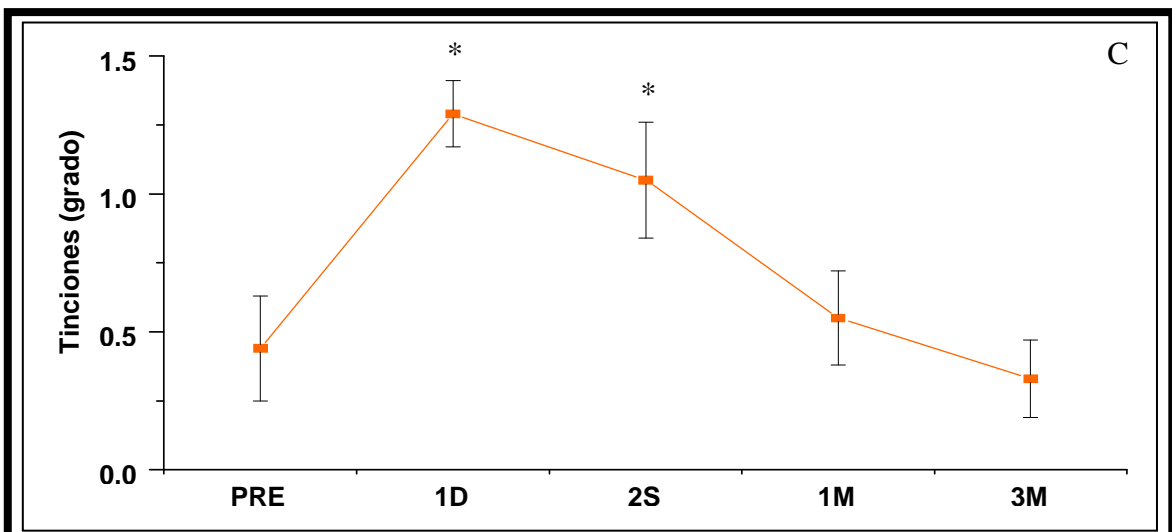
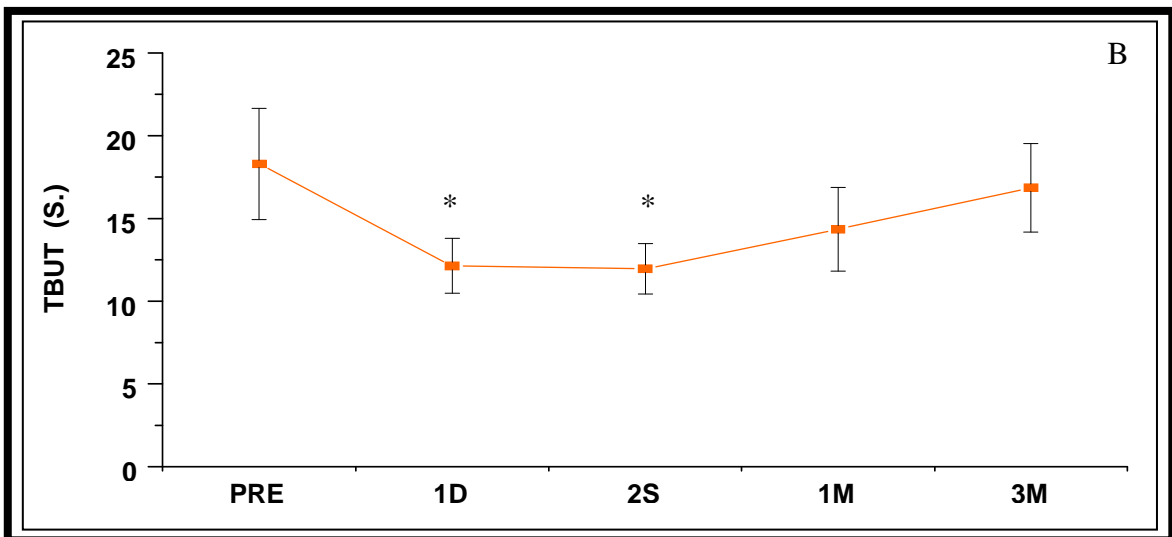
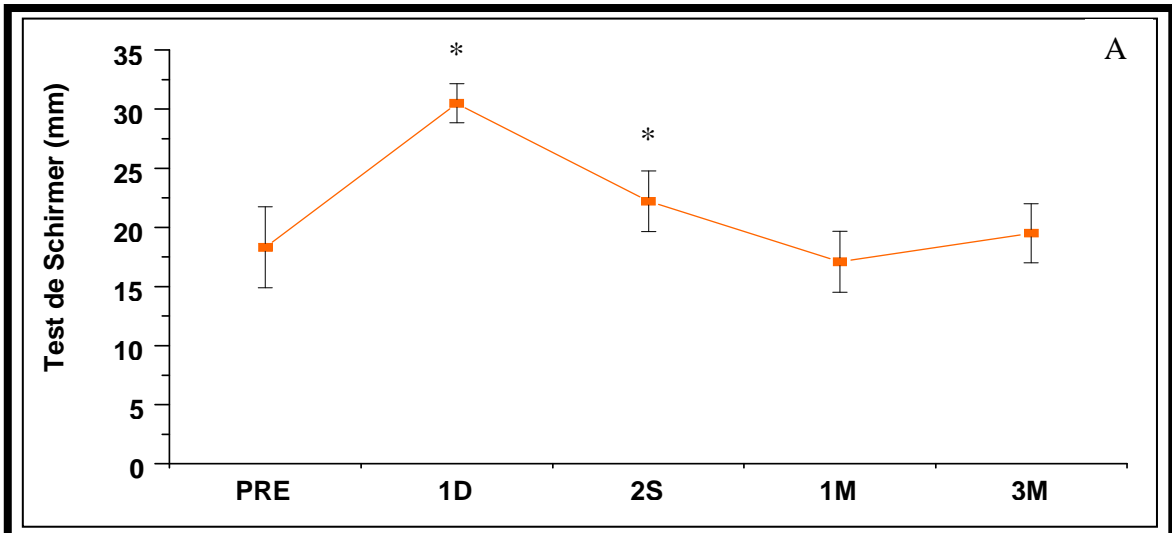


Figura 6.26. Se muestran los valores obtenidos con el test de Schirmer (A), el tiempo de rotura lagrimal (B) y el grado de las tinciones corneales (C) en las diferentes visitas de los pacientes pre y post operatorias. \* p valor < 0,05 respecto a visita preoperatoria. (t-Student).

El  $Ap_4A$  aumentó de forma significativa al día siguiente de la intervención ( $p$  valor = 0,043; t-Student) para volver a concentraciones preoperatorias a partir de las dos semanas.

Al igual que en los pacientes de LASIK, los pacientes operados de PRK presentaron un descenso en la concentración de  $Ap_5A$  después de la cirugía, siendo estadísticamente significativo este descenso a las dos semanas ( $p$  valor = 0,043; t-Student). Al mes y a los 3 meses si se detectó  $Ap_5A$  en la lágrima, en concentraciones inferiores a las preoperatorias. Figura 6.27 y tabla 6.30.

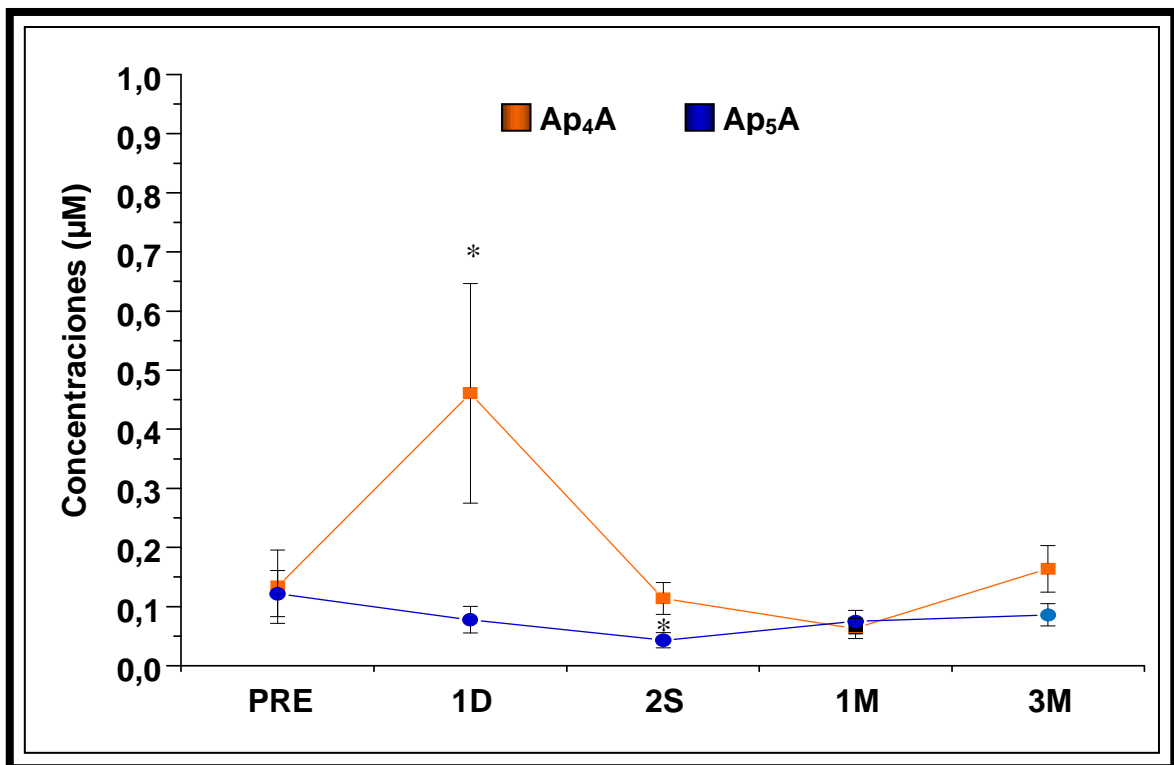


Figura 6.27. Evolución de las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  durante tres meses en pacientes sometidos a cirugía PRK. \*  $p$  valor < 0,05 respecto a visita preoperatoria. (t-Student).

	Ap <sub>4</sub> A (media ± SEM)	P valor	Ap <sub>5</sub> A (media ± SEM)	P valor
<b>Pre</b>	0,134 ± 0,062	---	0,122 ± 0,039	---
<b>1 día</b>	0,461 ± 0,186	0,043*	0,078 ± 0,023	0,219
<b>2 semanas</b>	0,114 ± 0,027	0,512	0,043 ± 0,013	0,017**
<b>1 mes</b>	0,063 ± 0,017	0,146	0,075 ± 0,019	0,170
<b>3 meses</b>	0,164 ± 0,039	0,918	0,086 ± 0,019	0,294

**Tabla 6.30. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A, expresadas en µM. \* p valor <0,05 respecto a visita preoperatoria. (t-Student).**

El número de pacientes que relataron sentir “con frecuencia” o “constantemente” alguno de los síntomas encuestados fue mayor antes de la cirugía que en las visitas postoperatorias. Solo la sequedad y la sensibilidad a la luz fueron relatadas por algún paciente a los tres meses de la intervención quirúrgica. En ninguno de los síntomas hubo diferencias significativas entre el preoperatorio y el resto de las visitas postoperatorias.

Tabla 6.31.

Los pacientes operados con PRK tampoco presentaron diferencias significativas entre la intensidad del síntoma por la mañana y por la tarde. En la figura 6.28 se representa el porcentaje de pacientes que relataron como intenso el síntoma por la mañana y por la tarde. Solo destaca un aumento del porcentaje de pacientes que relataron intenso la sequedad por la tarde.

Síntoma	Pre-	1 día	2 semanas	1 mes	3 meses
Discomfort, No, (%)	5 (33,33)	2 (13,33)	0 (0)	1 (6,67)	0 (0)
Sequedad, No, (%)	3 (20)	0 (0)	2 (13,33)	1 (6,67)	1 (6,67)
S, arena, No, (%)	2 (13,33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ardor, No, (%)	2 (13,33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Picor, No, (%)	1 (6,67)	1 (6,67)	0 (0)	1 (6,67)	0 (0)
Cuerpo extraño, No, (%)	3 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Irritados, No, (%)	0 (0)	1 (6,67)	1 (6,67)	1 (6,67)	0 (0)
Sensib, luz, No, (%)	2 (13,33)	2 (13,33)	2 (13,33)	2 (13,33)	2 (13,33)
Borroso, No, (%)	4 (26,67)	1 (6,67)	3 (20)	2 (13,33)	2 (13,33)

Tabla 6.31. Porcentaje de pacientes que contestaron “con frecuencia” o “constantemente” a las preguntas relativas a la frecuencia del síntoma en cada una de las visitas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las visitas postoperatorias y la visita preoperatoria.

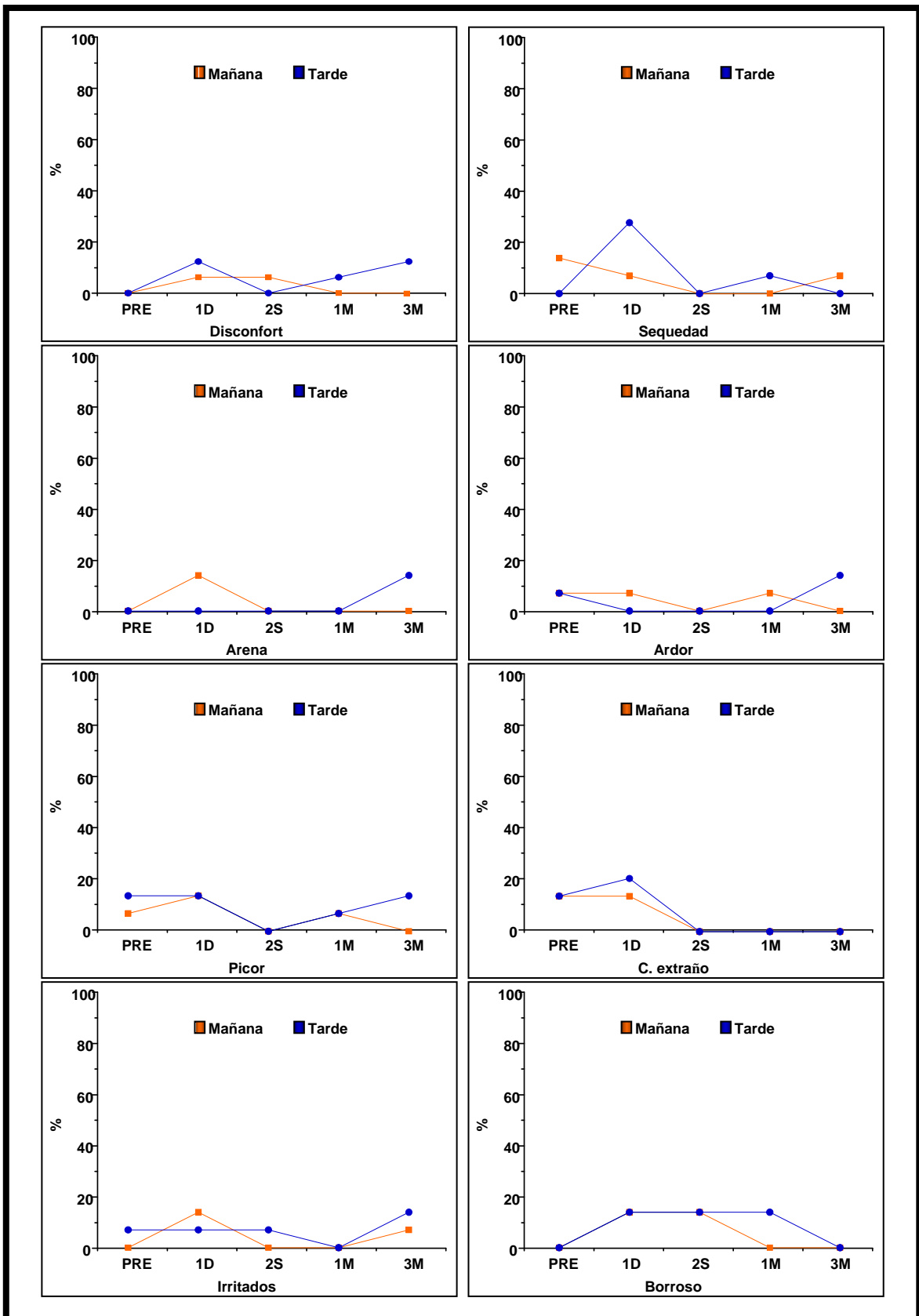


Figura 6.28. Evolución durante tres meses de estudio del porcentaje de paciente que consideraban intenso el síntoma por la mañana y por la tarde.

### 6.3.2.3. ICL.

Los pacientes operados con la técnica ICL solo presentaron un aumento significativo en los valores del test de Schirmer a los tres meses de la intervención (p valor = 0,016; t-Student). El TBUT disminuyó significativamente al día siguiente de la cirugía (p valor = 0,039; t-Student), para aumentar a las dos semanas (p valor = 0,023; t-Student muestras pareadas).

Las tinciones corneales fueron, en todas las visitas postoperatorias, inferiores en grado a las presentadas en la visita preoperatoria (p valor < 0,05; t-Student muestras pareadas).

Los resultados se muestran en la tabla 6.32 y figura 6.29.

	Pre-	1 día	2 semanas	1 mes	3 meses
<b>Schirmer</b>					
(media $\pm$ SEM)	19,13 $\pm$ 2,25	19,88 $\pm$ 2,77	17,00 $\pm$ 2,58	16,10 $\pm$ 2,68	23,59 $\pm$ 2,26
P valor	---	0,436	0,286	0,185	0,016*
<b>TBUT</b>					
(media $\pm$ SEM)	15,60 $\pm$ 2,45	14,21 $\pm$ 1,30	19,97 $\pm$ 2,87	16,43 $\pm$ 2,37	14,68 $\pm$ 2,26
P valor	---	0,039*	0,023*	0,253	0,809
<b>Tinciones</b>					
(media $\pm$ SEM)	0,46 $\pm$ 0,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,14	0,07 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,07
P valor	---	0,042*	0,036*	0,009*	0,015*

Tabla 6.32. Medias obtenidas en cada visita obtenidas con el test de Schirmer (expresadas en mm), del TBUT (expresadas en segundos) y del grado de tinción corneal. \* p valor <0,05 respecto a la visita preoperatoria. (t-Student muestras pareadas).

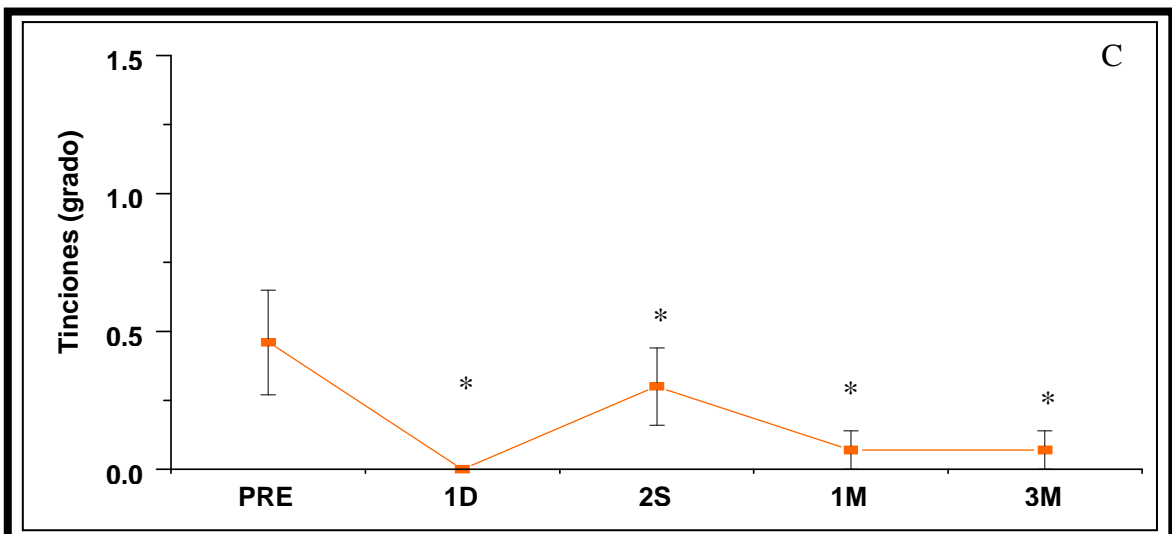
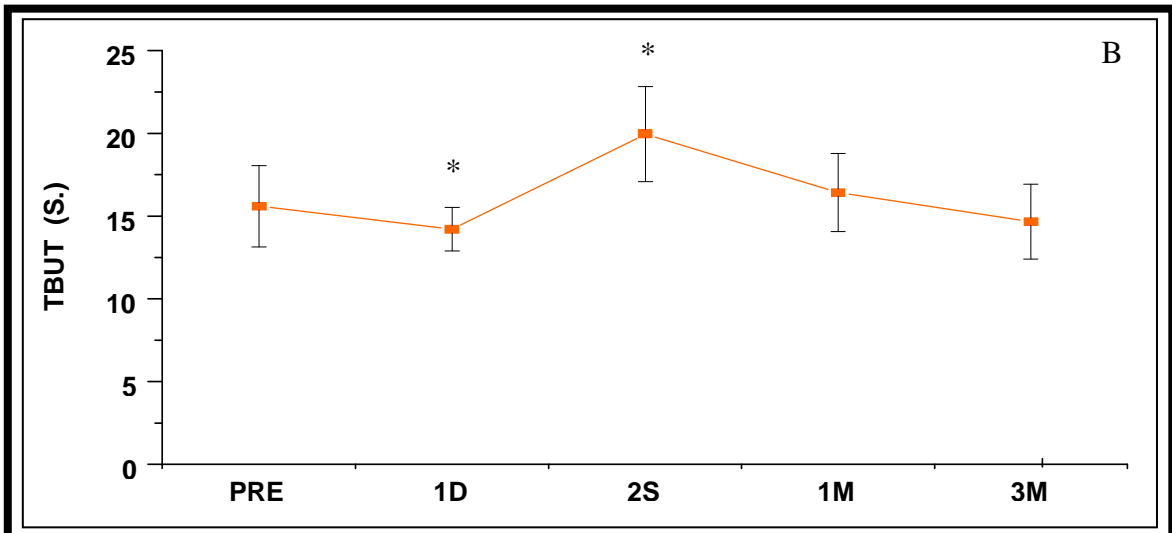
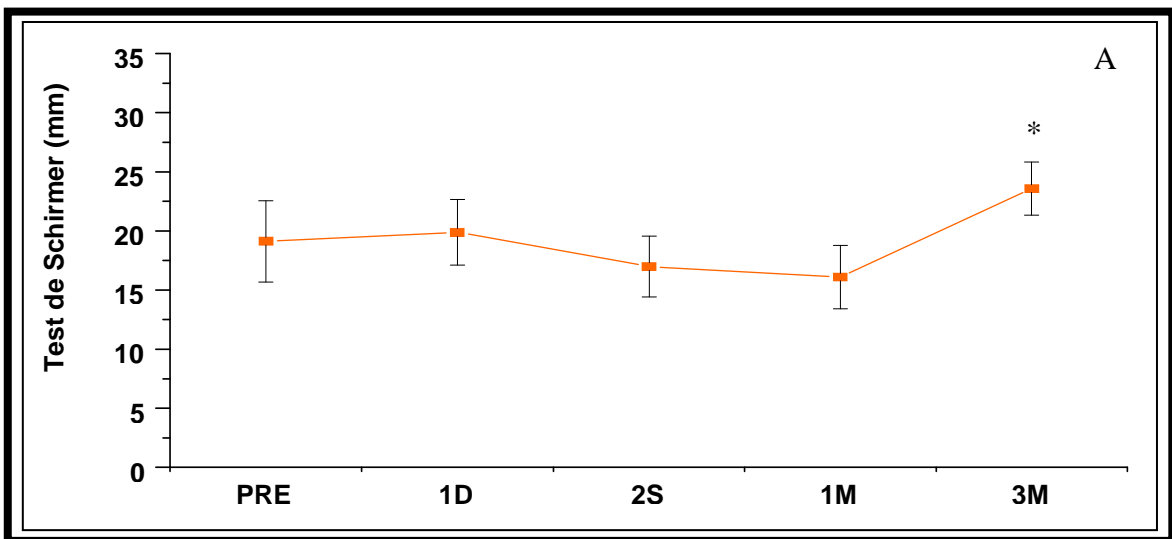


Figura 6.29. Se muestran los valores obtenidos con el test de Schirmer (A), el tiempo de rotura lagrimal (B) y el grado de las tinciones corneales (C) en las diferentes visitas de los pacientes pre y post operatorias. \* p valor < 0,05 respecto a visita preoperatoria. (t-Student muestras pareadas).

