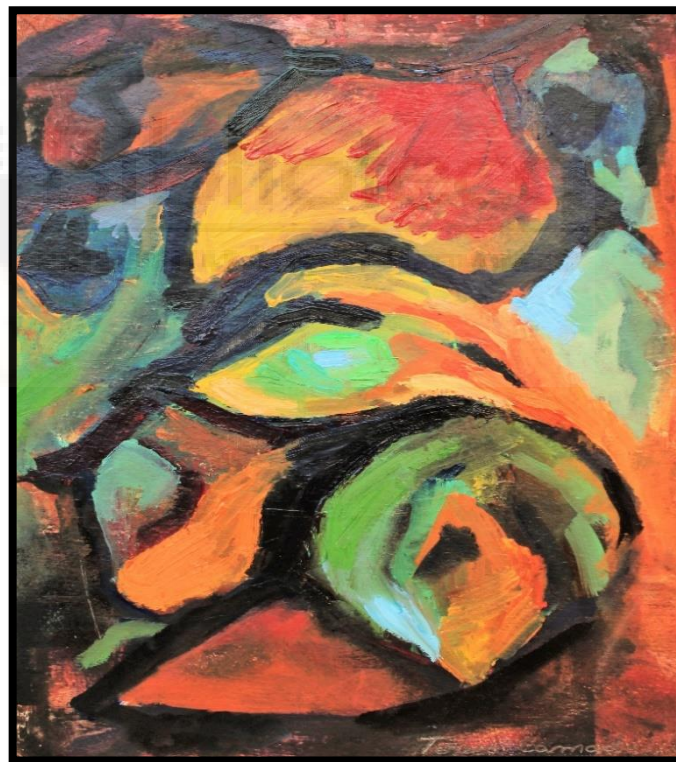




Programa de Doctorado en Neurociencias
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE

**MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE OJO
SECO: Termografía corneal y determinación del flujo de
secreción lagrimal refleja mediante estimulación corneal
con CO₂ .**



Tesis Doctoral:

María Luisa Merino Suárez

Directores:

Prof. Juana Gallar Martínez

Prof. Carlos Belmonte Martínez

2019



Programa de Doctorado en Neurociencias

Instituto de Neurociencias

Universidad Miguel Hernández de Elche

**MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE
OJO SECO:**

**Termografía corneal y determinación del flujo de
secreción lagrimal refleja mediante estimulación corneal
con CO₂.**

Presentado por:

M^a Luisa Merino Suárez

Directora:

Prof^a. Juana Gallar Martínez

Codirector:

Prof. Carlos Belmonte Martínez

Alicante, 2019



La presente tesis doctoral **“Métodos alternativos para el diagnóstico de la enfermedad de ojo seco: termografía corneal y determinación del flujo de secreción lagrimal refleja mediante estimulación corneal con CO₂”** se presenta en formato convencional y como indicios de calidad, se aportan las siguientes publicaciones previas:

- Merino ML, Belmonte J, Acosta MC, Rosas J, Belmonte C, Gallar J. Corneal surface temperature decrease during the interblink interval is greater in Sjögren's syndrome. *Acta Ophthalmol*, 96: 42-43. doi:10.1111/aos.13972_151
- Merino ML, Belmonte J, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Ocular Surface Temperature in Sjögren's Syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018; 59(9):148.
- Merino ML, Belmonte J, Acosta MC, Rosas J, Belmonte C, Gallar J. Interblink corneal temperature fall is faster in Sjögren's syndrome patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016; 57(12):5689.
- Merino ML, Belmonte J, Rosas J, Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Corneal infrared thermography and tear meniscus height in dry eye syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2015; 56(7):315



Los Dres. JUANA GALLAR MARTÍNEZ, Catedrática de Universidad del Departamento de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández e investigadora del Instituto de Neurociencias, centro mixto UMH-CSIC, y CARLOS BELMONTE MARTÍNEZ, Catedrático de Universidad emérito de la Universidad Miguel Hernández,

I N F O R M A N

Que D^a MARIA LUISA MERINO SUÁREZ, Licenciada en Medicina y estudiante del Programa de Doctorado en Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández, ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que recoge su Tesis Doctoral **“Métodos alternativos para el diagnóstico de la enfermedad de ojo seco: Termografía corneal y determinación del flujo de secreción lagrimal refleja mediante estimulación corneal con CO₂”**, que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo, y que dan su conformidad para su presentación y defensa pública.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firman el presente en Sant Joan d’Alacant, a dieciocho de abril de 2019.