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  en ninguna de las visitas post operatorias al compararlas con la visita preoperatoria. Si se observa un aumento, estadísticamente no significativo, del  $Ap_4A$  al día siguiente de la intervención. Figura 6.30 y tabla 6.33.

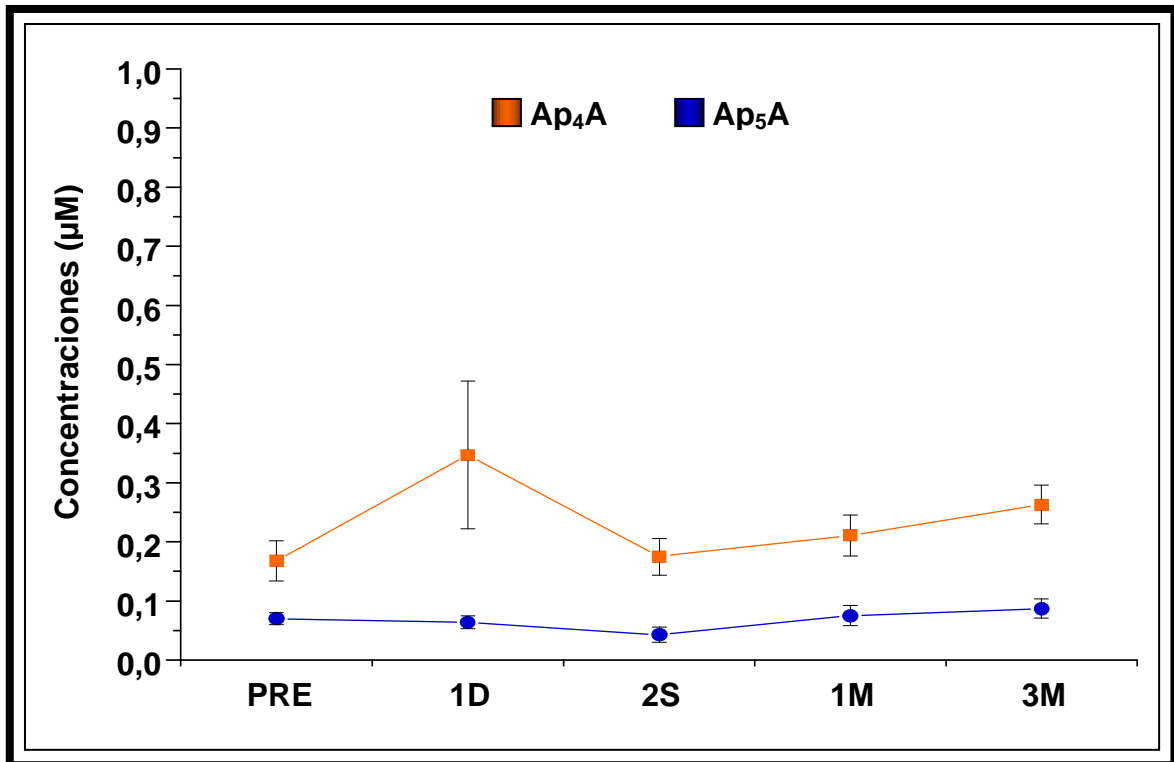


Figura 6.30. Evolución de las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  durante tres meses en pacientes sometidos a cirugía ICL.

	Ap <sub>4</sub> A (media ± SEM)	P valor	Ap <sub>5</sub> A (media ± SEM)	P valor
Pre	0,168 ± 0,034	---	0,070 ± 0,010	---
1 día	0,347 ± 0,124	0,481	0,064 ± 0,043	0,608
2 semanas	0,175 ± 0,031	0,535	0,043 ± 0,013	0,064
1 mes	0,211 ± 0,035	0,657	0,075 ± 0,017	0,772
3 meses	0,263 ± 0,033	0,314	0,087 ± 0,016	0,301

**Tabla 6.33. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A, expresadas en µM. No hubo diferencias significativas. (t-Student muestras pareadas).**

Síntoma	Pre-	1 día	2 semanas	1 mes	3 meses
Discomfort, No, (%)	4 (26,67)	0 (0)	1 (6,67)	0 (0)	0 (0)
Sequedad, No, (%)	5 (33,33)	1 (6,67)	1 (6,67)	0 (0)	1 (6,67)
S, arena, No, (%)	0 (0)	0 (0)	1 (6,67)	0 (0)	0 (0)
Ardor, No, (%)	0 (0)	0 (0)	1 (6,67)	0 (0)	1 (6,67)
Picor, No, (%)	1 (6,67)	1 (6,67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cuerpo extraño, No, (%)	1 (6,67)	1 (6,67)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Irritados, No, (%)	0 (0)	0 (0)	1 (6,67)	0 (0)	1 (6,67)
Sensib, luz, No, (%)	2 (13,33)	2 (13,33)	0 (0)	1 (6,67)	1 (6,67)
Borroso, No, (%)	2 (13,33)	1 (6,67)	1 (6,67)	1 (6,67)	1 (6,67)

**Tabla 6.34. Porcentaje de pacientes que contestaron “con frecuencia” o “constantemente” a las preguntas relativas a la frecuencia del síntoma en cada una de las visitas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las visitas postoperatorias y la visita preoperatoria.**

Solo uno o dos pacientes de los 15 que participaron en el estudio relataron sentir “con frecuencia” o “constantemente” alguno de los síntomas que se preguntaban en el cuestionario DEQ después de la intervención quirúrgica. En la tabla 6.34 se muestran los porcentajes para todos los síntomas.

Exactamente igual ocurre con el número de pacientes que consideraron intenso el síntoma después de la cirugía, no encontrándose además diferencias estadísticamente significativas entre la intensidad por la mañana y por la tarde. Figura 6.31.

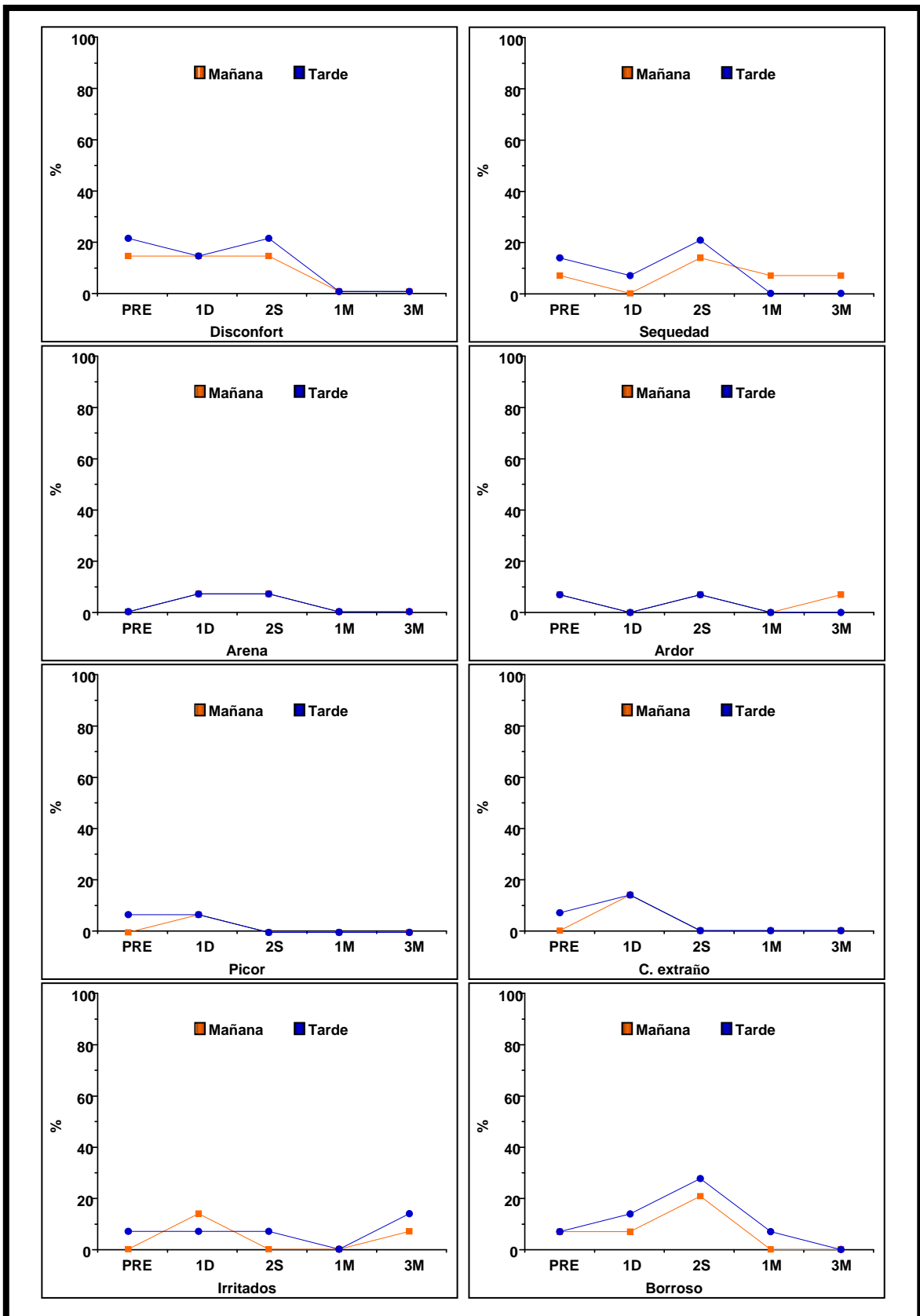


Figura 6.31. Evolución durante tres meses de estudio del porcentaje de paciente que consideraban intenso el síntoma por la mañana y por la tarde.

### **6.3.3. Relación entre la frecuencia de los síntomas de ojo seco y las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A.**

Con el objetivo de evaluar si las concentraciones de diadenosina polifosfatos aumentan ante la presencia de alguno de los síntomas de ojo seco, se comparó entre sintomáticos y asintomáticos entre los sujetos seleccionados para cirugía refractiva antes de la intervención quirúrgica.

Los grupos se dividieron siguiendo los criterios de los autores del cuestionario (Begley, Caffery et al. 2002a), según el cual, cuando los pacientes contestan a las preguntas relacionadas con la frecuencia de los síntomas “con frecuencia” o “constantemente”, se consideran sintomáticos, y cuando contestan cualquiera de las otras opciones se consideran asintomáticos.

No se encontraron diferencias significativas entre sintomáticos y asintomáticos en las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A para ninguno de los síntomas. Solo en el caso del discomfort, arena y ardor hubo un ligero aumento de Ap<sub>4</sub>A en los sujetos sintomáticos (figura 6.32).

En el caso de las concentraciones de Ap<sub>5</sub>A son más elevadas en la mayoría de los síntomas pero sin ser estadísticamente significativa la diferencia entre sintomáticos y asintomáticos. Figura 6.33.

En las tablas 6.35 y 6.36 se muestran los valores obtenidos en las concentraciones para ambos diadenosin polifosfatos y los p valor para cada síntoma entre sintomáticos y asintomáticos.

<b>Ap<sub>4</sub>A</b> (media $\pm$ SEM)			
<b>Síntoma</b>	<b>Asintomático</b>	<b>Sintomático</b>	<b>P valor (ANOVA)</b>
<b>Disconfort</b>	0,117 $\pm$ 0,021	0,128 $\pm$ 0,024	0,739
<b>Sequedad</b>	0,124 $\pm$ 0,019	0,112 $\pm$ 0,032	0,768
<b>S. arena</b>	0,118 $\pm$ 0,017	0,148 $\pm$ 0,046	0,629
<b>Ardor</b>	0,116 $\pm$ 0,017	0,172 $\pm$ 0,065	0,352
<b>Picor</b>	0,123 $\pm$ 0,017	0,107 $\pm$ 0,046	0,741
<b>Cuerpo extraño</b>	0,123 $\pm$ 0,018	0,105 $\pm$ 0,039	0,724
<b>Irritados</b>	0,123 $\pm$ 0,019	0,114 $\pm$ 0,027	0,822
<b>Sensib. luz</b>	0,126 $\pm$ 0,018	0,088 $\pm$ 0,029	0,359
<b>Borroso</b>	0,121 $\pm$ 0,019	0,119 $\pm$ 0,029	0,961

**Tabla 6.35. Concentraciones de Ap<sub>4</sub>A, expresadas en  $\mu$ M. No hubo diferencias significativas en ninguno de los síntomas.**

<b>Ap<sub>5</sub>A</b> (media $\pm$ SEM)			
<b>Síntoma</b>	<b>Asintomático</b>	<b>Sintomático</b>	<b>P valor (ANOVA)</b>
<b>Disconfort</b>	0,051 $\pm$ 0,021	0,054 $\pm$ 0,043	0.963
<b>Sequedad</b>	0,044 $\pm$ 0,015	0,084 $\pm$ 0,072	0.401
<b>S. arena</b>	0,042 $\pm$ 0,017	0,145 $\pm$ 0,112	0.098
<b>Ardor</b>	0,044 $\pm$ 0,017	0,126 $\pm$ 0,096	0.195
<b>Picor</b>	0,044 $\pm$ 0,018	0,095 $\pm$ 0,077	0.341
<b>Cuerpo extraño</b>	0,045 $\pm$ 0,018	0,084 $\pm$ 0,066	0.436
<b>Irritados</b>	0,052 $\pm$ 0,034	0,134 $\pm$ 0,093	0.071
<b>Sensib. Luz</b>	0,055 $\pm$ 0,021	0,032 $\pm$ 0,018	0.699
<b>Borroso</b>	0,046 $\pm$ 0,019	0,073 $\pm$ 0,0051	0.551

Tabla 6.36. Concentraciones de Ap<sub>5</sub>A, expresadas en  $\mu$ M. No hubo diferencias significativas en ninguno de los síntomas.

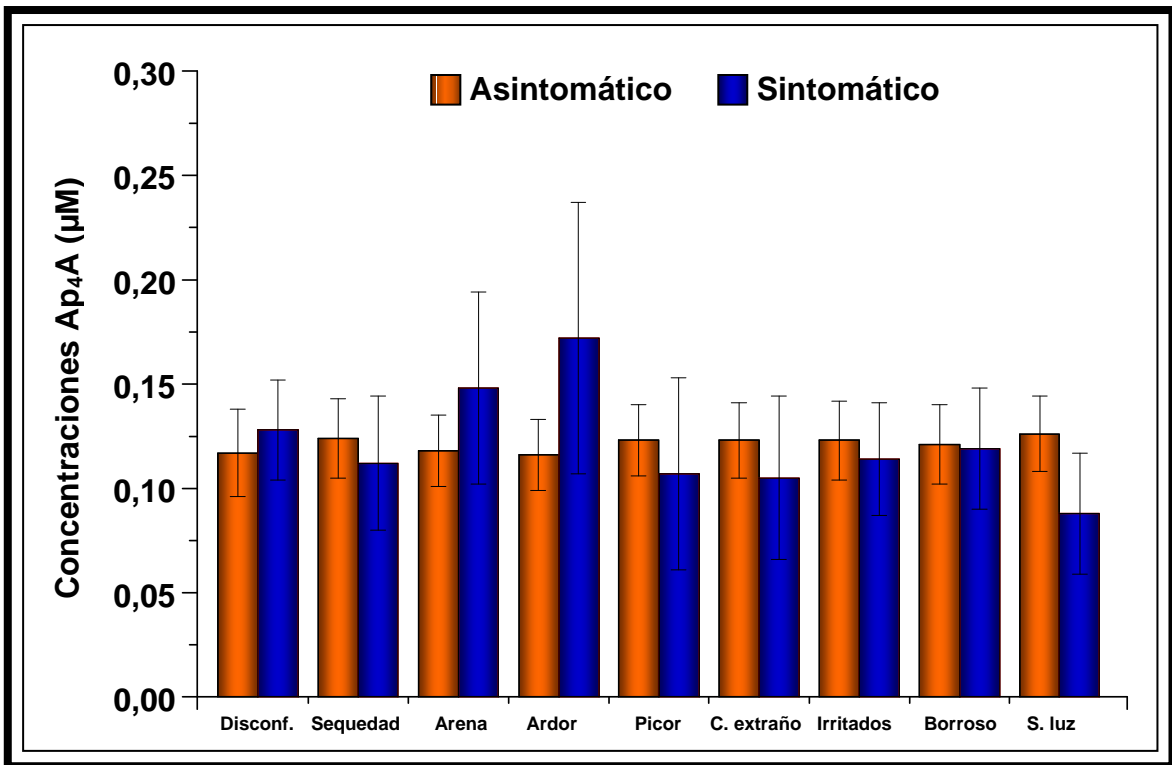


Figura 6.32. Representación gráfica de las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A para cada uno de los síntomas encuestados con el DEQ.

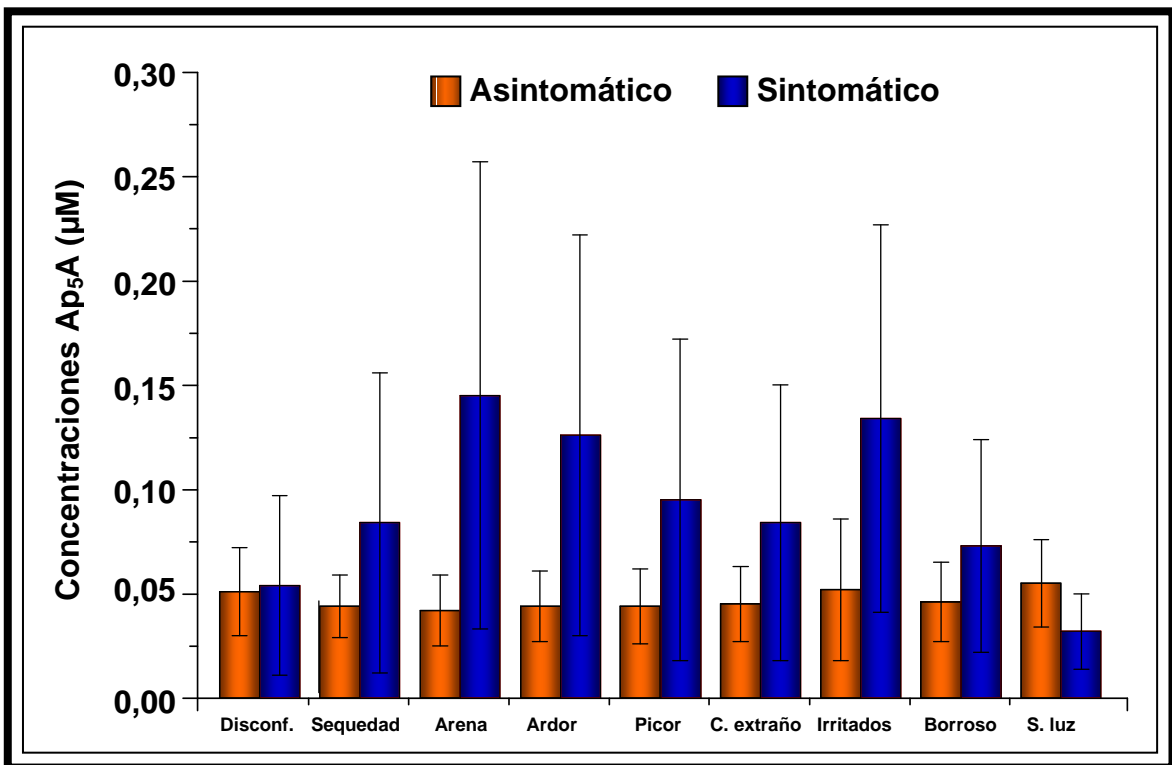
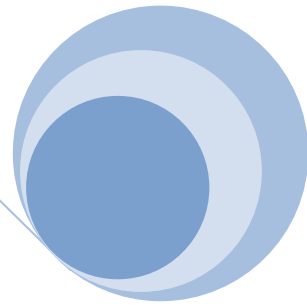
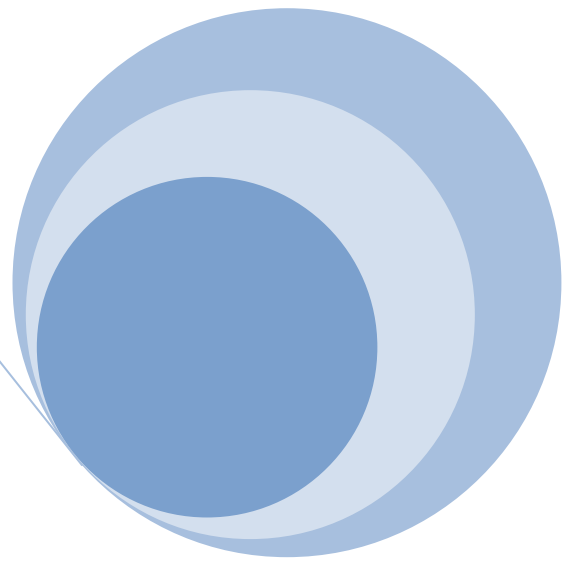
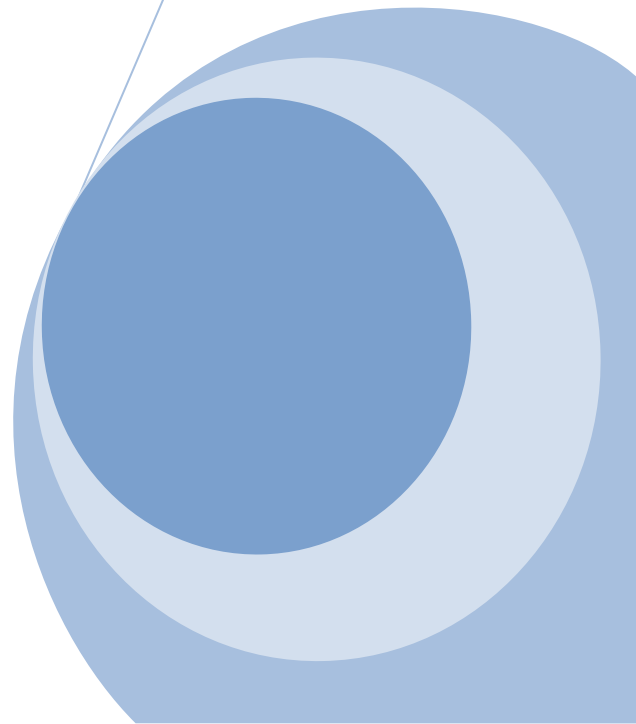


Figura 6.33. Representación gráfica de las concentraciones de Ap<sub>5</sub>A para cada uno de los síntomas encuestados con el DEQ.



**7**

**Discusión**





## **7.1 Primera Fase: identificación de los dinucleótidos en la lágrima humana.**

Además de hidratar, proteger, o mejorar la calidad óptica de la cara anterior de la córnea, la lágrima también tiene la función de nutrir de oxígeno y otros componentes a la superficie ocular. Uno de esos componentes, hasta ahora identificados en lágrima de conejo, son los diadenosina polifosfatos (Pintor, Peral et al. 2002), los cuales parecen tener funciones relevantes en el polo anterior (Pintor 2003; Pintor, Bautista et al. 2004; Pintor, Pelaez et al. 2004). Además cuando son instiladas en el ojo estimulan la lacrimación, convirtiéndose en agentes potenciales para el tratamiento del ojo seco (Pintor, Peral et al. 2002).

Los primeros experimentos de este estudio tenían como propósito identificar la presencia de estos dinucleótidos en la lágrima humana y cuantificar sus concentraciones. Al igual que en los experimentos con conejos, fueron identificados el  $Ap_4A$  y el  $Ap_5A$ , pero también se identificó la presencia de  $Ap_3A$ . Al ser la primera vez que se identificaban estas tres diadenosina polifosfatos en la lágrima humana, se decidió verificar su presencia con dos métodos más, como son el enriquecimiento de las muestras y el tratamiento de las muestras con fosfodiesterasa. Con ambos métodos también se confirmó la presencia de los dinucleótidos en las lágrimas humanas.

Las concentraciones de  $Ap_4A$  son 3 veces mayores que las concentraciones de  $Ap_5A$  en la lágrima humana, algo que parece extraño ya que ambas diadenosina polifosfatos se almacenan en concentraciones prácticamente idénticas en las vesículas sinápticas (Pintor, Torres et al. 1991a; Zimmermann, Volkandt et al. 1993). Una posible explicación sería la presencia de enzimas en la lágrima o en las células de la superficie ocular que degraden con más eficacia el  $Ap_5A$  que el  $Ap_4A$ , pero aunque se han descrito

ectonucleotidasas (enzimas que degradan los nucleótidos), su actividad no explicaría la diferencia de concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en la lágrima (Aguilar, Reyes et al. 2001; Mediero, Peral et al. 2006). Otra posible explicación sería que estos dinucleótidos no son liberados desde las vesículas sinápticas sino que existe otro mecanismo de liberación.

Para comprobar si los diadenosina polifosfatos se liberan desde las terminaciones nerviosas de la glándula lagrimal, se recogieron muestras de lágrima a pacientes a los que previamente se les instiló anestésico en el ojo. Si el origen de los dinucleótidos es de las terminaciones nerviosas, al instilar anestésico se reducirá el volumen lagrimal y por tanto las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>3</sub>A también deberían disminuir. Nuestros resultados muestran lo contrario, con el anestésico, se reduce el volumen lagrimal aproximadamente un 50% respecto a los resultados sin anestésico, pero en cambio las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A aumentan en una proporción similar a la disminución de lágrima, y el Ap<sub>3</sub>A se mantiene en los mismos valores. Estos resultados sugieren que la liberación de estos dinucleótidos se produce por un mecanismo no neural, y además que no son secretados por la glándula lagrimal.

Por tanto, a la vista de estos primeros resultados del estudio parece que la liberación de estas diadenosina polifosfatos se produce desde el epitelio corneal y/o conjuntival. Se ha descrito la liberación de otros nucleótidos como el ATP desde células epiteliales corneales, del cuerpo ciliar y de otras células epiteliales (Mitchell, Carre et al. 1998; Homolya, Steinberg et al. 2000; Jensen, Odgaard et al. 2007) por lo que la liberación desde el epitelio de la superficie ocular podría ser factible.

Las concentraciones de Ap<sub>3</sub>A detectadas en la lágrima humana, tanto con anestésico como sin él, fueron muy inferiores a las de los otros dos dinucleótidos detectados, estando incluso cerca del umbral de detección del instrumento de medida, el HPLC. En las muestras recogidas para realizar la curva de edad, el Ap<sub>3</sub>A fue prácticamente

indetectable. Por este motivo, se decidió que en los siguientes estudios se evaluarían solamente  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$ .

Una vez que hemos identificado dinucleótidos en la lágrima humana, evaluamos si hay variaciones en sus concentraciones en función de la edad y del sexo. Encontramos que si dividimos al grupo estudiado en dos grupos, menores de 50 años y mayores de 50 años, los dos diadenosina polifosfatos estudiados aumentan significativamente, sobre todo el  $Ap_4A$ .

La edad está considerada uno de los principales factores de riesgo de padecer ojo seco, quizás por una reducción de la producción lagrimal o por el aumento de la evaporación asociada a la edad (Mathers, Lane et al. 1996b). Son muchos los estudios que corroboran esta afirmación, aunque el porcentaje de prevalencia entre ellos sea muy dispar, desde un 5% a un 35% a los 50 años o del 20% al 40% para mayores de 80 años (Schein, Muñoz et al. 1997; Moss, Klein et al. 2000; Lee, Lee et al. 2002; Chia, Mitchell et al. 2003; Lin, Tsai et al. 2003; Schaumberg, Sullivan et al. 2003; Schaumberg, Dana et al. 2009; Viso, Rodriguez-Ares et al. 2009). En la mayoría de estos estudios es a partir de los 50 años cuando comienza a aumentar significativamente la prevalencia de ojo seco, al igual que ocurre con el aumento en las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$ .

En el caso del  $Ap_4A$ , también presenta concentraciones algo más elevadas en los más jóvenes, con edades entre los 7 y los 20 años. Apenas hay referencias sobre ojo seco en jóvenes y las que hay, relatan principalmente la relación del ojo seco con enfermedades sistémicas o autoinmunes (Mac Cord Medina, Silvestre de Castro et al. 2007; Alves, Dias et al. 2008). De los grandes estudios sobre la prevalencia del ojo seco, ninguno estudia a poblaciones por debajo de 20 años, solamente el estudio realizado en Indonesia estudia a sujetos entre 20 y 30 años (Lee, Lee et al. 2002).

Aunque la percepción clínica es de una menor incidencia del ojo seco en niños y adolescentes, no podemos descartar la posibilidad de que el ligero aumento de la concentración de Ap<sub>4</sub>A en estas edades esté relacionado con el ojo seco, debido a la escasez de evidencias científicas. Para comprobar dicha relación se deberían realizar estudios en jóvenes en los que se evaluara la prevalencia de ojo seco y su relación con las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A.

La observación clínica sugiere que el ojo seco es más común en las mujeres que en los hombres, pero no todos los estudios muestran esta relación. El estudio de Beaver Dam muestra una prevalencia de ojo seco en mujeres del 16,7% mientras que en hombres es 11,4% (Moss, Klein et al. 2000), otros estudios muestran diferencias mayores, con un 33% de prevalencia en mujeres por un 22% en hombres (Doughty, Fonn et al. 1997). En cambio hay publicados otros estudios donde no se han encontrado diferencias significativas entre sexos (Schein, Muñoz et al. 1997; Bukhari, Ajlan et al. 2009), otros donde solo encuentran en las mujeres mayor presencia de síntomas pero no de signos de ojo seco (Viso, Rodriguez-Ares et al. 2009), e incluso algunos donde la prevalencia es mayor en hombres que en mujeres (Lee, Lee et al. 2002).

Cuando las concentraciones de los diadenosina polifosfatos se evaluaron en función del sexo, no encontramos diferencias significativas entre hombres y mujeres. Si encontramos un aumento significativo tanto en hombres como en mujeres en los mayores de 50 años. Estos resultados concuerdan con aquellos que relatan un aumento de la prevalencia del ojo seco en mayores de 50 años y que no encuentran diferencias significativas en función del sexo (Schein, Muñoz et al. 1997).

En nuestro estudio solamente se tomaron muestras de lágrima a pacientes de diferentes edades para evaluar las concentraciones de los dinucleótidos. No se realizó ningún otro test diagnóstico de ojo seco que nos pudiera ayudar a correlacionar ojo seco y dinucleótidos en función del sexo, ya que el objetivo de esta fase era solo caracterizar la presencia de los diadenosina polifosfatos en la lágrima humana. Por tanto sería adecuado hacer estudios más amplios que evaluaran la relación entre las concentraciones de dinucleótidos en función del sexo y el ojo seco, profundizando en factores que diferencien ambos sexos, como por ejemplo los factores hormonales.

## **7.2 Segunda Fase: estudio de los dinucleótidos en el ojo seco y su liberación a la superficie ocular.**

Se ha descrito la presencia de diadenosina polifosfatos en la lágrima de conejo, y en la primera fase de este trabajo también en la lágrima humana, donde hay un aumento de las concentraciones de estos dinucleótidos en función de la edad. Además cuando se ha instilado de forma tópica en el ojo de conejo son capaces de estimular la secreción lagrimal. Existen, por tanto, evidencias que nos indican que existe una fuerte relación entre los diadenosina polifosfatos y el ojo seco.

Los resultados de la primera fase también nos indican que la liberación de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  no se produce desde las vesículas sinápticas de las terminaciones nerviosas de la glándula lagrimal, y que por tanto se deben liberar desde la superficie ocular.

En la segunda fase se marcaron dos objetivos, primero evaluar si existen diferencias en las concentraciones de diadenosina polifosfatos entre sujetos asintomáticos y sintomáticos de ojo seco y segundo, estudiar cual es el mecanismo de liberación de estos dinucleótidos a la lágrima.

La división entre sujetos sintomáticos y asintomáticos se realizó en función de la puntuación obtenida en el cuestionario de McMonnies, considerando asintomáticos a aquellos que puntuaron por debajo de 10 y sintomáticos a los que puntuaron por encima de 10, valor a partir del cual se considera que el sujeto tiene ojo seco marginal (McMonnies, Ho et al. 1998).

El grupo de pacientes sintomáticos de ojo seco se dividió en dos subgrupos, ya que existía gran variabilidad en los valores obtenidos con el test de Schirmer sin anestesia.

Por tanto, se formaron dos subgrupos, uno con sujetos que tuvieron valores en el test de Schirmer I inferiores a 5 mm y otros con valores superiores a 5 mm. Se decidió este punto de corte porque es el valor de corte más empleado para diferenciar entre ojo seco o normal (Vitali, Bombardieri et al. 2002). Algunos autores también sugieren como punto de corte 5,5 mm (van Bijsterveld 1969), pero parece que estos estudios carecen de sesgos de selección y por tanto no queda clara su utilidad [Not authors listed] (2007c).

Encontramos que los dos subgrupos de pacientes sintomáticos presentaban concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A significativamente más elevadas que los pacientes asintomáticos. En el caso de los pacientes sintomáticos con baja lacrimación el aumento fue muy significativo, siendo 100 veces mayor para el Ap<sub>4</sub>A y más de 300 veces para el Ap<sub>5</sub>A.

Para el diagnóstico del ojo seco no existe ninguna prueba que se considere “*Gold estándar*”, además, la falta de correlación entre los síntomas y los signos de esta patología hacen muy difícil su diagnóstico y su tratamiento. No es extraño encontrar pacientes que son sintomáticos de ojo seco pero no se encuentran evidencias de la patología al hacer las pruebas de diagnóstico objetivas, y viceversa (Schein, Tielsch et al. 1997; Nichols, Nichols et al. 2004). Que Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A tengan concentraciones significativamente más elevadas en los dos grupos de pacientes sintomáticos de ojo seco, tanto con lacrimación baja (signo de ojo seco) o con una lacrimación normal, podría ser indicativo del potencial uso de estas moléculas como marcadores moleculares de ojo seco, haciendo más fácil el diagnóstico de esta patología.

Una pregunta que surge ante estos resultados es, ¿Por qué si tanto Ap<sub>4</sub>A como Ap<sub>5</sub>A han demostrado su capacidad para estimular la secreción lagrimal (Pintor, Peral et al. 2002), los pacientes con mayor concentración de estas moléculas en la lágrima son los que tienen menor volumen lagrimal?. Es probable que a pesar de estar en concentraciones

muy elevadas, por alguna razón hasta ahora no descrita, no sean capaces de estimular la lacrimación en estos pacientes debido a alguna anomalía en la glándula lagrimal o a una pérdida de sensibilidad de los receptores P2Y<sub>2</sub> debido a polimorfismos que haga que necesiten concentraciones muy elevadas de diadenosina polifosfatos para activarse. DIQUAS, un fármaco con un principio activo análogo al Ap<sub>4</sub>A, se comercializará en concentraciones milimolar, tres órdenes de magnitud mayor que las concentraciones encontradas en los pacientes sintomáticos con lacrimación baja. En este sentido, serían necesarios más estudios que evaluaran que porcentaje de receptores P2Y<sub>2</sub> están activos en la glándula lagrimal de los pacientes con baja lacrimación para verificar estas hipótesis.

En el caso de los pacientes sintomáticos con lacrimación normal parece ser que la presencia elevada de estos dinucleótidos es capaz de estimular la secreción lagrimal. Un aumento del volumen lagrimal no es suficiente para evitar los síntomas de ojo seco, ya que, además de un volumen adecuado, es necesario tener una composición adecuada de la lágrima [Not authors listed] (2007a). Es probable que estos pacientes sigan relatando sus síntomas de ojo seco por tener una lágrima con un elevado ratio de evaporación.

El segundo objetivo de esta fase fue estudiar si el estrés mecánico sobre la superficie ocular es el mecanismo principal de liberación de los dinucleótidos a la lágrima. En el estudio *In Vivo* se diseñaron dos experimentos, en uno se provocó el estrés mecánico sobre la superficie ocular aumentando la frecuencia de parpadeo y recogiendo las muestras de lágrima con y sin anestésico, y en otro se aplicó un estímulo sobre la córnea con dos intensidades diferentes aplicadas con el estesiómetro de Belmonte con el objetivo de evaluar, sin la necesidad de anestésico, si la liberación de los dinucleótidos se realiza desde las vesículas sinápticas de las terminaciones nerviosas de la superficie corneal.

Con mayor frecuencia de parpadeo, tanto en el experimento con anestésico como sin él, las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en la lágrima aumentaron significativamente, con valores máximos a 60 parpadeos por minuto. Cuando utilizamos anestésico el aumento en las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A fueron mayores, refrendando los resultados de la primera fase.

Este aumento de los dinucleótidos en la lágrima con un parpadeo forzado parece indicar que la liberación de estas moléculas se produce por un estímulo mecánico. Además, que este aumento se produzca en mayor medida cuando utilizamos anestésico nos sugeriría indirectamente que tanto Ap<sub>4</sub>A como Ap<sub>5</sub>A no se liberan de las terminales nerviosas de la superficie ocular.

Se ha descrito que un estímulo fuerte sobre la inervación corneales, ya sea mecánico, químico o térmico, aumenta la secreción lagrimal (Acosta, Peral et al. 2004) lo que sugiere la implicación de las terminaciones nerviosas y una posible liberación de dinucleótidos desde sus vesículas sinápticas. Al aplicar los dos estímulos sobre la córnea aumentó en ambos casos la concentración de Ap<sub>4</sub>A con respecto al control, en cambio en el Ap<sub>5</sub>A no hubo diferencias significativas. Este aumento en el Ap<sub>4</sub>A puede ser debido en parte a una liberación desde las terminales nerviosas estimuladas, pero también a un estrés mecánico producido por el sople de aire.

La falta de diferencia entre ambos estímulos sugiere que hay otros mecanismos no neurales en la liberación de los dinucleótidos, ya que un estímulo más intenso estimula un mayor número de terminaciones nerviosas (Acosta, Belmonte et al. 2001) y por tanto, si la liberación es neural, deberíamos esperar un aumento de las concentraciones de diadenosina polifosfatos con el estímulo más intenso, lo cual no sucede.

Estos resultados nos indican que el principal mecanismo de liberación de los diadenosina polifosfatos se produce por un estrés mecánico sobre las células epiteliales de la superficie ocular, sin que sea descartable que una pequeña porción de estos dinucleótidos se liberen desde las terminales nerviosas de la superficie ocular. Parece clara, por tanto, la relación entre las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A y el parpadeo, debido a la fricción que ejerce el parpado sobre la superficie ocular (Ren y Wilson 1997).

El parpadeo es una acción involuntaria para proteger la superficie ocular. 12 parpadeos por minuto se considera un parpadeo normal (Doane 1980). Tsubota y colaboradores han descrito que pacientes con ojo seco pueden incrementar su frecuencia de parpadeo para compensar la inestabilidad o la deficiencia lagrimal. Un paciente con ojo seco parpadea aproximadamente 34 veces por minuto (Tsubota, Hata et al. 1996). Esto nos sugiere que un incremento de los síntomas de ojo seco, producen un aumento en la frecuencia de parpadeo que a su vez provoca la liberación de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A a la lágrima con el objeto de minimizar la sintomatología.

La liberación de nucleótidos *In Vitro*, como el ATP, por un estímulo mecánico ha sido observada tanto en tejidos oculares como no oculares (Grygorczyk y Hanrahan 1997; Guyot y Hanrahan 2002; Srinivas, Mutharasan et al. 2002). Su liberación también se ha observado al exponer las células a soluciones hipotónicas (Taylor, Kudlow et al. 1998). Para verificar que la liberación de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A se produce por un estímulo mecánico, realizamos un experimento *In Vitro* con células epiteliales corneales humanas en un cultivo estratificado a las cuales se les realiza un lavado enérgico para estimular la liberación de los dinucleótidos. Encontramos que tanto Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A presentan concentraciones más elevadas después de haber estimulado el cultivo celular y que ambos diadenosina polifosfatos aumentan en la misma proporción, aproximadamente 4 veces más que sin la estimulación mecánica, verificando por tanto, que los diadenosina

polifosfatos pueden ser liberados por células epiteliales corneales al aplicarlas un estímulo mecánico.

El mecanismo de transporte por el cual estos diadenosina polifosfatos, y otros nucleótidos como el ATP, salen al medio extracelular desde el interior de las células no ha sido aún identificado. Esta salida se puede producir por una rotura celular, por medio del transportador ATP-binding cassette, por hemicanales de conexina, por el regulador de la conductancia transmembranosa de fibrosis cística (CFTR, siglas en inglés) o por una liberación exocitótica neural (Pintor, Diaz-Rey et al. 1992; Mitchell, Carre et al. 1998; Ballerini, Di Iorio et al. 2002; Eldred, Sanderson et al. 2003; Gomes, Srinivas et al. 2005; Naumann, Siratska et al. 2005; Pearson, Dale et al. 2005; Reigada y Mitchell 2005; Zhao, Yu et al. 2005; MacDonald, Braun et al. 2006; Stumpf, Wenners-Epping et al. 2006).

## **7.3 Tercera Fase: estudio de los dinucleótidos en patologías oculares y cirugía refractiva.**

### **7.3.1. Síndrome de Sjögren.**

En las fases anteriores se ha descrito la presencia de diadenosina polifosfatos en la lágrima humana, así como sus concentraciones elevadas en pacientes sintomáticos de ojo seco, indicando la posibilidad de que sean potenciales marcadores moleculares de ojo seco. Se decidió estudiar estos dinucleótidos en pacientes con Síndrome de Sjögren , ya que son pacientes que padecen un ojo seco moderado o severo (Vitali, Bombardieri et al. 2002).

Los pacientes con Síndrome de Sjögren presentaron unas concentraciones más elevadas de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  que los pacientes del grupo control, al igual que ocurre con los pacientes sintomáticos de ojo seco que no padecen Síndrome de Sjögren. Estos resultados confirman el potencial uso como herramienta diagnóstica de ojo seco como ya habíamos sugerido en la fase anterior.

Si comparamos los niveles de dinucleótidos en el Síndrome de Sjögren con los obtenidos en los pacientes sintomáticos de ojo seco, observamos que la concentración del  $Ap_4A$  en los pacientes con Síndrome de Sjögren con baja lacrimación es la mitad que en los pacientes sintomáticos de ojo seco con baja lacrimación, en cambio no encontramos diferencias en los grupos con lacrimación normal. Las concentraciones de  $Ap_5A$  son significativamente más elevadas en ambos grupos de Síndrome de Sjögren respecto a los grupos de sintomáticos de ojo seco de la fase anterior. Además, solo se muestra una correlación inversa, estadísticamente significativa, entre el volumen lagrimal y el  $Ap_5A$ , no así con el  $Ap_4A$ . Cuanto más elevadas son las concentraciones de  $Ap_5A$  menor volumen

de lágrima presenta el paciente. Esto sugiere que el Ap<sub>5</sub>A puede ser un factor diferenciador entre el ojo seco no Síndrome de Sjögren y el Síndrome de Sjögren.

La superficie ocular en los pacientes con Síndrome de Sjögren está alterada y en muchos casos dañada, observándose tinciones con fluoresceína y rosa de bengala con relativa facilidad en estos pacientes (Srinivasan y Slomovic 2007; Barboza, Barboza et al. 2008). Los diadenosina polifosfatos mejoran la reepitelización corneal (Pintor, Bautista et al. 2004), de tal manera que una elevada concentración de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en la lágrima podría ayudar a mejorar la integridad epitelial en los pacientes con Síndrome de Sjögren (Mediero, Guzman-Aranguez et al. 2008).

Ya hemos mostrado como el aumento de parpadeo aumenta los niveles de dinucleótidos en la lágrima, por el estrés mecánico que provocan los parpados en la superficie ocular. Además está descrito el aumento de parpadeo en los pacientes con ojo seco (Tsubota, Hata et al. 1996), por lo que podemos pensar que el aumento de diadenosina polifosfatos en la lágrima de pacientes con Síndrome de Sjögren puede deberse tanto al aumento del parpadeo como a una superficie ocular dañada.

Como ya se ha descrito en varias ocasiones, el Ap<sub>4</sub>A y el Ap<sub>5</sub>A estimulan la secreción lagrimal (Pintor, Peral et al. 2002), y parece que actúan mejorando el volumen lagrimal y su calidad estimulando receptores P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> presentes en las glándulas de Meibomio y glándulas accesorias (Yerxa, Mundasad et al. 2002; Cowlen, Zhang et al. 2003). La presencia de estos receptores en la glándula principal aún no ha sido publicada, pero sí que se ha encontrado su presencia en la glándula lagrimal de conejos albinos de raza Nueva Zelanda (comunicación personal de C.H.V. Hoyle, 2009).