Fdo.: Dra. Juana Gallar Martínez

Fdo: Dr. Carlos Belmonte Martínez



El Profesor Dr. MIGUEL A. VALDEOLMILLOS LÓPEZ, Director del Programa de Doctorado en Neurociencias impartido por el Instituto de Neurociencias, Centro Mixto de la Universidad Miguel Hernández y la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

INFORMA:



Que la Tesis Doctoral "*Métodos alternativos para el diagnóstico de la enfermedad de ojo seco: Termografía corneal y determinación del flujo de secreción lagrimal refleja mediante estimulación corneal con CO₂*" ha sido realizada por Dña. Maria Luisa Merino Suárez, licenciada en MEDICINA, bajo la dirección de la Dra. Juana Gallar Martínez y el Dr. Carlos Belmonte Martínez, y da su conformidad para que sea leída y defendida como Tesis Doctoral ante el correspondiente tribunal en la Universidad Miguel Hernández.

Para que así conste, y a los efectos oportunos, firma el presente en San Juan de Alicante, a 18 de ABRIL de 2019.

Fdo.: Prof. Dr. Miguel A. Valdeolmillos López

MODELO DE INFORME DEL CARÁCTER CONFIDENCIAL DE TESIS

A la vista de la solicitud del doctoranda **Dña. Maria Luisa Merino Suárez**, autora de la tesis titulada **Métodos Alternativos para el Diagnostico de la enfermedad de ojo seco**.

La Comisión de Estudios de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche considera que;

procede acceder a lo solicitado y, por tanto, informa favorablemente la confidencialidad de los siguientes apartados y/o páginas de la tesis/ informa desfavorablemente la confidencialidad solicitada:

Páginas 58 a 62 (ambas incluidas) correspondientes al apartado de Materiales y Métodos D y E titulados "Estimulación irritativa de la superficie corneal" y "Protocolo", respectivamente.

Páginas 82 a la 88 (ambas incluidas), correspondientes al apartado Resultados en el epígrafe "Estimulación irritativa de la superficie corneal".

Páginas 102 a 100 correspondientes al apartado de Discusión en el epígrafe "Estimulación corneal mediante CO2 en la inducción de la secreción lagrimal refleja".

En Elche, a 16 de Enero de 2019.

El Secretario de la Comisión de Estudios de Doctorado

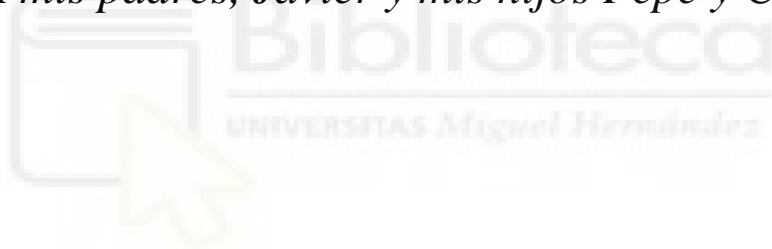
Fdo.:  **José Ángel Pérez Álvarez**


VºBº Presidente de la Comisión de Estudios de Doctorado

Fdo.:  **Manuel Miguel Jordán Vidal**


Sr. Presidente de la Comisión de Estudios de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche.-

A mis padres, Javier y mis hijos Pepe y Carmen.



ÍNDICE

RESUMEN	10
SUMMARY	9
I. INTRODUCCIÓN.....	24
A. ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR Y EL SISTEMA LAGRIMAL.....	26
A.1 Superficie ocular: descripción anatómica e inervación.	26
A.2 Propiedades y componentes de la lágrima:	36
A.3 Homeostasis de la superficie ocular.....	39
B. ENFERMEDAD DE OJO SECO.....	43
B.1 Clasificación y patogenia de la enfermedad de ojo seco.....	43
B.2 Modificación de la actividad de los receptores sensoriales corneales en la enfermedad de ojo seco.	47
B.3 Síndrome de Sjögren (SS) y enfermedad de ojo seco.	50
C. TERMOGRAFÍA CORNEAL	53
C.1 Primeras referencias en la medida de la temperatura e historia de la termografía... 53	
C.2 Perfil termográfico de la superficie ocular.....	56
II. OBJETIVOS	58
III. MATERIAL Y MÉTODOS	59
A. POBLACIÓN	59
B. PARAMETROS DE VALORACIÓN DE LA HUMEDAD EN LA SUPERFICIE OCULAR.....	60
B.1 Secreción lagrimal: Test de Schirmer.	60
B.2 Tiempo de ruptura de la película lagrimal (TBUT)	61
B.3 Grado de afectación de la superficie ocular:	61
B.4 Determinación de la altura del menisco lagrimal mediante tomografía de coherencia óptica (OCT):	62
B.5 Cuestionario de Mcmonnies:.....	63
C. TERMOGRAFÍA DE LA SUPERFICIE CORNEAL	63
C.1 Instrumento de medida:.....	63