La presencia de receptores P<sub>2</sub>Y<sub>2</sub> si ha sido demostrada en las glándulas salivares (Turner, Landon et al. 1999). Algunos autores indican que la expresión de estos

receptores esta sobre expresada en las glándulas submaxilares de ratones NOD.B10, un modelo de ratón con Síndrome de Sjögren, con el objetivo de mejorar la secreción salival (Schrader, Camden et al. 2005). En cambio otros autores han relatado que esta sobre expresión incrementa la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares como la VCAM-1 y la infiltración linfocitaria (Baker, Camden et al. 2008).

Algo similar puede ocurrir en la glándula lagrimal de pacientes con Síndrome de Sjögren, donde la expresión de receptores P2Y<sub>2</sub> puede estar aumentada con el objeto de aumentar la secreción lagrimal, pero a su vez esté provocando una infiltración linfocitaria causando la inflamación asociada al Síndrome de Sjögren. Y aunque exista una mayor concentración de dinucleótidos en la lágrima, puede que no estimulen la lacrimación por dicha infiltración linfocitaria. Serían necesarios más estudios para confirmar estas hipótesis, confirmando la sobre expresión de receptores P2Y<sub>2</sub> en la glándula lagrimal y cuál es el propósito de esa sobre expresión.

En relación a los valores encontrados con el test de Schirmer, parece sorprendente que en una patología en la que su principal signo ocular es una deficiencia en el volumen lagrimal, haya pacientes que tengan valores de secreción lagrimal por encima de los 10 mm. Otros estudios también han encontrado resultados similares (Begley, Chalmers et al. 2003; Barboza, Barboza et al. 2008). Esto probablemente se deba a que son pacientes con diferentes grados de severidad de la enfermedad o a la pobre sensibilidad del test de medida (Farris, Stuchell et al. 1981).

Disconfort, sensibilidad a la luz y sequedad son los síntomas más frecuentes y también los que se sienten con mayor intensidad en los pacientes con Síndrome de Sjögren de este estudio, lo cual coincide con los resultados de otros autores (Versura, Cellini et al. 2001). Además estos síntomas son más intensos al final del día, siendo mayor la intensidad en los pacientes con lacrimación baja. Versura y colaboradores sugieren que

los factores que aumentan la intensidad al final del día son principalmente ambientales o relacionados con las tareas propias del paciente.

Al estudiar si existe relación entre la intensidad de los síntomas y las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A, nos encontramos con que existe una tendencia a aumentar las concentraciones de dinucleótidos cuando aumenta la intensidad de los síntomas estudiados, pero que no es estadísticamente significativa. Esto probablemente se deba al limitado número de pacientes que se encuadraron en cada una de las 5 respuestas posibles sobre la intensidad del síntoma, haciendo que en algunas solo hubiera 2 o 3 pacientes. Al estudiar el Síndrome de Sjögren tenemos la limitación de reclutar más pacientes con esta patología, ya que, está considerada una enfermedad rara por su baja prevalencia ([www.enfermedades-raras.org](http://www.enfermedades-raras.org)).

### **7.3.2. Aniridia congénita.**

Como hemos descrito en la introducción, la queratopatía es una de las complicaciones más habituales en los pacientes con Aniridia congénita. Esta se produce por una deficiencia de las células Stem en el limbo esclerocorneal, que conduce a estos pacientes hasta la opacidad corneal y a un ojo seco que progresa con la edad (Tseng y Li 1996). (Jastaneiah y Al-Rajhi 2005). La prevalencia de la queratopatía en pacientes con Aniridia congénita está entre el 90% y el 100% (Kremer, Rajpal et al. 1993; Nishida, Kinoshita et al. 1995), y de ojo seco del 56% (Rivas, Murube et al. 2003). Ante estas prevalencias en dos alteraciones de la superficie ocular en las que los diadenosina polifosfatos parecen tener relevancia, se decidió estudiar que ocurre en función de la edad con las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en pacientes que padecen Aniridia congénita.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un aumento significativo con la edad, tanto de Ap<sub>4</sub>A como de Ap<sub>5</sub>A, en los pacientes con Aniridia congénita, que puede estar ligado al desarrollo de la queratopatía y el ojo seco que presentan estos pacientes.

Los pacientes con Aniridia congénita que participaron en este estudio no presentaron puntuaciones en el cuestionario de McMonnies diferentes a los sujetos del grupo control. Solamente los pacientes con más de 40 años obtuvieron puntuaciones consideradas de ojo seco marginal. Además los valores en el test de Schirmer tampoco indican una acuodeficiencia en los pacientes con Aniridia congénita por lo que las concentraciones que podríamos esperar de dinucleótidos en estos pacientes serían bastante inferiores a las encontradas. Es por tanto razonable pensar que al menos hay otro factor en estos pacientes que incrementa las concentraciones fundamentalmente de Ap<sub>4</sub>A y en menor medida de Ap<sub>5</sub>A.

Las citoqueratinas son proteínas del citoesqueleto celular que forman los filamentos intermedios de las células epiteliales y cuya función fundamental es dar estabilidad a la superficie corneal. En modelos experimentales se ha observado la expresión disminuida de la citoqueratinas 3 y 12 (reguladas por el PAX6, gen afectado en esta patología) lo que produce fragilidad en el epitelio corneal (Liu, Zhu et al. 1993; Chiambaretta, Blanchon et al. 2002). Además, existen otras moléculas de adhesión como las integrinas o cateninas, esta última también regulada por el PAX6, que están disminuidas en la Aniridia congénita, lo que provoca que aparezcan espacios entre las células epiteliales. Todas estas anomalías conducen a la manifestación clínica en pacientes con Aniridia congénita de erosiones recurrentes o defectos epiteliales persistentes (Davis, Duncan et al. 2003).

En el año 2004 se describió que el Ap<sub>4</sub>A cuando era instilado en el ojo de conejos albinos de la raza Nueva Zelanda aumentaba la velocidad de cicatrización, mejorando la integridad epitelial corneal. En este mismo estudio el Ap<sub>5</sub>A no presentaba efectos sobre la

reepitelización (Pintor, Bautista et al. 2004). Estudios *In Vitro* demostraron que el Ap<sub>4</sub>A posee la capacidad de acelerar la migración celular activando tanto la cascada de las MAPK como la cascada de RhoA / ROCK-I, ambas necesarias para el proceso de migración celular. En cambio el Ap<sub>5</sub>A haría el efecto contrario, ralentizar la migración celular (Mediero, Peral et al. 2006; Mediero, Guzman-Aranguez et al. 2008; Crooke, Mediero et al. 2009).

La acción que tienen estos dos dinucleótidos ante las erosiones corneales y el hecho de que en pacientes con Aniridia congénita se produzcan erosiones epiteliales recurrentes que aumentan su severidad con la edad nos sugiere que las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A encontradas se deben más a la progresión de la insuficiencia limbal que al ojo seco que sufren los pacientes.

Los tratamientos que se prescriben a los pacientes con Aniridia congénita dependen en gran medida del grado de queratopatía (Lee, Khan et al. 2008). Pero hay evidencias que en los casos de deficiencia limbal parcial, ésta puede cursar sin síntomas hasta que algún factor externo descompensa el equilibrio que mantiene la integridad del epitelio corneal (Rivas, Murube et al. 2003; Lopez-Garcia, Garcia-Lozano et al. 2006). Por tanto, en estos casos el tratamiento habitualmente se aplica tarde, no consiguiendo los resultados esperados. La evaluación del Ap<sub>4</sub>A podría ser de gran ayuda para conocer como progresa la queratopatía, permitiendo a los clínicos prescribir los tratamientos a tiempo, y conocer la efectividad de los mismos.

### **7.3.3. Queratocono.**

El queratocono es una patología ectásica no inflamatoria y progresiva, en la cual se produce una protrusión localizada de la curvatura de la córnea, acompañada de un adelgazamiento corneal (McMonnies 2007). Se presenta habitualmente en ambos ojos,

aunque de forma asimétrica, en la segunda década de la vida (Bron 1988). Es la ectasia corneal más común y la principal causa de trasplante de córnea en el mundo desarrollado (Lois, Kowal et al. 1997).

La causa del queratocono es probablemente multifactorial. Entre los factores más comunes asociados a la aparición del queratocono están mecanismos genéticos (Krachmer, Feder et al. 1984), alergias (Thalasselis, Taie et al. 1988), exposición a la luz ultravioleta (Cristina Kenney y Brown 2003) o el frotamiento ocular (McMonnies y Boneham 2003; Jafri, Lichter et al. 2004).

El motivo por el que se decidió estudiar las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en pacientes con queratocono es la necesidad que tienen estos pacientes por frotarse los ojos. Son diversos los estudios que relatan una alta prevalencia del frotamiento ocular en pacientes con queratocono, con porcentajes entre el 46% y el 80% de pacientes con queratocono que sienten la necesidad de frotarse los ojos (Karseras y Ruben 1976; Zadnik, Barr et al. 1998). Es probable que este frotamiento sea un estímulo mecánico para la liberación de dinucleótidos a la lágrima.

Nuestros resultados muestran un aumento significativo en las concentraciones de dinucleótidos en los pacientes con queratocono respecto al grupo control. En cuanto al resto de pruebas diagnósticas de ojo seco que se realizaron a los pacientes de queratocono, encontramos que estos pacientes obtenían puntuaciones de ojo seco marginal en el test de McMonnies. El aumento de dinucleótidos en la lágrima podría deberse a la necesidad de frotarse a los ojos pero también a la sintomatología de ojo seco que presentan estos pacientes.

Cuando se dividió el grupo de pacientes de queratocono en pacientes con la necesidad de frotarse vigorosamente los ojos y aquellos que no sentían esa necesidad,

encontramos que hay un ligero aumento en las concentraciones de dinucleótidos en aquellos que sienten la necesidad de frotarse, aunque estadísticamente la diferencia con el otro grupo no es significativa. Quizás la falta de diferencia estadística se deba a la limitación del tamaño muestral, ya que al dividir los grupos se queda con 7 y 9 pacientes cada uno de ellos. Creemos que una causa del aumento de los diadenosina polifosfatos en la lágrima de pacientes con queratocono es el frotamiento ocular pero para poder afirmarlo con seguridad se debería realizar su estudio con tamaños muestrales mayores.

Los pacientes con queratocono tienen una baja calidad visual, que va empeorando a medida que progresa el queratocono (Davis, Schechtman et al. 2006). Esta baja agudeza visual se debe principalmente a las aberraciones de alto orden que se producen por la irregularidad de la cara anterior de la córnea. Estas aberraciones no pueden ser corregidas con gafas, y por eso muchos de estos pacientes son usuarios de lentes de contacto RPG, las cuales son la mejor opción para corregir esas aberraciones de alto orden (Lembach 2003; Kymes, Walline et al. 2004; Fink, Heard et al. 2008).

Las lentes de contacto ejercen presión mecánica sobre el epitelio corneal en cada parpadeo, que podrían estimular la liberación de dinucleótidos. En un estudio piloto en el que se tomaron muestras de lágrima antes y después del porte de lentes de contacto se encontró un aumento significativo de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  (Guzman-Aranguez, Croke et al. 2007).

Al dividir el grupo de pacientes con queratocono en usuarios de lentes de contacto RPG y usuarios de gafas, encontramos que los usuarios de lentes de contacto presentaban mayores concentraciones de dinucleótidos. Al igual que ocurría con la división en función de si tenían necesidad de frotarse los ojos, las diferencias no son estadísticamente significativas, lo cual creemos que se debe también a la limitación del tamaño muestral.

Los pacientes que sentían la necesidad de frotarse los ojos o eran usuarios de lentes de contacto RPG presentaban una puntuación en el test de McMonnies de ojo seco marginal y un volumen lagrimal y un TBUT más reducido que el resto de pacientes de queratocono. Parece por tanto, que frotarse los ojos y el uso de lentes RPG son posibles factores de sequedad ocular en pacientes de queratocono.

Pero, ¿por qué los pacientes de queratocono que no son usuarios de lentes de contacto ni sienten la necesidad de frotarse los ojos muestran concentraciones de dinucleótidos más elevadas que los pacientes del grupo control? Este punto no está claro, pero barajamos varias hipótesis. Es posible que el aumento de curvatura de la cara anterior de la córnea provoque un mayor rozamiento en cada parpadeo sobre la superficie corneal que estimule la liberación de dinucleótidos. No existen estudios sobre la frecuencia de parpadeo en los pacientes de queratocono pero si se ha demostrado una menor densidad de células epiteliales, principalmente en la zona del ápex, probablemente debido a la presión del parpadeo (Weed, MacEwen et al. 2007; Niederer, Perumal et al. 2008).

Otra posibilidad es la presencia de ojo seco asociado al queratocono. Son pocas las referencias en la bibliografía científica que relacionen el queratocono con el ojo seco pero se ha descrito la presencia de citoquinas como las interleuquina-6 o la TNF- $\alpha$  y MMP-9 en la lágrima de los pacientes con queratocono (Lema y Duran 2005; Lema, Sobrino et al. 2009). Estos mediadores son muy importantes en la patogénesis del ojo seco (Li, Chen et al. 2004; Luo, Li et al. 2004; Luo, Li et al. 2005; De Paiva, Corrales et al. 2006). En otro estudio publicado en 2003, relatan una disminución del volumen lagrimal y del TBUT en los pacientes con queratocono (Dogru, Karakaya et al. 2003). Estos hallazgos nos sugieren que el aumento de las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en los pacientes con queratocono se deba a ojo seco.

#### 7.3.4. Cirugía refractiva.

En la última fase de este trabajo evaluamos las variaciones de dinucleótidos antes y durante los tres meses posteriores a la cirugía refractiva. Se escogieron pacientes que se operaron con tres técnicas muy diferenciadas. En la cirugía PRK existe un daño epitelial severo en la operación debido a su debridamiento, en el LASIK existe un mayor daño del plexo nervioso al realizar el corte con el microqueratomo y en la ICL el daño corneal es menor ya que solo se hacen pequeñas incisiones para introducir la lente en cámara anterior.

Al día siguiente de la cirugía, los pacientes que participaron en este estudio que fueron intervenidos con PRK o LASIK presentaron un aumento significativo de Ap<sub>4</sub>A, en cambio el Ap<sub>5</sub>A se mantuvo estable, incluso con una media algo inferior al pre operatorio. En el caso de los pacientes operados con ICL no se encontraron diferencias significativas ni en Ap<sub>4</sub>A ni Ap<sub>5</sub>A, aunque el Ap<sub>4</sub>A presentaba un ligero aumento ese primer día post cirugía.

Como ya se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que el Ap<sub>4</sub>A posee la capacidad de acelerar la migración. En cambio el Ap<sub>5</sub>A haría el efecto contrario, ralentizar la migración celular (Mediero, Peral et al. 2006; Mediero, Guzman-Aranguez et al. 2008; Crooke, Mediero et al. 2009). Esto nos sugiere que las altas concentraciones de Ap<sub>4</sub>A al día siguiente tienen el objetivo de acelerar el proceso de cicatrización. En el caso de la ICL, no se produce un aumento tan significativo debido a que el daño epitelial es mucho menor que en las otras dos técnicas.

Los pacientes operados con LASIK presentan concentraciones elevadas de Ap<sub>4</sub>A durante los tres meses posteriores al estudio, aunque solo estadísticamente significativas hasta el mes. Estas concentraciones son aproximadamente 2-3 veces inferiores a las que se

encontraron en los pacientes sintomáticos de ojo seco y lacrimación normal o en los pacientes con Síndrome de Sjögren y lacrimación normal.

El volumen lagrimal en estos pacientes desciende desde el primer día de la cirugía, siendo significativo su descenso a partir de las dos semanas. Estos resultados concuerdan con los mostrados por otros autores que tomaron medidas del test de Schirmer sin anestesia (Konomi, Chen et al. 2008). Este descenso de la producción lagrimal va ligado a la disminución de la sensibilidad corneal consecuencia del daño en las fibras nerviosas sensoriales de la córnea (Perez-Santonja, Sakla et al. 1999; Patel, Perez-Santonja et al. 2001; Belmonte, Acosta et al. 2004).

Esta disminución de la producción lagrimal podría explicar el ligero aumento del  $Ap_4A$ , con el objetivo de mantener el volumen lagrimal en valores normales. Sería interesante evaluar en un modelo animal que ocurriría si después del LASIK inhibiéramos la acción de estimulación del  $Ap_4A$  sobre los receptores  $P2Y_2$ .

Los pacientes de PRK e ICL presentaron concentraciones de  $Ap_4A$  similares al pre operatorio a partir de las dos semanas de la intervención. El volumen lagrimal en los pacientes de PRK aumenta significativamente el primer día después de la cirugía para volver a valores basales al mes, resultados similares a los encontrados por otros autores (Siganos, Popescu et al. 2000). El aumento al día siguiente se debe a una lacrimación refleja por el debridamiento del epitelio corneal (Lee, McLaren et al. 2002). Los pacientes de ICL no presentan apenas cambios durante los tres meses respecto a los valores de antes de la intervención quirúrgica.

Además de concentraciones de dinucleótidos y volumen lagrimal, también se valoró la estabilidad lagrimal con el TBUT y las tinciones corneales. No encontramos diferencias significativas en el TBUT en pacientes operados con LASIK durante los tres meses del

estudio, en cambio sí hubo una reducción en el caso de la PRK durante las dos primeras semanas. Algunos autores relatan un reducción del TBUT en pacientes operados con LASIK y PRK (Toda, Asano-Kato et al. 2001; Lee, Lee et al. 2005; Konomi, Chen et al. 2008), en cambio otros no encuentran diferencias significativas en el PRK ni tampoco en el LASIK (Nejima, Miyata et al. 2005; Mian, Li et al. 2009). Las tinciones aumentan durante las dos primeras semanas en el LASIK y PRK coincidiendo estos resultados con los encontrados por otros autores (Toda, Asano-Kato et al. 2001).

En los pacientes operados con ICL encontramos un ligero aumento del TBUT durante las dos primeras semanas y un descenso en las tinciones corneales. No está claro el motivo de este aumento del TBUT, aunque es posible que la limitación de la muestra sea un factor condicionante. No hemos encontrado referencias que relacionen la estabilidad lagrimal con la ICL.

Existen diversos trabajos en los que se relata el aumento de sintomatología después de la cirugía refractiva con LASIK y PRK, en los cuales la sequedad y la sensación de cuerpo extraño son los más habituales (Hovanesian, Shah et al. 2001; Albietz, Lenton et al. 2002; Solomon, Donnerfeld et al. 2004). En nuestro caso, encontramos una menor frecuencia de la sintomatología después de la cirugía refractiva, tanto en el PRK como en el LASIK. Estas diferencias en los resultados se pueden deber a varios factores. En ninguno de los trabajos anteriores al nuestro se utilizó el cuestionario de síntomas DEQ, diseñado para evaluar la frecuencia y la intensidad de un gran número de síntomas. En la mayoría de los trabajos anteriores se utilizaron cuestionarios diseñados por los mismos autores. La utilización de cuestionarios diferentes puede ser en parte causante de diferencias en los resultados. Hovanesian y colaboradores realizaron el estudio en pacientes que llevaban operados al menos 6 meses por lo que sus resultados no son comparables a los nuestros, ya que solo evaluamos los primeros tres meses (Hovanesian, Shah et al. 2001).

Otro motivo por el que no encontramos un aumento en la sintomatología después de la cirugía refractiva es la humedad relativa del ambiente en el que habitan los pacientes participantes del estudio. Se ha demostrado que una disminución del 10% en la humedad relativa del ambiente provoca un aumento de la evaporación lagrimal del 30% aumentando la sintomatología de sequedad ocular (McCulley, Aronowicz et al. 2006; Gonzalez-Garcia, Gonzalez-Saiz et al. 2007). En un estudio realizado por Assumpta Peral y colaboradores, pendiente de publicación, se comprobó que la prevalencia de ojo seco en sujetos que habitaban en una zona costera, con una alta humedad relativa, era la mitad que en sujetos que habitaban en zonas del interior peninsular. En nuestro caso, se realizó el estudio en Palma de Mallorca, una isla mediterránea donde la media anual de la humedad relativa ambiental es del 70%, y por tanto es de esperar una incidencia menor de la sintomatología de ojo seco.

La cirugía refractiva, tanto LASIK como PRK, provoca un daño neural que hace disminuir la sensibilidad corneal. Se podría esperar que ante esta hipoestesia los síntomas también disminuyeran. Se ha demostrado que durante los primeros 7-9 días después de la cirugía lo que se produce es un aumento de la sensibilidad corneal, probablemente debido a una reacción inflamatoria local (Gallar, Acosta et al. 2004). Es a partir de ese momento cuando disminuye la sensibilidad no recuperándose hasta pasados entre 3 meses y un año (Perez-Santonja, Sakla et al. 1999; Battat, Macri et al. 2001; Benítez-del-Castillo, del Rio et al. 2001; Toda, Asano-Kato et al. 2002). Durante este periodo de hipoestesia las terminaciones nerviosas que han sido dañadas son reparadas y van creciendo para inervar de nuevo toda la superficie corneal. Este crecimiento, a menudo es anómalo formando microaneuromas que transmiten señales equivocadas o exageradas de estímulos que aparentemente no existen o son demasiado leves para provocar sensación de sequedad. Esto se conoce como disestesias (Gallar, Acosta et al. 2004).

Por lo tanto, los síntomas que los pacientes de cirugía refractiva refieren como sensación de ojo seco, no reflejan necesariamente un síntoma real de discomfort y se pueden deber a una interpretación subjetiva de las disestesias provocadas por otras causas como una sequedad muy ligera que en condiciones normales no provocaría síntomas. Es posible que las condiciones ambientales de la zona geográfica donde hemos realizado el estudio, unido a la leve variación de los signos oculares de ojo seco que han presentado estos pacientes, provoque una menor incidencia de disestesias y por tanto una menor frecuencia de sintomatología. Sería interesante realizar estudios al respecto que corroboren esta hipótesis.

A tenor de resultados anteriores en los que los pacientes sintomáticos de ojo seco (clasificados así con el test de McMonnies) presentaban mayores concentraciones de dinucleótidos, se comprobó si existía relación entre algún síntoma particular de los encuestados con el DEQ antes de la cirugía refractiva y las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A. No encontramos ninguna relación entre los considerados sintomáticos y asintomáticos. Este resultado no contradice lo obtenido anteriormente con el test de McMonnies, ya que hay que recordar que este cuestionario tiene la función de describir la frecuencia e intensidad de síntomas de ojo seco y que no está diseñado para diferenciar entre pacientes sintomáticos y asintomáticos de ojo seco (Begley, Caffery et al. 2002a; Begley, Caffery et al. 2002b).

## 7.4. Perspectivas de futuro

Quizás el mayor hándicap en el diagnóstico y el tratamiento del ojo seco sea la pobre correlación entre los síntomas y los signos, haciendo complicado su manejo. Los resultados de este trabajo nos muestran a los diadenosina polifosfatos como potenciales marcadores moleculares para el ojo seco. El uso de este nuevo marcador molecular sería una herramienta clínica muy útil para el diagnóstico precoz de la enfermedad mejorando la atención a estos pacientes.

Hasta ahora la cuantificación de los dinucleótidos solo se puede realizar en laboratorio debido a que se precisa de un instrumento como el HPLC y un procesamiento de las muestras de lágrima que no sería fácil de aplicar en una consulta oftalmológica u optométrica.

En el año 2006 se patentó el diadenosina tetrafosfato como marcador de ojo seco y en la actualidad se está desarrollando un instrumento compacto para que la cuantificación de esta molécula se pueda realizar en la consulta de forma rápida y precisa.

Este trabajo abre la puerta a su continuación desde tres enfoques diferentes:

- Desde un punto de vista optométrico sería interesante evaluar que ocurre con las concentraciones de diadenosina polifosfatos en usuarios de lentes de contacto. En este trabajo además de la relación entre el ojo seco y los diadenosina polifosfatos también se ha demostrado su liberación por el estrés mecánico que sobre la superficie ocular ejerce el parpadeo y que con las lentes de contacto se ve alterado. Además, son muchos los estudios que describen el ojo seco como la principal razón para el abandono de las mismas, presentándose entre el 20% y el 70% de los portadores de lentes de contacto.

Se debería estudiar si existen diferencias en las concentraciones de Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A en función del tipo de lente de contacto, por ejemplo entre lentes permeables a los gases y lentes hidrofílicas y su relación con el ojo seco. En el caso de las lentes permeables a los gases, también se podría evaluar si los dinucleótidos son indicadores de una adaptación correcta, ya que el estrés mecánico que ejercería una lente mal adaptada, ya sea abierta o cerrada, debería ser diferente a una lente adaptada correctamente.

- Desde el punto de vista oftalmológico las líneas de investigación con estas moléculas en la superficie ocular podrían dirigirse hacia el tratamiento del ojo seco y en la determinación de un valor de corte que nos delimite la concentración, a partir de la cual se considere la presencia de ojo seco.

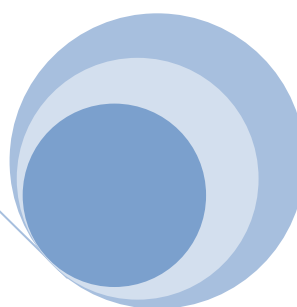
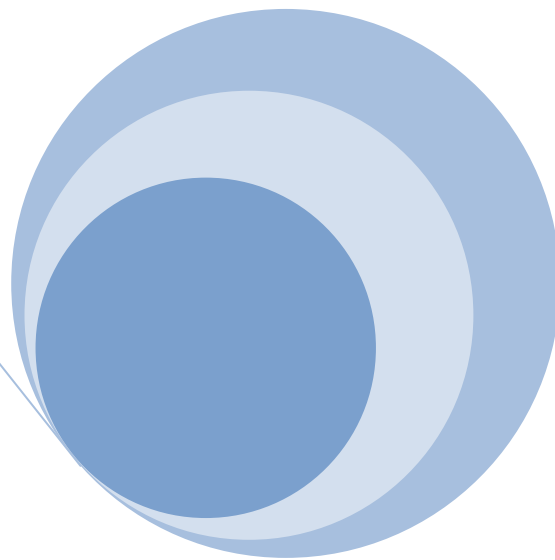
Al igual que estas moléculas se pueden utilizar para el diagnóstico de la patología, también sería interesante evaluar su utilidad para el seguimiento de los tratamientos que el oftalmólogo prescriban a su pacientes con ojo seco. Las diadenosina polifosfatos podrían ayudar, por ejemplo, a comprobar la efectividad de los tratamientos. También pueden ser de gran utilidad en la industria farmacéutica como control de eficacia en los ensayos clínicos de nuevos fármacos para el síndrome de ojo seco.

Además, existen otras patologías que presentan entre sus síntomas el ojo seco, en las que se debería estudiar las concentraciones de diadenosina polifosfatos.

- Desde el punto de vista bioquímico este trabajo abre diversas vías para la investigación. Hemos descrito que un estímulo mecánico sobre las células epiteliales es el responsable de la liberación de los dinucleótidos a la lágrima, pero no sabemos cuál es el proceso que permite la salida de estas moléculas al exterior de las células. Además, parece que el motivo por el que hay mayor concentración de dinucleótidos en la lágrima

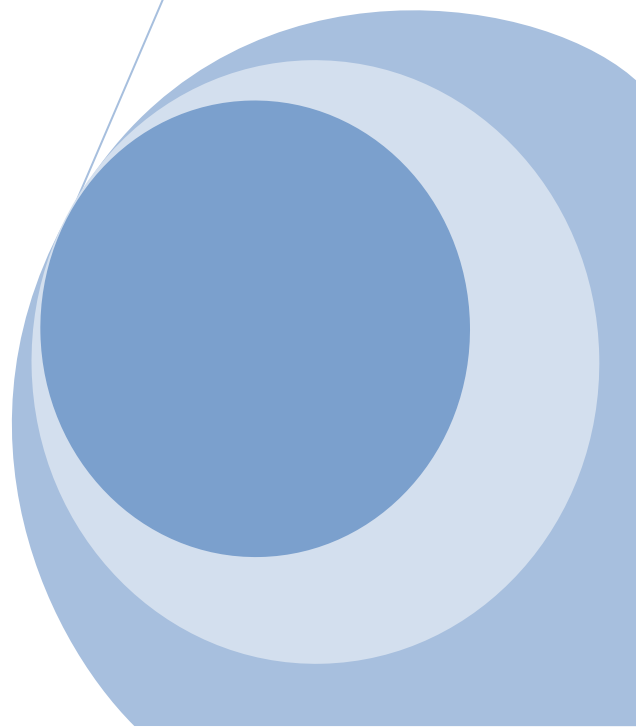
es aumentar la secreción lagrimal, pero no está claro por qué en unos casos consiguen su objetivo y en otros no.

Por tanto, sería muy interesante estudiar los mecanismos de salida de los diadenosina polifosfatos al medio extracelular después de una estimulación mecánica y también estudiar la expresión de los receptores P2Y<sub>2</sub> en las glándulas lagrimales de pacientes con diferentes severidades de ojo seco, o las posibles variedades de polimorfismos.



**8**

**Conclusiones**





## CONCLUSIONES

1.- Se ha identificado la presencia de  $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  en la lágrima humana en concentraciones microMolar, siendo el diadenosin polifosfato más representativo el  $Ap_4A$ .

2.- La concentración de  $Ap_4A$  en la lágrima se mantiene estable hasta los 50 años de edad, y a partir de ese momento aumenta significativamente, sin que haya diferencias significativas entre sexos.

3.- Se ha demostrado tanto en los experimentos *In Vitro* como *In Vivo*, que la liberación de los diadenosina polifosfatos a la película lagrimal se realiza por un estrés mecánico sobre las células epiteliales de la superficie corneal.

4.- Las concentraciones de  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  son significativamente más elevadas en sujetos sintomáticos de ojo seco que en sujetos asintomáticos de ojo seco. Además estas concentraciones también aumentan en los pacientes con Síndrome de Sjögren lo que nos indica el potencial uso del  $Ap_4A$  y  $Ap_5A$  como marcadores bioquímicos de ojo seco.

5.- Las concentraciones de  $Ap_4A$  en pacientes con Aniridia congénita aumenta significativamente con la edad, lo que concuerda con la epitelopatía corneal degenerativa que presentan estos pacientes.

**6.-** La concentración de  $Ap_4A$  tras cirugía refractiva aumenta significativamente al día siguiente de la intervención quirúrgica presumiblemente como mecanismo para acelerar la cicatrización en la superficie corneal.

**7.-** Las concentraciones de  $Ap_4A$ , al igual que el resto de parámetros de ojo seco evaluados, nos sugieren que los pacientes evaluados no padecieron ojo seco durante los primeros tres meses posteriores a la cirugía refractiva.



# 9

## Resumo em Português



## INTRODUÇÃO

Os diadenosídeos polifosfatados ou adenosina (5')polifosfo(5')adenosina. Pertencem à família dos dinucleosídeo polifosfatado, sendo formadas por duas moléculas de adenosina unidas na posição 5' com um número variável de grupos fosfatos (entre 2 a 7) cuja abreviatura utilizada é  $Ap_nA$ ,  $n=2-7$  (Miras-Portugal, Gualix et al. 1999). Encontram-se descritos seis dinucleotídeos de adenina:  $Ap_2A$ ,  $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$ ,  $Ap_5A$ ,  $Ap_6A$  e  $Ap_7A$ .

Os dinucleotídeos de adenina actuam nos receptores P2, localizados nas membranas celulares, que enviam sinais para o interior das células levando a alterações bioquímicas. Encontram-se descritos duas grandes famílias de receptores P2, aos quais se ligam os dinucleotídeos de adenina, levando à sua activação: os ionotrópicos P2X e os metabotrópicos, P2Y (Burnstock 2004).

Diversas estruturas do olho apresentam receptores P2, susceptíveis de serem activados pelo diadenosídeos polifosfatados e provocando alterações fisiológicas na glândula lacrimal, córnea, corpo ciliar, canal de Schlemm, cristalino ou retina (Cowlen, Zhang et al. 2003; Guzman-Aranguéz, Crooke et al. 2007).

A presença de diadenosídeos polifosfatados foi verificada na lágrima de coelho. Também foi verificado que a aplicação tópica de  $Ap_4A$ ,  $Ap_5A$  e  $Ap_6A$  no olho do coelho estimula a secreção de lágrimas, sendo assim um secretagogo. Na superfície ocular, o  $Ap_4A$  aumenta a velocidade de cicatrização de úlceras da córnea. Também, a pressão intraocular parece ser regulada pela acção de alguns dinucleosídeos polifosfatados.

## HIPÓTESE

A importância dos diadenosídeos polifosfatados na fisiologia ocular, nomeadamente na zona anterior do olho, encontra-se descrita. Estas moléculas foram identificadas na lágrima do coelho e foi demonstrada a sua capacidade para estimular a secreção de lágrimas quando instiladas no olho do coelho. As moléculas de  $U_p4U$ , derivadas do  $A_p4A$  foram recentemente aprovadas pela agência do medicamento do Japão para o tratamento da secura ocular ou síndrome do olho seco, devido à sua capacidade como secretagogo, estimulando a produção aquosa, mucínica e lipídica da lágrima humana (Pintor, Peral et al. 2002; Tauber, Davitt et al. 2004).

O mecanismo de libertação dos diadenosídeos polifosfatados não se encontra totalmente esclarecido. A libertação destas moléculas nos terminais nervosos (com outros neurotransmissores) foi um dos mecanismos encarado. Porém, investigações realizadas com coelhos desnervados comprovaram que este não é o principal mecanismo de libertação de diadenosídeos polifosfatados. Nas mesmas investigações, foi sugerida a possibilidade da libertação destas moléculas na lágrima resulte do estrés mecânico nas células epiteliais da superfície ocular. Srinivas e colaboradores (2002) verificaram a libertação do ATP nas células epiteliais da córnea do coelho quando sujeita a estrés mecânico (Tsubota, Hata et al. 1996; Srinivas, Mutharasan et al. 2002). Tsubota e colaboradores (2006) comprovaram um aumento da frequência do pestanejar nos pacientes com síndrome olho seco em relação ao grupo controlo (Tsubota, Hata et al. 1996; Srinivas, Mutharasan et al. 2002) Face a estes dados, considerámos a hipótese que, de uma forma idêntica ao verificado no coelho, os diadenosídeos polifosfatados estarão presentes na lágrima humana. Também, acreditámos que a libertação dos diadenosídeos polifosfatados, à semelhança do que ocorre com o ATP, resulte principalmente da fricção mecânica exercida pela pálpebra sobre a superfície ocular

durante o pestanejar e não seja libertada pelas terminações nervosas da superfície ocular.

Devido à acção como secretagogo do  $Ap_4A$  quando instilado no olho, acreditámos que os diadenosídeos polifosfatados presentes na lágrima possuem uma função relevante na secreção lacrimal. Também acreditámos que a sua presença se relaciona com o pestanejar. Considerando as conclusões das investigações de Tsubota e colaboradores (2006) considerámos a hipótese de existirem diferenças nas concentrações de diadenosídeos polifosfatados nos casos de pessoas com síndrome de olho seco, podendo ser considerados como marcadores moleculares desta patologia.

## **OBJECTIVOS**

Os objectivos desta investigação são:

- 1- Identificar a presença de diadenosídeos polifosfatados na lágrima humana e determinar se existem diferenças de concentração das mesmas em função da idade e do sexo.
- 2- Determinar o mecanismo de libertação dos diadenosídeos polifosfatados na lágrima humana.
- 3- Avaliar as concentrações de diadenosídeos polifosfatados em diferentes graus de severidade da síndrome de olhos secos, em patologias de olho seco e em pacientes sujeitos a intervenção cirúrgica refractiva com o objectivo de determinar a sua potencial utilização como marcadores moleculares desta patologia.

## MÉTODOS

Este trabalho dividiu-se em três fases perfeitamente diferenciadas (Figura 5.1):

1ª fase – Na primeira fase deste trabalho pretendeu verificar a presença de diadenosídeos polifosfatados na lágrima humana. Para tal, foi realizado um estudo descritivo. Após verificação da presença de diadenosídeos polifosfatados na lágrima humana (consultar resultados), alargou-se a população do estudo para faixas etárias mais elevadas com o intuito de verificar uma possível correlação entre as concentrações de diadenosídeos polifosfatados e a idade.

2ª fase – A segunda fase deste trabalho dividiu-se em duas etapas:

Na primeira etapa pretendia comprovar se o mecanismo de libertação dos diadenosídeos polifosfatados resulta do estrés mecânico sobre as células epiteliais da córnea. Foram realizados ensaios *in Vitro* e *in Vivo*.

Na segunda etapa realizou-se um estudo prospectivo de caso-controlo para relacionar as concentrações de diadenosídeos polifosfatados, nomeadamente o Ap<sub>4</sub>A e o Ap<sub>5</sub>A, com a sintomatologia da síndrome do olho seco. Também, foi estudada a causa a libertação dos diadenosídeos polifosfatados na lágrima: o efeito mecânico sobre a superfície ocular ou a estimulação mecânica dos terminais nervosos da córnea.

3ª fase – Considerando os resultados obtidos na segunda fase deste trabalho, foi estudada a relação entre as concentrações de Ap<sub>4</sub>A e Ap<sub>5</sub>A com: as patologias relacionadas com o síndrome do olho seco (Aniridia congénita e síndrome de Sjögren); ceratocones e em pacientes sujeitos a cirurgias refractiva.

No caso dos pacientes sujeitos a cirurgias refractiva foi estudada a variação das concentrações de diadenosídeos polifosfatados antes da cirurgia e nos três meses seguintes, com recurso a um estudo prospectivo longitudinal.

Os resultados das análises complementares às concentrações de diadenosídeos polifosfatados encontram-se na tabela 5.6.

As análises às amostras de lágrima foram realizadas utilizando cromatografia líquida de alta resolução (HPCL). As análises estatísticas foram realizadas com recurso ao software informático SPSS 15.0.

## RESULTADOS

Na primeira fase deste trabalho foram identificados três diadenosídeos polifosfatados na lágrima humana: Ap<sub>3</sub>A; Ap<sub>4</sub>A e Ap<sub>5</sub>A. O Ap<sub>4</sub>A é o diadenosídeo polifosfatado presente em maior concentração  $0,108 \pm 0,018 \mu\text{M}$  em condições normais, sem utilização de anestésico (tabela 6.5). Verificou-se que as concentrações de Ap<sub>3</sub>A se encontravam no limite de detecção do HPLC, pelo que apenas foram determinadas as concentrações de Ap<sub>4</sub>A e Ap<sub>5</sub>A.

Não foram verificadas diferenças nas concentrações dos diadenosídeos polifosfatados estudados entre ambos sexos (tabela 6.5). Porém, verificaram-se concentrações de Ap<sub>4</sub>A mais elevadas a partir dos 50 anos de idade (tabela 6.4).

Em relação à segunda fase do trabalho, foram encontradas concentrações de Ap<sub>4</sub>A e Ap<sub>5</sub>A mais elevadas em pacientes com síndrome de olho seco, tanto nos que apresentavam um volume de lágrima normal, como nos que apresentavam um volume de lágrima reduzido (tabela 6.7).

Ao investigar o mecanismo de libertação destes diadenosídeos polifosfatados na lágrima, deparámo-nos com o facto das suas concentrações aumentarem significativamente, com o aumento da frequência do pestanejar. Porém, as concentrações dos diadenosídeos polifosfatados estudados não aumentavam com a estimulação mecânica sobre os terminais nervosos, utilizando para o efeito um estesiómetro (tabelas 6.09 e 6.10). Nos ensaios *In Vivo*, também se verificaram concentrações de Ap<sub>4</sub>A e Ap<sub>5</sub>A mais elevadas após estimulação mecânica das células epiteliais.

Na terceira fase deste trabalho, estudaram-se duas patologias associadas à síndrome de olho seco, a síndrome de Sjögren e a Aniridia congénita. Em ambos os casos as concentrações dos diadenosídeos polifosfatados em estudo eram mais elevadas nos

pacientes com maior severidade na sintomatologia da síndrome de olho seco (tabelas 6.13 e 6.19).

Nos pacientes com ceratocones, que esfregam os olhos com força devido à sua patologia, verificaram-se concentrações de Ap<sub>4</sub>A e Ap<sub>5</sub>A elevadas em relação ao esperado (tabela 6.22) que apoiam os resultados obtidos na segunda fase deste trabalho. Por último, analisou-se a evolução das concentrações destes diadenosídeos polifosfatados antes e durante os três meses posteriores a uma cirurgia refractiva com LASIK, PRK e ICL. Nos três tipos de cirurgia, os resultados obtidos foram semelhantes. No caso do Ap<sub>5</sub>A não se verificaram variações de concentração ao longo de todo o estudo. Em relação ao Ap<sub>4</sub>A, a concentração do mesmo aumentou significativamente no dia seguinte à intervenção cirúrgica. A concentração do Ap<sub>4</sub>A regressou para valores idênticos aos pré-operatórios às duas semanas no caso das cirurgias tipo PRK e ICL (tabelas 6.27 e 6.30). No caso da intervenção cirúrgica tipo LASIK, as concentrações de AP<sub>4</sub>A regressaram para valores pré-operatórios ao fim de três meses (Tabela 6.33). Nas análises realizadas no pré-operatório aos pacientes de cirurgia refractiva, não foi possível estabelecer uma relação entre as concentrações de diadenosídeos polifosfatados e a frequência com que os sintomas são manifestados.

## CONCLUSÕES

- 1- Verificou-se a presença de  $Ap_3A$ ,  $Ap_4A$  e  $Ap_5A$  na lágrima humana em concentrações microMolar, sendo o diadenosídeos polifosfatados mais representativo o  $Ap_4A$ .
- 2- A concentração de  $Ap_4A$  na lágrima mantém-se estável até aos 50 anos de idade, aumentando significativamente a partir dessa idade. Porém, não se verifica diferenças estatisticamente significativas entre sexos.
- 3- Os ensaios realizados, *In Vivo* e *In Vitro*, demonstraram que a libertação dos diadenosídeos polifosfatados na película lacrimal resulta do estrés mecânico exercido nas células epiteliais da superfície da córnea.
- 4- As concentrações de  $Ap_4A$  e  $Ap_5A$  são significativamente mais elevadas em pessoas com síndrome do olho seco do que em pessoas sem esta patologia. Também, as concentrações aumentam nos pacientes com Síndrome de Sjogren, o que pode sugerir-nos o potencial uso do  $Ap_4A$  e  $Ap_5A$  como marcadores bioquímicos da síndrome do olho seco.
- 5- As concentrações do  $Ap_4A$  e  $Ap_5A$  em pacientes com Aniridia congénita aumenta significativamente com a idade, dados concordantes com a epiteliopatia degenerativa da córnea e a síndrome de olhos secos que estes pacientes apresentam.
- 6- A concentração de  $Ap_4A$  aumenta significativamente no dia seguinte a cirurgia refractiva, o que permite acelerar a cicatrização da superfície da córnea.

7- As concentrações de  $Ap_4A$ , e os outros parâmetros de síndrome de olhos secos analisados, sugerem-nos que os pacientes avaliados não apresentaram secura ocular durante os três meses posteriores à intervenção cirúrgica refractiva.



A decorative graphic on the right side of the page. It features three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. Two thin, light blue lines intersect at the top left and extend diagonally across the page, framing the circles.

**10**

**Bibliografía**



[Not authors listed] (2007a). "The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)." *Ocul Surf* 5(2): 75-92.

[Not authors listed] (2007b). "The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)." *Ocul Surf* 5(2): 93-107.

[Not authors listed] (2007c). "Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)." *Ocul Surf* 5(2): 108-52.

Abelson, M. B., Ousler, G. W., 3rd, Nally, L. A., et al. (2002). "Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations." *Adv Exp Med Biol* 506(Pt B): 1121-5.

Acosta, M. C., Belmonte, C., Gallar, J. (2001). "Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea." *J Physiol* 534(Pt. 2): 511-25.

Acosta, M. C., Peral, A., Luna, C., et al. (2004). "Tear secretion induced by selective stimulation of corneal and conjunctival sensory nerve fibers." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7): 2333-6.

Aguilar, J. S., Reyes, R., Asensio, A. C., et al. (2001). "Ectoenzymatic breakdown of diadenosine polyphosphates by *Xenopus laevis* oocytes." *Eur J Biochem* 268(5): 1289-97.

Akinci, A., Cetinkaya, E., Aycan, Z. (2007). "Dry eye syndrome in diabetic children." *Eur J Ophthalmol* 17(6): 873-8.

Albietz, J. M., Bruce, A. S. (2001). "The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: effect of preserved and non-preserved topical treatments." *Curr Eye Res* 22(1): 8-18.

Albietz, J. M., Lenton, L. M., McLennan, S. G. (2002). "Effect of laser in situ keratomileusis for hyperopia on tear film and ocular surface." *J Refract Surg* 18(2): 113-23.

Alves, M., Dias, A. C., Rocha, E. M. (2008). "Dry eye in childhood: epidemiological and clinical aspects." *Ocul Surf* 6(1): 44-51.

Alves Mde, C., Carvalheira, J. B., Modulo, C. M., et al. (2008). "Tear film and ocular surface changes in diabetes mellitus." *Arq Bras Oftalmol* 71(6 Suppl): 96-103.

Ambrosio, R., Jr., Tervo, T., Wilson, S. E. (2008). "LASIK-associated dry eye and neurotrophic epitheliopathy: pathophysiology and strategies for prevention and treatment." *J Refract Surg* 24(4): 396-407.

Armitage, P., Berry, G. (1994). *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Scientific.

Azarisman, S. M., Heselynn, H. (2007). "Systemic lupus erythematosus presenting as parotitis and secondary Sjögren's syndrome." *Singapore Med J* 48(2): e60-1.

Bacon, A. S., Astin, C., Dart, J. K. (1994). "Silicone rubber contact lenses for the compromised cornea." *Cornea* 13(5): 422-8.