C.2 Protocolo de medida:.....	64
C.3 Procedimiento de análisis y variables termográficas:	65
D. ESTIMULACIÓN IRRITATIVA DE LA SUPERFICIE CORNEAL	¡Error! Marcador no definido.
D.1 Instrumento para la estimulación con CO ₂	¡Error! Marcador no definido.
D.2 Procedimiento de medida.....	¡Error! Marcador no definido.
D.3 Estudio preliminar del estimulador lagrimal de CO ₂ sobre la superficie corneal. ¡Error! Marcador no definido.	
E. PROTOCOLO	¡Error! Marcador no definido.
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
IV. RESULTADOS.....	70
A. DATOS DEMOGRÁFICOS	70
B. EVALUACIÓN DE LA HUMEDAD DE LA SUPERFICIE OCULAR.	71
B.1 Flujo de secreción lagrimal basal	71
B.2 Tiempo de ruptura de la película lagrimal (TBUT)	72
B.3 Daño en la superficie corneconjuntival.....	72
B.4 Volumen del menisco lagrimal.	73
B.5 Cuestionario Mcmonnies	74
C. TERMOGRAFÍA:	74
C.1 Los pacientes SS mostraban valores de temperatura de la superficie corneal (TSC) máxima significativamente mayores que los controles.....	75
C.2 La TSC media fue mayor en los pacientes con SS que en los controles.....	75
C.3 La TSC mínima durante el intervalo inter-parpadeos fue ligeramente superior en los pacientes SS.....	76
C.4 Los pacientes con SS presentaban una variación media de TSC durante el periodo inter-parpadeo mayor que los sujetos control....	77
C.5 Los pacientes SS mostraron un incremento de la TSC tras un parpadeo mayor que los sujetos control.....	77
C.6 El tiempo medio de oclusión palpebral fue ligeramente más alto en los pacientes SS que en los controles.	79
C.7 La caída de la TSC mostraba dos velocidades de descenso durante un periodo inter- parpadeo.	79
C.8 El descenso total de la TSC a lo largo de un intervalo inter-parpadeos tendía a ser más rápido en los pacientes SS que en los controles.....	81
C.9 Correlaciones entre los parámetros clínicos y termográficos	83
D. ESTIMULACIÓN IRRITATIVA DE LA SUPERFICIE CORNEAL	87

V. DISCUSIÓN	88
A. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE EXPLORACIÓN EMPLEADOS.....	88
B. SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN.....	90
C. RESULTADOS TERMOGRÁFICOS.....	90
D. ESTIMULACIÓN CORNEAL MEDIANTE CO ₂ EN LA INDUCCIÓN DE LA SECRECIÓN LAGRIMAL REFLEJA.....	101
VI. CONCLUSIONES	102
VII BIBLIOGRAFÍA	124
IX. ANEXOS	135
X. AGRADECIMIENTOS	142



VII. ABREVIATURAS

- **EOS** Enfermedad de ojo seco
- **FSB** Flujo de secreción lagrimal basal
- **FSR** Flujo de secreción lagrimal refleja estimulada por CO₂
- **SS** Síndrome de Sjögren
- **TSC** Temperatura de la superficie corneal
- **TBUT** Tiempo de ruptura de la película lagrimal
- **OCT** Tomografía de cohorencia óptica
- **T_{MAX}** Temperatura máxima de la superficie corneal
- **T_{min}** Temperatura mínima de la superficie corneal
- **T_m** Temperatura media de la superficie corneal
- **M₁** Pendiente inicial de caída de la temperatura corneal
- **M₂** Pendiente final de caída de la temperatura corneal
- **M_T** Pendiente total de caída de la temperatura corneal
- **DGM** Disfunción glándulas de Meibomio

LISTA DE ILUSTRACIONES

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Trayecto de los nervios aferentes corneales desde el ganglio trigémino.	28
Figura 2. Inervación corneal.....	29
Figura 3. Receptores sensoriales de la córnea.....	29
Figura 4. Incremento en la descarga de los receptores polimodales ante un estímulo mecánico, químico y térmico.....	30
Figura 5. Respuesta de los receptores mecano-nociceptores ante un estímulo mecánico. ...	31
Figura 6. Respuestas de los termorreceptores de frío corneales ante el descenso de la temperatura de la superficie ocular y el incremento de la osmolaridad.....	33
Figura 7. Componentes de la película lagrimal.....	38
Figura 8. Unidad funcional lagrimal.....	39
Figura 9. Los termorreceptores de frío corneales regulan el flujo de secreción lagrimal basal y el parpadeo.....	40
Figura 10. Incremento en el flujo de secreción lagrimal en respuesta a un estímulo intenso mecánico, químico y térmico de la superficie corneal	41
Figura 11. Hipótesis de la termorregulación corneal en ratones.....	42
Figura 12. Clasificación actual de la enfermedad de ojo seco	44
Figura 13. Esquema de la patogenia de la enfermedad de ojo seco.	46
Figura 14. Respuesta de los termorreceptores de frío al enfriamiento de la superficie corneal en animales controles y con enfermedad de ojo seco.....	47
Figura 15. Respuesta de los mecano-nociceptores en cobayas controles y con enfermedad de ojo seco.....	48
Figura 16. Respuesta de los receptores polimodales al estímulo químico con CO ₂ sobre la superficie corneal.	49
Figura 17. Respuesta de los receptores polimodales al incremento en la osmolaridad de la película lagrimal.	49
Figura 18. Termoscopio de Galileo.....	53
Figura 19. Bolómetro de Mapstone.....	55