Bailey, M. D., Mitchell, G. L., Dhaliwal, D. K., et al. (2004). "Reasons patients recommend laser in situ keratomileusis." *J Cataract Refract Surg* 30(9): 1861-6.

Baker, O. J., Camden, J. M., Rome, D. E., et al. (2008). "P2Y2 nucleotide receptor activation up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 [corrected] expression and enhances lymphocyte adherence to a human submandibular gland cell line." *Mol Immunol* 45(1): 65-75.

Ballerini, P., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., et al. (2002). "Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release." *Neuroreport* 13(14): 1789-92.

Barabino, S., Rolando, M., Camicione, P., et al. (2003). "Systemic linoleic and gamma-linoleic acid therapy in dry eye syndrome with an inflammatory component." *Córnea* 22(2): 97-101.

Barboza, M. N., Barboza, G. N., de Melo, G. M., et al. (2008). "[Correlation between signals and symptoms of dry eye in Sjögren's syndrome patients]." *Arq Bras Oftalmol* 71(4): 547-52.

Barr, J. T., Schechtman, K. B., Fink, B. A., et al. (1999). "Corneal scarring in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: baseline prevalence and repeatability of detection." *Cornea* 18(1): 34-46.

Battat, L., Macri, A., Dursun, D., et al. (2001). "Effects of laser in situ keratomileusis on tear production, clearance, and the ocular surface." *Ophthalmology* 108(7): 1230-5.

Baxter, S. A., Laibson, P. R. (2004). "Punctal plugs in the management of dry eyes." *Ocul Surf* 2(4): 255-65.

Begley, C. G., Caffery, B., Chalmers, R. L., et al. (2002a). "Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye." *Cornea* 21(7): 664-70.

Begley, C. G., Caffery, B., Nichols, K., et al. (2002b). "Results of a dry eye questionnaire from optometric practices in North America." *Adv Exp Med Biol* 506(Pt B): 1009-16.

Begley, C. G., Caffery, B., Nichols, K. K., et al. (2000). "Responses of contact lens wearers to a dry eye survey." *Optom Vis Sci* 77(1): 40-6.

Begley, C. G., Chalmers, R. L., Abetz, L., et al. (2003). "The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(11): 4753-61.

Begley, C. G., Chalmers, R. L., Mitchell, G. L., et al. (2001). "Characterization of ocular surface symptoms from optometric practices in North America." *Cornea* 20(6): 610-8.

Belfort, R., Campos, M., Hoexter, M. Q., et al. (2008). "[The impact of photorefractive excimer laser keratectomy (PRK) and laser in situ keratomileusis (LASIK) on visual quality and life in patients with ametropias]." *Arq Bras Oftalmol* 71(1): 83-9.

Belmonte, C., Acosta, M. C., Gallar, J. (2004). "Neural basis of sensation in intact and injured corneas." *Exp Eye Res* 78(3): 513-25.

- Belmonte, C., Acosta, M. C., Schmelz, M., et al. (1999). "Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO<sub>2</sub> esthesiometer." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(2): 513-9.
- Benelli, U., Nardi, M., Posarelli, C., et al. (2010). "Tear osmolarity measurement using the TearLab Osmolarity System in the assessment of dry eye treatment effectiveness." *Cont Lens Anterior Eye* 33(2): 61-7.
- Benham, C. D. (1990). "ATP-gated channels in vascular smooth muscle cells." *Ann N Y Acad Sci* 603: 275-285.
- Benítez-del-Castillo, J. M., del Rio, T., Iradier, T., et al. (2001). "Decrease in tear secretion and corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis." *Cornea* 20(1): 30-2.
- Bielory, L. (2006). "Ocular toxicity of systemic asthma and allergy treatments." *Curr Allergy Asthma Rep* 6(4): 299-305.
- Birlik, M., Akar, S., Gurler, O., et al. (2009). "Prevalence of primary Sjögren's syndrome in Turkey: a population-based epidemiological study." *Int J Clin Pract* 63(6): 954-61.
- Bloch, K. J., Buchanan, W. W., Wohl, M. J., et al. (1965). "Sjögren's syndrome. A clinical, pathological, and serological study of sixty-two cases." *Medicine (Baltimore)* 44: 187.
- Boeynaems, J. M., Communi, D., Gonzalez, N. S., et al. (2005). "Overview of the P<sub>2</sub> receptors." *Semin Thromb Hemost* 31(2): 139-49.
- Boeynaems, J. M., van Giezen, H., Savi, P., et al. (2005). "P<sub>2Y</sub> receptor antagonists in thrombosis." *Curr Opin Investig Drugs* 6(3): 275-82.
- Bolstad, A. I., Jonsson, R. (2002). "Genetics aspects of Sjögren's syndrome." *Arthritis Rheum* 4: 353-359.
- Bourcier, T., Acosta, M. C., Borderie, V., et al. (2005). "Decreased corneal sensitivity in patients with dry eye." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(7): 2341-5.
- Brandle, U., Guenther, E., Irrle, C., et al. (1998). "Gene expression of the P<sub>2X</sub> receptors in the rat retina." *Brain Res Mol Brain Res* 59(2): 269-72.

- Brandle, U., Kohler, K., Wheeler-Schilling, T. H. (1998). "Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina." *Brain Res Mol Brain Res* 62(1): 106-9.
- Branson, K. M., Mertens, H. D., Swarbrick, J. D., et al. (2009). "Discovery of inhibitors of lupin diadenosine 5',5''-P(1),P(4)-tetrphosphate hydrolase by virtual screening." *Biochemistry* 48(32): 7614-20.
- Bremond-Gignac, D. (2007). "[Glaucoma in aniridia]." *J Fr Ophtalmol* 30(2): 196-9.
- Brignole, F., Pisella, P. J., De Saint Jean, M., et al. (2001). "Flow cytometric analysis of inflammatory markers in KCS: 6-month treatment with topical cyclosporin A." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(1): 90-5.
- Brignole, F., Pisella, P. J., Goldschild, M., et al. (2000). "Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6): 1356-63.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Uhlmann, S., et al. (2002). "Membrane conductance of Muller glial cells in proliferative diabetic retinopathy." *Can J Ophthalmol* 37(4): 221-7.
- Bron, A. J. (1988). "Keratoconus." *Cornea* 7(3): 163-9.
- Bron, A. J., Evans, V. E., Smith, J. A. (2003). "Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests." *Cornea* 22(7): 640-50.
- Bron, A. J., Tiffany, J. M. (2004). "The contribution of meibomian disease to dry eye." *Ocul Surf* 2(2): 149-65.
- Buell, G., Lewis, C., Collo, G., et al. (1996). "An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain." *EMBO J* 15(1): 55-62.
- Bukhari, A., Ajlan, R., Alsaggaf, H. (2009). "Prevalence of dry eye in the normal population in Jeddah, Saudi Arabia." *Orbit* 28(6): 392-7.
- Burnstock, G. (2004). "Introduction: P2 receptors." *Curr Top Med Chem* 4(8): 793-803.

Burnstock, G., Kennedy, C. (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?" *Gen Pharmacol* 16: 433-440.

Caffery, B. E., Richter, D., Simpson, T., et al. (1998). "CANDEES. The Canadian Dry Eye Epidemiology Study." *Adv Exp Med Biol* 438: 805-6.

Cao, Z., Said, N., Amin, S., et al. (2002). "Galectin-3 and -, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds." *J Biol Chem* 277(44): 42299-42305.

Castro, E., Pintor, J., Miras-Portugal, M. T. (1992). "Ca(2+)-stores mobilization by diadenosine tetraphosphate, Ap4A, through a putative P2Y purinoceptor in adrenal chromaffin cells." *Br J Pharmacol* 106(4): 833-7.

Castro, E., Torres, M., Miras-Portugal, M. T., et al. (1990). "Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells." *Br J Pharmacol* 100(2): 360-4.

Collison, D. J., Duncan, G. (2001). "Regional differences in functional receptor distribution and calcium mobilization in the intact human lens." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10): 2355-63.

Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., et al. (2001). "Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i)." *J Biol Chem* 276(44): 41479-85.

Communi, D., Motte, S., Boeynaems, J. M., et al. (1996). "Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor." *Eur J Pharmacol* 317(2-3): 383-9.

Communi, D., Suarez-Huerta, N., Dussosoy, D., et al. (2001). "Cotranscription and intergenic splicing of human P2Y11 and SSF1 genes." *J Biol Chem* 276(19): 16561-6.

Cowlen, M. S., Zhang, V. Z., Warnock, L., et al. (2003). "Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by in situ hybridization." *Exp Eye Res* 77(1): 77-84.

Cressman, V. L., Lazarowski, E., Homolya, L., et al. (1999). "Effect of loss of P2Y(2) receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl(-) transport." *J Biol Chem* 274(37): 26461-8.

Cristina Kenney, M., Brown, D. J. (2003). "The cascade hypothesis of keratoconus." *Cont Lens Anterior Eye* 26(3): 139-46.

Crooke, A., Mediero, A., Guzman-Aranguez, A., et al. (2009). "Silencing of P2Y2 receptor delays Ap4A-corneal re-epithelialization process." *Mol Vis* 15: 1169-78.

Crosson, C. E., Yates, P. W., Bhat, A. N., et al. (2004). "Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells." *J Pharmacol Exp Ther* 309(2): 484-9.

Cha, S. H., Hahn, T. W., Sekine, T., et al. (2000). "Purinoreceptor-mediated calcium mobilization and cellular proliferation in cultured bovine corneal endothelial cells." *Jpn J Pharmacol* 82: 181-187.

Chambers, J., McDonald, L. E., Sarau, H. M., et al. (2000). "A G protein-coupled receptor for UDP-glucose." *J Biol Chem* 275(10767-10771).

Chang, Y. S., Huang, F. C., Tseng, S. H., et al. (2007). "Erythema multiforme, Stevens-Johnson syndrome, and toxic epidermal necrolysis: acute ocular manifestations, causes, and management." *Cornea* 26(2): 123-9.

Chen, J. J., Rao, K., Pflugfelder, S. C. (2009). "Corneal epithelial opacity in dysfunctional tear syndrome." *Am J Ophthalmol* 148(3): 376-82.

Chen, S., Sears, M. (1997). "A low conductance chloride channel in the basolateral membranes of the non-pigmented ciliary epithelium of the rabbit eye." *Curr Eye Res* 16: 710-718.

Chia, E. M., Mitchell, P., Rochtchina, E., et al. (2003). "Prevalence and associations of dry eye syndrome in an older population: the Blue Mountains Eye Study." *Clin Experiment Ophthalmol* 31(3): 229-32.

Chiambaretta, F., Blanchon, L., Rabier, B., et al. (2002). "Regulation of corneal keratin-12 gene expression by the human Kruppel-like transcription factor 6." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(11): 3422-9.

Churchill, A., Booth, A. (1996). "Genetics of aniridia and anterior segment dysgenesis." *Br J Ophthalmol* 80(7): 669-73.

- Damato, B. E., Allan, D., Murray, S. B., et al. (1984). "Senile atrophy of the human lacrimal gland: the contribution of chronic inflammatory disease." *Br J Ophthalmol* 68(9): 674-80.
- Dart, J. (2005). "Cicatricial pemphigoid and dry eye." *Semin Ophthalmol* 20(2): 95-100.
- Davis, J., Duncan, M. K., Robison, W. G., Jr., et al. (2003). "Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion." *J Cell Sci* 116(Pt 11): 2157-67.
- Davis, L. J., Schechtman, K. B., Wilson, B. S., et al. (2006). "Longitudinal changes in visual acuity in keratoconus." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(2): 489-500.
- De Paiva, C. S., Corrales, R. M., Villarreal, A. L., et al. (2006). "Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye." *Exp Eye Res* 83(3): 526-35.
- DeCarlo, D. K., Penner, S. L., Schamerloh, R. J., et al. (1995). "Dry eye among males infected with the human immunodeficiency virus." *J Am Optom Assoc* 66(9): 533-8.
- Defreyn, A., Maugery, J., Chabrier, S., et al. (2007). "[Gillespie syndrome: an uncommon presentation of congenital aniridia]." *J Fr Ophtalmol* 30(1): e1.
- Diago, T., Harto, M., Serra, I., et al. (2009). "[Aniridia, congenital glaucoma and white corneas in a newborn baby]." *Arch Soc Esp Oftalmol* 84(11): 573-6.
- Doane, M. G. (1980). "Interactions of eyelids and tears in corneal wetting and the dynamics of the normal human eye blink." *Am J Ophthalmol* 89(4): 507-16.
- Dogru, M., Karakaya, H., Ozcetin, H., et al. (2003). "Tear function and ocular surface changes in keratoconus." *Ophthalmology* 110(6): 1110-8.
- Donate, J., Benítez del Castillo, J. M., Fernandez, C., et al. (2002). "[Validation of a questionnaire for the diagnosis of dry eye]." *Arch Soc Esp Oftalmol* 77(9): 493-500.
- Dougherty, J. M., McCulley, J. P., Silvany, R. E., et al. (1991). "The role of tetracycline in chronic blepharitis. Inhibition of lipase production in staphylococci." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(11): 2970-5.

Doughty, M. J., Blades, K. A., Ibrahim, N. (2002). "Assessment of the number of eye symptoms and the impact of some confounding variables for office staff in non-air-conditioned buildings." *Ophthalmic Physiol Opt* 22(2): 143-55.

Doughty, M. J., Fonn, D., Richter, D., et al. (1997). "A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients presenting to optometric practices across Canada." *Optom Vis Sci* 74(8): 624-31.

Dua, H. S., Saini, J. S., Azuara-Blanco, A., et al. (2000). "Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management." *Indian J Ophthalmol* 48(2): 83-92.

Duarte, M. C., Pinto, N. T., Moreira, H., et al. (2007). "[Total testosterone level in postmenopausal women with dry eye]." *Arq Bras Oftalmol* 70(3): 465-9.

Dursun, D., Ertan, A., Bilezikci, B., et al. (2003). "Ocular surface changes in keratoconjunctivitis sicca with silicone punctum plug occlusion." *Curr Eye Res* 26(5): 263-9.

Eden, U., Iggman, D., Riise, R., et al. (2008). "Epidemiology of aniridia in Sweden and Norway." *Acta Ophthalmol* 86(7): 727-9.

Edwards, F. A., Gibb, A. J. (1993). "ATP-a fast neurotransmitter." *FEBS Lett* 325(1-2): 86-89.

Eldred, J. A., Sanderson, J., Wormstone, M., et al. (2003). "Stress-induced ATP release from and growth modulation of human lens and retinal pigment epithelial cells." *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1213-5.

Ellemann, K., Krogh, E., Arlien-Soeborg, P., et al. (1991). "Sjögren's syndrome in patients with multiple sclerosis." *Acta Neurol Scand* 84(1): 68-9.

Erdem, U., Ozdegirmenci, O., Sobaci, E., et al. (2007). "Dry eye in post-menopausal women using hormone replacement therapy." *Maturitas* 56(3): 257-62.

Evans, R. J., Lewis, C., Virginio, C., et al. (1996). "Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells." *J Physiol* 497 ( Pt 2): 413-22.

Farahbakhsh, N. A., Cilluffo, M. C. (2002). "P2 purinergic receptor-coupled signaling in the rabbit ciliary body epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(7): 2317-25.

Farris, R. L., Stuchell, R. N., Mandel, I. D. (1981). "Basal and reflex human tear analysis. I. Physical measurements: osmolarity, basal volumes, and reflex flow rate." *Ophthalmology* 88(8): 852-7.

Farris, R. L., Stuchell, R. N., Mandel, I. D. (1986). "Tear osmolarity variation in the dry eye." *Trans Am Ophthalmol Soc* 84: 250-68.

Fink, B., Heard, C., Schafer, J., et al. (2008). "Fluorescein pattern interpretation in keratoconus." *Optom Vis Sci* 85(10): E939-46.

Fischbach, B. V., Trout, K. L., Lewis, J., et al. (2005). "WAGR syndrome: a clinical review of 54 cases." *Pediatrics* 116(4): 984-8.

Flodgaard, H., Klenow, H. (1982). "Abundant amounts of diadenosine 5',5''-P1,P4-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets." *Biochem J* 208(3): 737-42.

Fox, R. I. (2005). "Sjögren's syndrome." *Lancet* 366: 321-31.

Franck, C. (1986). "Eye symptoms and signs in buildings with indoor climate problems ('office eye syndrome')." *Acta Ophthalmol (Copenh)* 64(3): 306-11.

Fries, J. E., Goczalik, I. M., Wheeler-Schilling, T. H., et al. (2005). "Identification of P2Y receptor subtypes in human Muller glial cells by physiology, single cell RT-PCR, and immunohistochemistry." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(8): 3000-7.

Fries, J. E., Wheeler-Schilling, T. H., Guenther, E., et al. (2004a). "Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptor subtypes in the rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(10): 3410-7.

Fries, J. E., Wheeler-Schilling, T. H., Kohler, K., et al. (2004b). "Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single-cell RT-PCR study." *Brain Res Mol Brain Res* 130(1-2): 1-6.

Fullard, R. J., Snyder, C. (1990). "Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(6): 1119-26.

Gallar, J., Acosta, M. C., Moilanen, J. A., et al. (2004). "Recovery of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation after laser in situ keratomileusis." *J Refract Surg* 20(3): 229-35.

Geerling, G., Daniels, J. T., Dart, J. K., et al. (2001). "Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(5): 948-56.

Gilbard, J. P., Farris, R. L. (1983). "Ocular surface drying and tear film osmolarity in thyroid eye disease." *Acta Ophthalmol (Copenh)* 61(1): 108-16.

Glaser, T., Ton, C. C., Mueller, R., et al. (1994). "Absence of PAX6 gene mutations in Gillespie syndrome (partial aniridia, cerebellar ataxia, and mental retardation)." *Genomics* 19(1): 145-8.

Gomes, P., Srinivas, S. P., Vereecke, J., et al. (2005). "ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1): 104-13.

Gonzalez-Garcia, M. J., Gonzalez-Saiz, A., de la Fuente, B., et al. (2007). "Exposure to a controlled adverse environment impairs the ocular surface of subjects with minimally symptomatic dry eye." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(9): 4026-32.

Gonzalez-Meijome, J. M., Parafita, M. A., Yebra-Pimentel, E., et al. (2007). "Symptoms in a population of contact lens and noncontact lens wearers under different environmental conditions." *Optom Vis Sci* 84(4): 296-302.

Goto, T., Zheng, X., Klyce, S. D., et al. (2003). "A new method for tear film stability analysis using videokeratography." *Am J Ophthalmol* 135(5): 607-12.

- Graham, E. M. (1986). "Differential diagnosis of ocular sarcoidosis." *Sarcoidosis* 3(1): 34-9.
- Greenwood, D., Yao, W. P., Housley, G. D. (1997). "Expression of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel in the retina." *Neuroreport* 8(5): 1083-8.
- Grygorczyk, R., Hanrahan, J. W. (1997). "CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli." *Am J Physiol* 272(3 Pt 1): C1058-66.
- Gundorova, R. A., Brikman, I. V., Ibadova, S., et al. (1994). "Stimulation of penetrating corneal wound healing by exogenous fibronectin." *Eur J Ophthalmol* 4(4): 202-210.
- Guyot, A., Hanrahan, J. W. (2002). "ATP release from human airway epithelial cells studied using a capillary cell culture system." *J Physiol* 545(Pt 1): 199-206.
- Guzman-Aranguez, A., Crooke, A., Peral, A., et al. (2007). "Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics." *Prog Retin Eye Res* 26(6): 674-87.
- Hagan, S., Lory, B. (1998). "Prevalence of dry eye among computer users." *Optom Vis Sci* 75(10): 712-3.
- Haugen, A. J., Peen, E., Hulten, B., et al. (2008). "Estimation of the prevalence of primary Sjögren's syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria: the Hordaland Health Study." *Scand J Rheumatol* 37(1): 30-4.
- Hayashi, Y., Arakaki, R., Ishimaru, N. (2003). "The role of caspase cascade on the development of primary Sjögren's syndrome." *J Med Invest* 50(1-2): 32-8.
- Heigle, T. J., Pflugfelder, S. C. (1996). "Aqueous tear production in patients with neurotrophic keratitis." *Cornea* 15(2): 135-8.
- Hohage, H., Reinhardt, C., Borucki, U., et al. (1996). "Effects of diadenosine polyphosphates on renal function and blood pressure in anesthetized Wistar rats." *J Am Soc Nephrol* 7(8): 1216-22.

Hollah, P., Hausberg, M., Kosch, M., et al. (2001). "A novel assay for determination of diadenosine polyphosphates in human platelets: studies in normotensive subjects and in patients with essential hypertension." *J Hypertens* 19(2): 237-45.

Holland, E. J., Djalilian, A. R., Schwartz, G. S. (2003). "Management of aniridic keratopathy with keratolimbal allograft: a limbal stem cell transplantation technique." *Ophthalmology* 110(1): 125-30.

Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., et al. (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." *Nature* 409(6817): 202-7.

Homolya, L., Steinberg, T. H., Boucher, R. C. (2000). "Cell to cell communication in response to mechanical stress via bilateral release of ATP and UTP in polarized epithelia." *J Cell Biol* 150(6): 1349-60.

Hosoya, K., Ueda, H., Kim, K. J., et al. (1999). "Nucleotide stimulation of Cl(-) secretion in the pigmented rabbit conjunctiva." *J Pharmacol Exp Ther* 291(1): 53-9.

Hovanesian, J. A., Shah, S. S., Maloney, R. K. (2001). "Symptoms of dry eye and recurrent erosion syndrome after refractive surgery." *J Cataract Refract Surg* 27(4): 577-84.

Hoyle, C. H. (1990). "Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function." *Gen Pharmacol* 21(6): 827-31.

Hoyle, C. H., Hilderman, R. H., Pintor, J., et al. (1990). "Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function?" *Drug Dev Res* 52: 260-273

Hoyle, C. H., Peral, A., Pintor, J. (2006). "Melatonin potentiates tear secretion induced by diadenosine tetraphosphate in the rabbit." *Eur J Pharmacol* 552(1-3): 159-61.

Humphrey, P. P., Buell, G., Kennedy, I., et al. (1995). "New insights on P2X purinoceptors." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352(6): 585-96.

Imaizumi, K. (2000). "[Aniridia-Wilms tumor association]." *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*(30 Pt 5): 327-8.

Jaanus, S. D. (1992). "Ocular side effects of selected systemic drugs." *Optom Clin* 2(4): 73-96.

Jabbur, N. S., Sakatani, K., O'Brien, T. P. (2004). "Survey of complications and recommendations for management in dissatisfied patients seeking a consultation after refractive surgery." *J Cataract Refract Surg* 30(9): 1867-74.

Jafri, B., Lichter, H., Stulting, R. D. (2004). "Asymmetric keratoconus attributed to eye rubbing." *Cornea* 23(6): 560-4.

Jankowski, J., Jankowski, V., Laufer, U., et al. (2003). "Identification and quantification of diadenosine polyphosphate concentrations in human plasma." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(7): 1231-8.

Jarvis, M. F., Khakh, B. S. (2009). "ATP-gated P2X cation-channels." *Neuropharmacology* 56(1): 208-15.

Jastaneiah, S., Al-Rajhi, A. A. (2005). "Association of aniridia and dry eyes." *Ophthalmology* 112(9): 1535-40.

Jensen, M. E., Odgaard, E., Christensen, M. H., et al. (2007). "Flow-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase depends on nucleotide release and subsequent purinergic signaling in the intact nephron." *J Am Soc Nephrol* 18(7): 2062-70.

Johnson, M. E. (2009). "The association between symptoms of discomfort and signs in dry eye." *Ocul Surf* 7(4): 199-211.

Johnson, M. E., Murphy, P. J. (2005). "The Effect of instilled fluorescein solution volume on the values and repeatability of TBUT measurements." *Cornea* 24(7): 811-7.

Jordan, A., Baum, J. (1980). "Basic tear flow. Does it exist?" *Ophthalmology* 87(9): 920-30.

Jumblatt, J. E., Jumblatt, M. M. (1998). "Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva." *Exp Eye Res* 67(3): 341-6.

Kaiserman, I., Kaiserman, N., Nakar, S., et al. (2005). "Dry eye in diabetic patients." *Am J Ophthalmol* 139(3): 498-503.

Karampatakis, V., Karamitsos, A., Skriapa, A., et al. (2010). "Comparison between normal values of 2- and 5-minute Schirmer test without anesthesia." *Cornea* 29(5): 497-501.

Karseras, A. G., Ruben, M. (1976). "Aetiology of keratoconus." *Br J Ophthalmol* 60(7): 522-5.

Kashkouli, M. B., Pakdel, F., Amani, A., et al. (2010). "A Modified Schirmer Test in Dry Eye and Normal Subjects: Open Versus Closed Eye and 1-Minute Versus 5-Minute Tests." *Cornea*.

Kaulich, M., Streicher, F., Mayer, R., et al. (2003). "Flavonoids-novel lead compounds for the development of P2Y2 receptor antagonist." *drug Dev Res* 59(72-81).

Khanal, S., Tomlinson, A., Diaper, C. J. (2009). "Tear physiology of aqueous deficiency and evaporative dry eye." *Optom Vis Sci* 86(11): 1235-40.

Kimura, K., Nishimura, T., Satoh, Y. (1999). "Effects of ATP and its analogues on  $[Ca^{2+}]_i$  dynamics in the rabbit corneal epithelium." *Arch Histol Cytol* 62(2): 129-38.

King, B., Ziganshina, L. E., Pintor, J., et al. (2006). "Full sensitivity of P2Y2 purinoceptor to ATP revealed by changing extracellular pH." *Br J Pharmacol* 117(7): 1371-1373.

Klepeis, V. E., Weinger, I., Kaczmarek, E., et al. (2004). "P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration." *J Cell Biochem* 93(6): 1115-33.

Klishin, A., Lozovaya, N., Pintor, J., et al. (1994). "Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus." *Neuroscience* 58(2): 235-6.

Kobayashi, N., Kabuyama, Y., Sasaki, S., et al. (2002). "Suppression of corneal neovascularization by culture supernatant of human amniotic cells." *Cornea* 21(1): 62-7.

Kojima, T., Higuchi, A., Goto, E., et al. (2008). "Autologous serum eye drops for the treatment of dry eye diseases." *Cornea* 27 Suppl 1: S25-30.

Konomi, K., Chen, L. L., Tarko, R. S., et al. (2008). "Preoperative characteristics and a potential mechanism of chronic dry eye after LASIK." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(1): 168-74.

Koseki, M., Maki, Y., Matsukubo, T., et al. (2004). "Salivary flow and its relationship to oral signs and symptoms in patients with dry eyes." *Oral Dis* 10(2): 75-80.

Krachmer, J. H., Feder, R. S., Belin, M. W. (1984). "Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders." *Surv Ophthalmol* 28(4): 293-322.

Kremer, I., Rajpal, R. K., Rapuano, C. J., et al. (1993). "Results of penetrating keratoplasty in aniridia." *Am J Ophthalmol* 115(3): 317-20.

Kulkarni, A. A., Trousdale, M. D., Stevenson, D., et al. (2003). "Nucleotide induced restoration of conjunctival chloride and fluid secretion in adenovirus type 5-infected pigmented rabbit eyes." *J Pharmacol Exp Ther* 305: 1206-1211.

Kymes, S. M., Walline, J. J., Zadnik, K., et al. (2004). "Quality of life in keratoconus." *Am J Ophthalmol* 138(4): 527-35.

Lazarowski, E. R., Watt, W. C., Stutts, M. J., et al. (1995). "Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate." *Br J Pharmacol* 116(1): 1619-27.

Lee, A. J., Lee, J., Saw, S. M., et al. (2002). "Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms: a population based study in Indonesia." *Br J Ophthalmol* 86(12): 1347-51.

Lee, B. H., McLaren, J. W., Erie, J. C., et al. (2002). "Reinnervation in the cornea after LASIK." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(12): 3660-4.

Lee, H., Khan, R., O'Keefe, M. (2008). "Aniridia: current pathology and management." *Acta Ophthalmol* 86(7): 708-15.

- Lee, H. K., Lee, K. S., Kim, H. C., et al. (2005). "Nerve growth factor concentration and implications in photorefractive keratectomy vs. laser in situ keratomileusis." *Am J Ophthalmol* 139(6): 965-71.
- Lee, J. B., Ryu, C. H., Kim, J., et al. (2000). "Comparison of tear secretion and tear film instability after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis." *J Cataract Refract Surg* 26(9): 1326-31.
- Lehrer, M., Sun, T., Lavker, R. (1998). "Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation." *J Cell Sci* 111(Pt 19): 2867-2875.
- Leipziger, J. (2003). "Control of epithelial transport via luminal P2 receptors." *Am J Physiol Renal Physiol* 284(3): F419-32.
- Leitch, E. C., Willcox, M. D. (1998). "Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme." *J Med Microbiol* 47(9): 837-42.
- Leitch, E. C., Willcox, M. D. (1999a). "Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme." *J Med Microbiol* 48(9): 867-71.
- Leitch, E. C., Willcox, M. D. (1999b). "Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin." *Curr Eye Res* 19(1): 12-9.
- Lema, I., Duran, J. A. (2005). "Inflammatory molecules in the tears of patients with keratoconus." *Ophthalmology* 112(4): 654-9.
- Lema, I., Sobrino, T., Duran, J. A., et al. (2009). "Subclinical keratoconus and inflammatory molecules from tears." *Br J Ophthalmol* 93(6): 820-4.
- Lembach, R. G. (2003). "Use of contact lenses for management of keratoconus." *Ophthalmol Clin North Am* 16(3): 383-94, vi.
- Lemp, M. A. (1995). "Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes." *CLAO J* 21(4): 221-32.
- Lemp, M. A. (2005). "Dry eye (Keratoconjunctivitis Sicca), rheumatoid arthritis, and Sjögren's syndrome." *Am J Ophthalmol* 140(5): 898-9.

Li, D. Q., Chen, Z., Song, X. J., et al. (2004). "Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(12): 4302-11.

Li, Y., Kuang, K., Yerxa, B., et al. (2001). "Rabbit conjunctival epithelium transports fluid, and P2Y<sub>2</sub>(2) receptor agonists stimulate Cl<sup>-</sup> and fluid secretion." *Am J Physiol Cell Physiol* 281(2): C595-602.

Lilakova, D., Hejcmanova, D., Juttnerova, V., et al. (2002). "[Aniridia]." *Cesk Slov Oftalmol* 58(3): 176-9.

Lin, P. Y., Cheng, C. Y., Hsu, W. M., et al. (2005). "Association between symptoms and signs of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(5): 1593-8.

Lin, P. Y., Tsai, S. Y., Cheng, C. Y., et al. (2003). "Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study." *Ophthalmology* 110(6): 1096-101.

Liu, C. Y., Zhu, G., Westerhausen-Larson, A., et al. (1993). "Cornea-specific expression of K12 keratin during mouse development." *Curr Eye Res* 12(11): 963-74.

Liu, Y., Wakakura, M. (1998). "P<sub>1</sub>-/P<sub>2</sub>-purinergic receptors on cultured rabbit retinal Muller cells." *Jpn J Ophthalmol* 42(1): 33-40.

Lois, N., Kowal, V. O., Cohen, E. J., et al. (1997). "Indications for penetrating keratoplasty and associated procedures, 1989-1995." *Cornea* 16(6): 623-9.

Lopes, J. E., Wilson, R. R., Alvim, H. S., et al. (2007). "Central corneal thickness in pediatric glaucoma." *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 44(2): 112-7.

Lopez-Garcia, J. S., Garcia-Lozano, I., Rivas, L., et al. (2006). "[Congenital aniridia keratopathy treatment]." *Arch Soc Esp Oftalmol* 81(8): 435-44.

Lopez-Garcia, J. S., Rivas, L., Garcia-Lozano, I., et al. (2008). "Autologous serum eyedrops in the treatment of aniridic keratopathy." *Ophthalmology* 115(2): 262-7.

Lu, W., Reigada, D., Sevigny, J., et al. (2007). "Stimulation of the P2Y1 receptor up-regulates nucleoside-triphosphate diphosphohydrolase-1 in human retinal pigment epithelial cells." *J Pharmacol Exp Ther* 323(1): 157-64.

Luo, J., Jankowski, V., Gungar, N., et al. (2004). "Endogenous diadenosine tetraphosphate, diadenosine pentaphosphate, and diadenosine hexaphosphate in human myocardial tissue." *Hypertension* 43(5): 1055-9.

Luo, L., Li, D. Q., Corrales, R. M., et al. (2005). "Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface." *Eye Contact Lens* 31(5): 186-93.

Luo, L., Li, D. Q., Doshi, A., et al. (2004). "Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(12): 4293-301.

Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J., et al. (1993). "Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(11): 5113-7.

Luthje, J., Ogilvie, A. (1983). "The presence of diadenosine 5',5''-P1,P3-triphosphate (Ap3A) in human platelets." *Biochem Biophys Res Commun* 115(1): 253-60.

Mac Cord Medina, F., Silvestre de Castro, R., Leite, S. C., et al. (2007). "Management of dry eye related to systemic diseases in childhood and longterm follow-up." *Acta Ophthalmol Scand* 85(7): 739-44.

MacDonald, P. E., Braun, M., Galvanovskis, J., et al. (2006). "Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic beta cells." *Cell Metab* 4(4): 283-90.

Mackman, G., Brightbill, F. S., Optiz, J. M. (1979). "Corneal changes in aniridia." *Am J Ophthalmol* 87(4): 497-502.

Madden, R. K., Paugh, J. R., Wang, C. (1994). "Comparative study of two non-invasive tear film stability techniques." *Curr Eye Res* 13(4): 263-9.

Marugat, J., Vila, J., Pavesi, M., et al. (1998). "Estimación del tamaño de la muestra en la investigación clínica y epidemiológica." *Med Clin (Barc)* 111: 267-76.

- Massingale, M. L., Li, X., Vallabhajosyula, M., et al. (2009). "Analysis of Inflammatory Cytokines in the Tears of Dry Eye Patients." *Cornea*.
- Mathers, W. D. (1993). "Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye." *Ophthalmology* 100(3): 347-51.
- Mathers, W. D., Daley, T. E. (1996). "Tear flow and evaporation in patients with and without dry eye." *Ophthalmology* 103(4): 664-9.
- Mathers, W. D., Lane, J. A., Sutphin, J. E., et al. (1996a). "Model for ocular tear film function." *Cornea* 15(2): 110-9.
- Mathers, W. D., Lane, J. A., Zimmerman, M. B. (1996b). "Tear film changes associated with normal aging." *Cornea* 15(3): 229-34.
- Matteson, E. L., Ike, R. W. (1990). "Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and Sjögren's syndrome." *J Rheumatol* 17(5): 676-9.
- Mayer, K. L., Nordlund, M. L., Schwartz, G. S., et al. (2003). "Keratopathy in congenital aniridia." *Ocul Surf* 1(2): 74-9.
- Mayo, K. H., Mvele, O. M., Puri, R. N. (1990). "Proton magnetic resonance spectroscopic analysis of diadenosine 5',5''-polyphosphates." *FEBS Lett* 265(1-2): 97-100.
- McCarty, C. A., Bansal, A. K., Livingston, P. M., et al. (1998). "The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia." *Ophthalmology* 105(6): 1114-9.
- McCulley, J. P., Aronowicz, J. D., Uchiyama, E., et al. (2006). "Correlations in a change in aqueous tear evaporation with a change in relative humidity and the impact." *Am J Ophthalmol* 141(4): 758-60.
- McCulley, T. J., Mayer, K., Dahr, S. S., et al. (2005). "Aniridia and optic nerve hypoplasia." *Eye (Lond)* 19(7): 762-4.
- McMonnies, C., Ho, A., Wakefield, D. (1998). "Optimum dry eye classification using questionnaire responses." *Adv Exp Med Biol* 438: 835-8.

McMonnies, C. W. (1986). "Key questions in a dry eye history." *J Am Optom Assoc* 57(7): 512-7.

McMonnies, C. W. (2007). "Abnormal rubbing and keratectasia." *Eye Contact Lens* 33(6 Pt 1): 265-71.

McMonnies, C. W., Boneham, G. C. (2003). "Keratoconus, allergy, itch, eye-rubbing and hand-dominance." *Clin Exp Optom* 86(6): 376-84.

McMonnies, C. W., Ho, A. (1987a). "Patient history in screening for dry eye conditions." *J Am Optom Assoc* 58(4): 296-301.

McMonnies, C. W., Ho, A. (1987b). "Responses to a dry eye questionnaire from a normal population." *J Am Optom Assoc* 58(7): 588-91.

Mediero, A., Guzman-Aranguez, A., Crooke, A., et al. (2008). "Corneal re-epithelialization stimulated by diadenosine polyphosphates recruits RhoA/ROCK and ERK1/2 pathways." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(11): 4982-92.

Mediero, A., Peral, A., Pintor, J. (2006). "Dual roles of diadenosine polyphosphates in corneal epithelial cell migration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(10): 4500-6.

Merriman-Smith, R., Tunstall, M., Kistler, J., et al. (1998). "Expression profiles of P2-receptor isoforms P2Y1 and P2Y2 in the rat lens." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(13): 2791-6.

Mian, S. I., Li, A. Y., Dutta, S., et al. (2009). "Dry eyes and corneal sensation after laser in situ keratomileusis with femtosecond laser flap creation Effect of hinge position, hinge angle, and flap thickness." *J Cataract Refract Surg* 35(12): 2092-8.

Miras-Portugal, M. T., Gualix, J., Mateo, J., et al. (1999). "Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism." *Prog Brain Res* 120: 397-409.

Mitchell, C. H. (2001). "Release of ATP by human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space." *J Physiol* 534: 193-202.

Mitchell, C. H., Carre, D., McGlenn, A., et al. (1998). "A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7174-7178.

Montes-Micó, R., Caliz, A., Alió, J. L. (2004a). "Changes in ocular aberrations after instillation of artificial tears in dry-eye patients." *J Cataract Refract Surg* 30(8): 1649-52.

Montes-Mico, R., Caliz, A., Alio, J. L. (2004b). "Wavefront analysis of higher order aberrations in dry eye patients." *J Refract Surg* 20(3): 243-7.

Moss, S. E., Klein, R., Klein, B. E. (2000). "Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome." *Arch Ophthalmol* 118(9): 1264-8.

Moss, S. E., Klein, R., Klein, B. E. (2004). "Incidence of dry eye in an older population." *Arch Ophthalmol* 122(3): 369-73.

Motolko, M., Breslin, C. W. (1981). "The effect of pH and osmolarity on the ability of tolerate artificial tears." *Am J Ophthalmol* 91(6): 781-4.

Murakami, T., Fujihara, T., Nakamura, M., et al. (2003). "P2Y(2) receptor elicits PAS-positive glycoprotein secretion from rabbit conjunctival goblet cells in vivo." *J Ocul Pharmacol Ther* 19(4): 345-52.

Nada, M., Rattan, K. N., Magu, S., et al. (2003). "Aniridia and Wilm's tumor." *Indian J Pediatr* 70(10): 837-8.

Nakamura, H., Kawakamu, A., Eguchi, K. (2006). "Mechanisms of autoantibody production and the relationship between autoantibodies and the clinical manifestations in Sjögren's syndrome." *Trans Res* 148(6): 281-288.

Naumann, N., Siratska, O., Gahr, M., et al. (2005). "P-glycoprotein expression increases ATP release in respiratory cystic fibrosis cells." *J Cyst Fibros* 4(3): 157-68.

Neal, M., Cunningham, J. (1994). "Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurones." *Br J Pharmacol* 113(4): 1085-7.

Neethirajan, G., Solomon, A., Krishnadas, S. R., et al. (2009). "Genotype/phenotype association in Indian congenital aniridia." *Indian J Pediatr* 76(5): 513-7.

Nejima, R., Miyata, K., Tanabe, T., et al. (2005). "Corneal barrier function, tear film stability, and corneal sensation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis." *Am J Ophthalmol* 139(1): 64-71.

Nelson, L. B., Spaeth, G. L., Nowinski, T. S., et al. (1984). "Aniridia. A review." *Surv Ophthalmol* 28(6): 621-42.

Neveu, M. M., Jeffery, G., Moore, A. T., et al. (2009). "Deficits in local and global motion perception arising from abnormal eye movements." *J Vis* 9(4): 9 1-15.

Nguyen, C. Q., Peck, A. B. (2009). "Unraveling the pathophysiology of Sjögren syndrome-associated dry eye disease." *Ocul Surf* 7(1): 11-27.

Nicholas, R. A., Watt, W. C., Lazarowski, E. R., et al. (1996). "Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor." *Mol Pharmacol* 50(2): 224-9.

Nichols, J. J., Mitchell, G. L., Nichols, K. K., et al. (2002). "The performance of the contact lens dry eye questionnaire as a screening survey for contact lens-related dry eye." *Cornea* 21(5): 469-75.

Nichols, J. J., Sinnott, L. T. (2006). "Tear film, contact lens, and patient-related factors associated with contact lens-related dry eye." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(4): 1319-28.

Nichols, K. K., Begley, C. G., Caffery, B., et al. (1999). "Symptoms of ocular irritation in patients diagnosed with dry eye." *Optom Vis Sci* 76(12): 838-44.

Nichols, K. K., Mitchell, G. L., Zadnik, K. (2004). "The repeatability of clinical measurements of dry eye." *Cornea* 23(3): 272-85.

Nichols, K. K., Nichols, J. J., Lynn Mitchell, G. (2003). "The relation between tear film tests in patients with dry eye disease." *Ophthalmic Physiol Opt* 23(6): 553-60.

Nichols, K. K., Nichols, J. J., Mitchell, G. L. (2004). "The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease." *Cornea* 23(8): 762-70.

Nichols, K. K., Yerxa, B., Kellerman, D. J. (2004). "Diquafosol tetrasodium: a novel dry eye therapy." *Expert Opin Investig Drugs* 13(1): 47-54.

Niederer, R. L., Perumal, D., Sherwin, T., et al. (2008). "Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(7): 2964-70.

Nishida, K., Kinoshita, S., Ohashi, Y., et al. (1995). "Ocular surface abnormalities in aniridia." *Am J Ophthalmol* 120(3): 368-75.

North, R. A. (1996). "P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels." *Ciba Found Symp* 198: 91-105; discussion 105-9.

Obata, H., Yamamoto, S., Horiuchi, H., et al. (1995). "Histopathologic study of human lacrimal gland. Statistical analysis with special reference to aging." *Ophthalmology* 102(4): 678-86.

Occhipinti, J. R., Mosier, M. A., LaMotte, J., et al. (1988). "Fluorophotometric measurement of human tear turnover rate." *Curr Eye Res* 7(10): 995-1000.

Ogilvie, A., Blasius, R., Schulze-Lohoff, E., et al. (1996). "Adenine dinucleotides: a novel class of signalling molecules." *J Auton Pharmacol* 16(6): 325-8.

Parr, C. E., Sullivan, D. M., Paradiso, A. M., et al. (1994). "Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26): 13067.

Patel, K., Barnes, A., Camacho, J., et al. (2001). "Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321N1 cells." *Eur J Pharmacol* 430(2-3): 203-10.

Patel, S., Perez-Santonja, J. J., Alió, J. L., et al. (2001). "Corneal sensitivity and some properties of the tear film after laser in situ keratomileusis." *J Refract Surg* 17(1): 17-24.

Paulsen, F. P., Pufe, T., Schaudig, U., et al. (2001). "Detection of natural peptide antibiotics in human nasolacrimal ducts." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10): 2157-63.

Pearson, R. A., Dale, N., Llaudet, E., et al. (2005). "ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation." *Neuron* 46: 731-744.

Pendergast, W., Yerxa, B. R., Douglass, J. G., 3rd, et al. (2001). "Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates." *Bioorg Med Chem Lett* 11(2): 157-60.

Peral, A., Dominguez-Godinez, C. O., Carracedo, G., et al. (2008). "Therapeutic targets in dry eye syndrome." *Drug News Perspect* 21(3): 166-76.

Peral, A., Gallar, J., Pintor, J. (2009). "Adenine nucleotide effect on intraocular pressure: Involvement of the parasympathetic nervous system." *Exp Eye Res* 89(1): 63-70.

Peral, A., Loma, P., Yerxa, B., et al. (2008). "Topical application of nucleotides increase lysozyme levels in tears." *Clin Ophthalmol* 2(2): 261-7.

Perez-Santonja, J. J., Sakla, H. F., Cardona, C., et al. (1999). "Corneal sensitivity after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis for low myopia." *Am J Ophthalmol* 127(5): 497-504.

Peterson, C. M., Leshner, J. L., Jr., Davis, L. S. (2002). "Dry eye syndrome in postmenopausal women." *JAMA* 287(5): 585-6.

Pflugfelder, S. C., Maskin, S. L., Anderson, B., et al. (2004). "A randomized, double-masked, placebo-controlled, multicenter comparison of loteprednol etabonate ophthalmic suspension, 0.5%, and placebo for treatment of keratoconjunctivitis sicca in patients with delayed tear clearance." *Am J Ophthalmol* 138(3): 444-57.

Pflugfelder, S. C., Solomon, A., Stern, M. E. (2000). "The diagnosis and management of dry eye: a twenty-five-year review." *Cornea* 19(5): 644-9.

Pintor, J. (1999). *Nervous control of the eye*. Nervous control of the eye. G. Burnstock and A. Sillito. Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 171-210.

Pintor, J. (2003). "[Nucleotides as a new alternative for the treatment of ocular hypertension]." *Arch Soc Esp Oftalmol* 78(6): 295-6.

- Pintor, J. (2005). "Adenine nucleotides and dinucleotides as new substances for the treatment of ocular hypertension and glaucoma." *Curr Opin Investig Drugs* 6(1): 76-80.
- Pintor, J., Bautista, A., Carracedo, G., et al. (2004). "UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea." *Ophthalmic Physiol Opt* 24(3): 186-93.
- Pintor, J., Diaz-Rey, M. A., Miras-Portugal, M. T. (1993). "Ap4A and ADP-beta-S binding to P2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals." *Br J Pharmacol* 108(4): 1094-9.
- Pintor, J., Diaz-Rey, M. A., Torres, M., et al. (1992). "Presence of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in rat brain synaptic terminals. Ca<sup>2+</sup> dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine." *Neurosci Lett* 136(2): 141-4.
- Pintor, J., Miras-Portugal, M. T. (1995). "P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system." *Gen Pharmacol* 26(2): 229-35.
- Pintor, J., Pelaez, T., Peral, A. (2004). "Adenosine tetraphosphate, Ap4, a physiological regulator of intraocular pressure in normotensive rabbit eyes." *J Pharmacol Exp Ther* 308(2): 468-73.
- Pintor, J., Peral, A., Hoyle, C. H., et al. (2002). "Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits." *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 291-7.
- Pintor, J., Peral, A., Pelaez, T., et al. (2003). "Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure." *J Pharmacol Exp Ther* 304(1): 342-8.
- Pintor, J., Rotllan, P., Torres, M., et al. (1992). "Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release." *Anal Biochem* 200(2): 296-300.
- Pintor, J., Sanchez-Nogueiro, J., Irazu, M., et al. (2004). "Immunolocalisation of P2Y receptors in the rat eye." *Purinergic Signal* 1(1): 83-90.

Pintor, J., Torres, M., Castro, E., et al. (1991a). "Characterization of diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A) binding sites in cultured chromaffin cells: evidence for a P<sub>2y</sub> site." *Br J Pharmacol* 103(4): 1980-4.

Pintor, J., Torres, M., Miras-Portugal, M. T. (1991b). "Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap<sub>4</sub>A and Ap<sub>5</sub>A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells." *Life Sci* 48(24): 2317-24.

Pintor, J., Villafuertes, R. G., Miras-Portugal, M. A. (2001). "Pharmacological profile of the dinucleotide receptor present in rat brain isolated synaptic terminals." *Anal Pharmacol* 2(1): 85-92.

Pisella, P. J., Pouliquen, P., Baudouin, C. (2002). "Prevalence of ocular symptoms and signs with preserved and preservative free glaucoma medication." *Br J Ophthalmol* 86(4): 418-23.

Pivorun, E. B., Nordone, A. (1996). "Brain synaptosomes display a diadenosine tetraphosphate (Ap<sub>4</sub>A)-mediated Ca<sup>2+</sup> influx distinct from ATP-mediated influx." *J Neurosci Res* 44(5): 478-89.

Puthussery, T., Fletcher, E. L. (2006). "P<sub>2X2</sub> receptors on ganglion and amacrine cells in cone pathways of the rat retina." *J Comp Neurol* 496(5): 595-609.

Ralevic, V., Hoyle, C. H., Burnstock, G. (1995). "Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries." *J Physiol* 483 ( Pt 3): 703-13.

Reigada, D., Mitchell, C. H. (2005). "Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport." *Am J Physiol* 288: C132-C140.

Ren, H., Wilson, G. (1997). "The effect of a shear force on the cell shedding rate of the corneal epithelium." *Acta Ophthalmol Scand* 75(4): 383-7.

Rhodes, J. D., Collison, D. J., Duncan, G. (2003). "Calcium activates SK channels in the intact human lens." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 3927-3932.

Rieger, G. (1992). "The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging." *Br J Ophthalmol* 76(3): 157-8.

Rieger, G. (1993). "Contrast sensitivity in patients with keratoconjunctivitis sicca before and after artificial tear application." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231(10): 577-9.

Rivas, L., Murube, J., Rivas, A., et al. (2003). "[Impression cytology study of dry eyes in patients with congenital aniridia]." *Arch Soc Esp Oftalmol* 78(11): 615-22.

Roberts, J. A., Vial, C., Digby, H. R., et al. (2006). "Molecular properties of P2X receptors." *Pflugers Arch* 452(5): 486-500.

Rodriguez-Prats, J. L., Hamdi, I. M., Rodriguez, A. E., et al. (2007). "Effect of suction ring application during LASIK on goblet cell density." *J Refract Surg* 23(6): 559-62.

Rodriguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E. G., et al. (1988). "Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules." *J Neurochem* 51(6): 1696-703.

Romero-Rangel, T., Stavrou, P., Cotter, J., et al. (2000). "Gas-permeable scleral contact lens therapy in ocular surface disease." *Am J Ophthalmol* 130(1): 25-32.

Rosenthal, P., Baran, I., Jacobs, D. S. (2009). "Corneal pain without stain: is it real?" *Ocul Surf* 7(1): 28-40.

Rosenthal, P., Cotter, J. M., Baum, J. (2000). "Treatment of persistent corneal epithelial defect with extended wear of a fluid-ventilated gas-permeable scleral contact lens." *Am J Ophthalmol* 130(1): 33-41.

Rotllan Pascual, P., Ramos Carrillo, A., Rodriguez del Castillo, A. (1991). "Reversed-phase high-performance liquid chromatography of dinucleoside polyphosphates." *J Chromatogr* 563(1): 37-52.

Sack, R. A., Beaton, A., Sathe, S., et al. (2000). "Towards a closed eye model of the pre-ocular tear layer." *Prog Retin Eye Res* 19(6): 649-68.

Schaumberg, D. A., Dana, R., Buring, J. E., et al. (2009). "Prevalence of dry eye disease among US men: estimates from the Physicians' Health Studies." *Arch Ophthalmol* 127(6): 763-8.

Schaumberg, D. A., Sullivan, D. A., Buring, J. E., et al. (2003). "Prevalence of dry eye syndrome among US women." *Am J Ophthalmol* 136(2): 318-26.

Schein, O. D., Muñoz, B., Tielsch, J. M., et al. (1997). "Prevalence of dry eye among the elderly." *Am J Ophthalmol* 124(6): 723-8.

Schein, O. D., Tielsch, J. M., Munoz, B., et al. (1997). "Relation between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective." *Ophthalmology* 104(9): 1395-401.

Schiffman, R. M., Christianson, M. D., Jacobsen, G., et al. (2000). "Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index." *Arch Ophthalmol* 118(5): 615-21.

Schlote, T., Kadner, G., Freudenthaler, N. (2004). "Marked reduction and distinct patterns of eye blinking in patients with moderately dry eyes during video display terminal use." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(4): 306-12.

Schluter, H., Offers, E., Bruggemann, G., et al. (1994). "Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure." *Nature* 367(6459): 186-8.

Schrader, A. M., Camden, J. M., Weisman, G. A. (2005). "P2Y2 nucleotide receptor up-regulation in submandibular gland cells from the NOD.B10 mouse model of Sjögren's syndrome." *Arch Oral Biol* 50(6): 533-40.

Secker, G. A., Daniels, J. T. (2008). "Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation." *Stem Cell Rev* 4(3): 159-68.

Shahidullah, M., Wilson, W. S. (1997). "Mobilisation of intracellular calcium by P2Y2 receptors in cultured, non-transformed bovine ciliary epithelial cells." *Curr Eye Res* 16(10): 1006-16.

Shine, W. E., McCulley, J. P., Pandya, A. G. (2003). "Minocycline effect on meibomian gland lipids in meibomianitis patients." *Exp Eye Res* 76(4): 417-20.

Shiue, M. H., Kulkarni, A. A., Gukasyan, H. J., et al. (2000). "Pharmacological modulation of fluid secretion in the pigmented rabbit conjunctiva." *Life Sci* 66: 105-111.

Siganos, D. S., Popescu, C. N., Siganos, C. S., et al. (2000). "Tear secretion following spherical and astigmatic excimer laser photorefractive keratectomy." *J Cataract Refract Surg* 26(11): 1585-9.

Silberberg, S. D., Chang, T. H., Swartz, K. J. (2005). "Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels." *J Gen Physiol* 125(4): 347-59.

Simpson, T. L., Situ, P., Jones, L. W., et al. (2008). "Dry eye symptoms assessed by four questionnaires." *Optom Vis Sci* 85(8): 692-9.

Sjögren, H. (1933). "Zur kennis der keratoconjunctivitis sicca(Keratitis follicularis bei hypofunktion der tranendrusen)." *Acta Ophthalmol* 11(1): 1-151.

Solomon, R., Donnenfeld, E. D., Perry, H. D. (2004). "The effects of LASIK on the ocular surface." *Ocul Surf* 2(1): 34-44.

Sosne, G., Szliter, E. A., Barrett, R., et al. (2002). "Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury." *Exp Eye Res* 74(2): 293-299.

Soto, D., Pintor, J., Peral, A., et al. (2005). "Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility." *J Pharmacol Exp Ther* 314(3): 1042-51.

Srinivas, S. P., Mutharasan, R., Fleiszig, S. (2002). "Shear-induced ATP release by cultured rabbit corneal epithelial cells." *Adv Exp Med Biol* 506: 677-685.

Srinivas, S. P., Yeh, J. C., Ong, A., et al. (1998). "Ca<sup>2+</sup> mobilization in bovine corneal endothelial cells by P2 purinergic receptors." *Curr Eye Res* 17: 994-1004.

Srinivasan, S., Joyce, E., Senchyna, M., et al. (2008). "Clinical signs and symptoms in post-menopausal females with symptoms of dry eye." *Ophthalmic Physiol Opt* 28(4): 365-72.

Srinivasan, S., Slomovic, A. R. (2007). "Sjögren syndrome." *Compr Ophthalmol Update* 8(4): 205-12.

Steele, C. (1999). "Corneal wound healing: a review." *Optometry Today*: 28-32.

Stern, M. E., Beuerman, R. W., Fox, R. I., et al. (1998a). "The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands." *Cornea* 17(6): 584-9.

Stern, M. E., Beuerman, R. W., Fox, R. I., et al. (1998b). "A unified theory of the role of the ocular surface in dry eye." *Adv Exp Med Biol* 438: 643-51.

Stevenson, D., Tauber, J., Reis, B. L. (2000). "Efficacy and safety of cyclosporin A ophthalmic emulsion in the treatment of moderate-to-severe dry eye disease: a dose-ranging, randomized trial. The Cyclosporin A Phase 2 Study Group." *Ophthalmology* 107(5): 967-74.

Stumpf, A., Wengers-Epping, K., Walte, M., et al. (2006). "Physiological concept for a blood based CFTR test." *Cell Physiol Biochem* 17(1-2): 29-36.

Sugamoto, Y., Hirai, K., Tokoro, T. (1999). "P2Y2 receptor elevates intracellular calcium concentration in rabbit eye suprachoroid." *J Med Dent Sci* 46(2): 83-92.

Sugioka, M., Fukuda, Y., Yamashita, M. (1996). "Ca<sup>2+</sup> responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina." *J Physiol* 493 ( Pt 3): 855-63.

Sullivan, D. A., Belanger, A., Cermak, J. M., et al. (2003). "Are women with Sjögren's syndrome androgen-deficient?" *J Rheumatol* 30(11): 2413-9.

Sullivan, D. M., Erb, L., Anglade, E., et al. (1997). "Identification and characterization of P2Y2 nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells." *J Neurosci Res* 49(1): 43-52.

Ta, C. N., Shine, W. E., McCulley, J. P., et al. (2003). "Effects of minocycline on the ocular flora of patients with acne rosacea or seborrheic blepharitis." *Cornea* 22(6): 545-8.

Tabbara, K. F., Bobb, A. A. (1980). "Lacrimal system complications in trachoma." *Ophthalmology* 87(4): 298-301.

Tahzib, N. G., Bootsma, S. J., Eggink, F. A., et al. (2005). "Functional outcomes and patient satisfaction after laser in situ keratomileusis for correction of myopia." *J Cataract Refract Surg* 31(10): 1943-51.

Tamer, C., Melek, I. M., Duman, T., et al. (2005). "Tear film tests in Parkinson's disease patients." *Ophthalmology* 112(10): 1795.

Tauber, J., Davitt, W. F., Bokosky, J. E., et al. (2004). "Double-masked, placebo-controlled safety and efficacy trial of diquafosol tetrasodium (INS365) ophthalmic solution for the treatment of dry eye." *Cornea* 23(8): 784-92.

Taylor, A. L., Kudlow, B. A., Marrs, K. L., et al. (1998). "Bioluminescence detection of ATP release mechanisms in epithelia." *Am J Physiol* 275(5 Pt 1): C1391-406.

Thalasselis, A., Taie, H. F., Etchepareborda, J., et al. (1988). "Keratoconus, magnesium deficiency, type A behavior, and allergy." *Am J Optom Physiol Opt* 65(6): 499-505.

Tiller, A. M., Odenthal, M. T., Verbraak, F. D., et al. (2003). "The influence of keratoplasty on visual prognosis in aniridia: a historical review of one large family." *Cornea* 22(2): 105-10.

Toda, I., Asano-Kato, N., Hori-Komai, Y., et al. (2002). "Laser-assisted in situ keratomileusis for patients with dry eye." *Arch Ophthalmol* 120(8): 1024-8.

Toda, I., Asano-Kato, N., Komai-Hori, Y., et al. (2001). "Dry eye after laser in situ keratomileusis." *Am J Ophthalmol* 132(1): 1-7.

Tomlinson, A., Khanal, S., Ramaesh, K., et al. (2006). "Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(10): 4309-15.

Tseng, S. C., Li, D. Q. (1996). "Comparison of protein kinase C subtype expression between normal and aniridic human ocular surfaces: implications for limbal stem cell dysfunction in aniridia." *Cornea* 15(2): 168-78.

Tsubota, K., Fujihara, T., Saito, K., et al. (1999). "Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in dry eye patients." *Ophthalmologica* 213(1): 16-9.

Tsubota, K., Hata, S., Okusawa, Y., et al. (1996). "Quantitative videographic analysis of blinking in normal subjects and patients with dry eye." *Arch Ophthalmol* 114(6): 715-20.

Tsubota, K., Nakamori, K. (1993). "Dry eyes and video display terminals." *N Engl J Med* 328(8): 584.

Tsubota, K., Yamada, M. (1992). "Tear evaporation from the ocular surface." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(10): 2942-50.

Turner, J. T., Landon, L. A., Gibbons, S. J., et al. (1999). "Salivary gland P2 nucleotide receptors." *Crit Rev Oral Biol Med* 10(2): 210-24.

Uchino, M., Schaumberg, D. A., Dogru, M., et al. (2008). "Prevalence of dry eye disease among Japanese visual display terminal users." *Ophthalmology* 115(11): 1982-8.

Uno, K., Hayashi, H., Kuroki, M., et al. (2004). "Thrombospondin-1 accelerates wound healing of corneal epithelia." *Biochem Biophys Res Commun* 315(4): 928-934.

Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., et al. (1992). "Volume regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein." *nature* 355: 830-833.

van Bijsterveld, O. P. (1969). "Diagnostic tests in the Sicca syndrome." *Arch Ophthalmol* 82(1): 10-4.

Versura, P., Cellini, M., Torreggiani, A., et al. (2001). "Dryness symptoms, diagnostic protocol and therapeutic management: a report on 1,200 patients." *Ophthalmic Res* 33(4): 221-7.

Villarreal, C. E., Villanueva-Mendoza, C., Orozco, L., et al. (2008). "Molecular analysis of the PAX6 gene in Mexican patients with congenital aniridia: report of four novel mutations." *Mol Vis* 14: 1650-8.

Viso, E., Rodriguez-Ares, M. T., Gude, F. (2009). "Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (the Salnes Eye Study)." *Ophthalmic Epidemiol* 16(1): 15-21.

Vitali, C., Bombardieri, S., Jonsson, R., et al. (2002). "Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group." *Ann Rheum Dis* 61(6): 554-8.

Vitali, C., Moutsopoulos, H. M., Bombardieri, S. (1994). "The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome." *Ann Rheum Dis* 53(10): 637-47.

Wax, M., Sanghavi, D. M., Lee, C. H., et al. (1993). "Purinergic receptors in ocular ciliary epithelial cells." *Exp Eye Res* 57(1): 89-95.

Wee, W. R., Wang, X. W., McDonnell, P. J. (1995). "Effect of artificial tears on cultured keratocytes in vitro." *Cornea* 14(3): 273-9.

Weed, K. H., MacEwen, C. J., Cox, A., et al. (2007). "Quantitative analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising in vivo confocal microscopy." *Eye (Lond)* 21(5): 614-23.

Weed, K. H., MacEwen, C. J., Giles, T., et al. (2008). "The Dundee University Scottish Keratoconus study: demographics, corneal signs, associated diseases, and eye rubbing." *Eye (Lond)* 22(4): 534-41.

Weinger, I., Klepeis, V. E., Trinkaus-Randall, V. (2005). "Tri-nucleotide receptor play a critical role in epithelial cell wound repair." *Purinergic Signal* 1(3): 281-292.

Weisman, G. A., Wang, M., Kong, Q., et al. (2005). "Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes." *Mol Neurobiol* 31(1-3): 169-83.

Westkaemper, R. B. (1987). "A proton magnetic resonance study of the effects of polyamine and divalent metal ions on diadenosine 5',5''-P1,P4-tetraphosphate base stacking." *Biochem Biophys Res Commun* 144(2): 922-9.

Wheeler-Schilling, T. H., Marquardt, K., Kohler, K., et al. (2001). "Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells." *Brain Res Mol Brain Res* 92(1-2): 177-80.

- Wildman, S. S., Brown, S. G., King, B. F., et al. (1999). "Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits." *Eur J Pharmacol* 367(1): 119-23.
- Wilson, S., Netto, M., Ambrosio, R. (2003). "Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing and disease." *Am J Ophthalmol* 136: 530-536.
- Wong, V. W., Lam, P. T., Lai, T. Y., et al. (2005). "Black diaphragm aniridia intraocular lens for aniridia and albinism." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243(5): 501-4.
- Xu, K. P., Yagi, Y., Tsubota, K. (1996). "Decrease in corneal sensitivity and change in tear function in dry eye." *Córnea* 15(3): 235-9.
- Yang, C. M., Wu, W. B., Pan, S. L., et al. (2000). "P2Y(2) receptor-stimulated phosphoinositide hydrolysis and Ca(2+) mobilization in tracheal epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(2): L235-41.
- Yang, J., Lu, Y., Luo, Y., et al. (2004). "[Black diaphragm intraocular lens for congenital aniridia or traumatic iris deficiency.]." *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 40(9): 605-8.
- Yang, L., Crason, D., Trinkaus-Randall, V. (2004). "Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors." *J Cell Biochem* 91: 938-950.
- Yeh, S., Song, X. J., Farley, W., et al. (2003). "Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1): 124-9.
- Yerxa, B. R., Mundasad, M., Sylvester, R. N., et al. (2002). "Ocular safety of INS365 ophthalmic solution, a P2Y2 agonist, in patients with mild to moderate dry eye disease." *Adv Exp Med Biol* 506(Pt B): 1251-7.
- Yerxa, B. R., Sabater, J. R., Davis, C. W., et al. (2002). "Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)- (2'-deoxycytidine 5')tetrphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y(2) receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis." *J Pharmacol Exp Ther* 302(3): 871-80.
- Yi, K., Kelly, C. J., Mitchell, P. R., et al. (2008). "Aniridia with congenital glaucoma." *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 45(4): 256.

Young, G., Veys, J., Pritchard, N., et al. (2002). "A multi-centre study of lapsed contact lens wearers." *Ophthalmic Physiol Opt* 22(6): 516-27.

Zadnik, K., Barr, J. T., Edrington, T. B., et al. (1998). "Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(13): 2537-46.

Zhang, X., Li, S., Xiao, X., et al. (2009). "Mutational screening of 10 genes in Chinese patients with microphthalmia and/or coloboma." *Mol Vis* 15: 2911-8.

Zhao, H., Jumblatt, J. E., Wood, T. O., et al. (2001). "Quantification of MUC5AC protein in human tears." *Cornea* 20(8): 873-7.

Zhao, H. B., Yu, N., Fleming, C. R. (2005). "Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51): 18724-9.

Zieske, J. D., Gipson, I. K. (1986). "Protein synthesis during corneal epithelial wound healing." *Ophthalmol Vis Sci* 1986(27).

Zimmermann, H., Volkandt, W., Wittich, B., et al. (1993). "Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover." *J Physiol Paris* 87(3): 159-70.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. Two thin, light blue lines intersect to form a triangular shape that frames the circles. One line runs from the top left towards the middle right, and the other runs from the top right towards the bottom right.

**11**

**Anexo**



En este anexo se recogen las patentes, publicaciones en revistas científicas con índice de impacto y las contribuciones a congresos que han surgido a partir de los resultados de esta tesis doctoral.

## PATENTES

Method for Diagnosing and Monitoring the Effectiveness of Dry-Eye Treatment.

A. Peral, G. Carracedo, J. Pintor.

N. DE PATENTE: WO 2007/128851 A1 PAÍS DE PRIORIDAD: España

FECHA DE PRIORIDAD: 15 Noviembre 2007 ENTIDAD TITULAR: UCM

PAÍSES A LOS QUE SE HA EXTENDIDO: Internacional (PCT).

## ARTICULOS CIENTÍFICOS

Carracedo G, Peral A, Pintor J. Diadenosine Polyphosphates in Tears of Sjögren Syndrome Patients. IOVS. May 19. [Epub ahead of print] 2010.

Peral A, Carracedo G, Acosta MC, Gallar J, Pintor J. Increasing Levels of Diadenosine Polyphosphates in Dry Eye. IOVS. 47: 4053-4058 2006.

Pintor J, Carracedo G, Bautista A, Peral A. Presence of diadenosine polyphosphates in human tears.

European Journal of Physiology. 443:432-436. 2002.

## CONGRESOS

Carracedo G, Guzman-Aranguez A, Loma P, Pintor J. Ap4A and Ap5A are released by the corneal epithelium. Purines Meeting Tarragona-Barcelona Mayo-Junio 2010.

Peral A, Cacho I, Carracedo G, Sánchez J, Pintor J. Relación entre el uso de lentes de contacto blandas y el ojo seco post-lasik. Congreso Internacional de Óptica y Optometría. Marzo 2010.

Peral A, Carracedo G, Godinez CO, Loma P, Pintor J. Ap4A as molecular marker in the severity of systemic pathologies associated with dry eye. ARVO. Mayo 2008.

Peral A, Carracedo G, Pintor J. Evolución del ojo seco en pacientes con Aniridia congénita. Congreso Internacional de Óptica y Optometría. Marzo 2008.

Carracedo G, Peral A, Pintor J. Marcador molecular para diagnóstico de ojo seco y su aplicación en pacientes con Síndrome de Sjögren. Congreso Internacional de Óptica y Optometría. Marzo 2008.

Carracedo G, Peral A, Pintor J. Dry eye in congenital Aniridia. 5th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance. Septiembre 2007.

Carracedo G, Peral A, Pintor J. Levels of diadenosine polyphosphates in Sjögren Syndrome. 5th International Conference on the Tear Film & Ocular Surface: Basic Science and Clinical Relevance. Sept. 2007.

Peral A, Carracedo G, Ferrandiz N, Acosta C, Gallar J, Belmonte C, Sánchez M, Pintor J. Mechanical release of dinucleotides to the tear film. ARVO. Mayo 2003.

Peral A, Carracedo G, Bautista A, Peláez T, Pintor J. Nucleotides levels in tear film for different blinking frequencies. Ophthalmic Research EVER. 2002.