MÉTODOS

Figura 20. Protocolo de experimentación de la determinación del flujo de secreción lagrimal basal y refleja mediante estimulación con CO ₂ sobre la superficie corneal.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 21. Escala de gradación del daño de la superficie corneoescleral.	62
Figura 22. Tomógrafo de coherencia óptica	62
Figura 23. Determinación de la altura del menisco lagrimal mediante OCT.....	63
Figura 24. Cámara termográfica de rayos infrarrojos	64
Figura 25. Ubicación de la cámara termográfica con respecto a la situación del paciente. .	65
Figura 26. Imagen termográfica del globo ocular.....	66
Figura 27. . Temperatura de la superficie corneal inter-parpadeos.....	66
Figura 28. Curvatura de la temperatura de la superficie corneal durante un periodo inter-parpadeo..	67
Figura 29. Pendiente de caída de la temperatura corneal entre parpadeos..	68
Figura 30. Dispositivo estimulador de CO ₂ sobre la superficie corneal.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 31. Demostración de la técnica de medida de estimulación corneal con CO ₂	¡Error! Marcador no definido.

RESULTADOS

Figura 32. Comparación del flujo de secreción lagrimal basal entre pacientes con síndrome de Sjögren (SS) y controles.....	71
Figura 33. Comparación del TBUT entre pacientes SS y controles.	72
Figura 34. Imágenes de la superficie ocular de seis pacientes con SS.....	72
Figura 35. Comparación del daño de la superficie corneoconjuntival entre pacientes SS y controles.....	73
Figura 36. Comparación de la altura del menisco lagrimal entre grupo SS y sujetos sanos.	73
Figura 37. Comparación cuestionario de McMonnies entre grupo SS y control.....	74
Figura 38. Imágenes termográficas de la superficie ocular enfocadas al centro de la córnea.	74
Figura 39. Comparación de la media de la temperatura máxima corneal entre los pacientes SS y los controles	75

Figura 40. Comparación de la temperatura media corneal durante un intervalo interparpadeos entre pacientes SS y controles.....	76
Figura 41. Comparación de la temperatura mínima en el periodo interparpadeo entre los pacientes SS y sujetos control.	76
Figura 42. Comparación de la variación media de temperatura corneal durante un periodo interparpadeo entre pacientes SS y sujetos control.	77
Figura 43. Aumento de temperatura corneal entre la temperatura mínima y la temperatura máxima inmediata tras un parpadeo.	78
Figura 44. Tiempo medio de cierre palpebral en los pacientes SS y controles.	79
Figura 45. Comparación descenso de temperatura corneal (inicial (M_1) menos final (M_2)) durante el periodo inter-parpadeos en el grupo SS.	80
Figura 46. Comparación del descenso de temperatura corneal durante el periodo interparpadeos en sujetos control.	80
Figura 47. Comparación de la pendiente total de descenso de la temperatura corneal entre pacientes SS y controles.....	81
Figura 48. Comparación de la pendiente M_1 entre controles y pacientes SS.....	82
Figura 49. Comparación pendiente M_2 entre controles y pacientes SS.....	82
Figura 50. Correlación entre la afectación de la superficie corneconjuntival y la temperatura mínima de la superficie corneal.	85
Figura 51. Correlación entre la edad y la temperatura máxima de la superficie ocular.	86
Figura 52. Correlación entre la edad y la temperatura mínima de la superficie ocular.	86
Figura 53. Flujo de secreción lagrimal basal y estimulado con CO_2 en el grupo de voluntarios sanos.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 54. Valores medios de los flujos de secreción lagrimal basal y estimulado con CO_2 en el grupo de voluntarios sanos.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 55. Comparación de la variación entre el flujo basal y el flujo estimulado mediante CO_2 en los grupos control, con enfermedad subclínica y SS.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 56. Comparación de los valores medios de flujo de secreción basal y flujo estimulado con CO_2 en el grupo de pacientes oftalmológicos: pacientes SS, grupo subclínico y controles.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 57. Comparación del EVA tras la estimulación de CO_2 sobre la superficie corneal entre el grupo SS y controles.....	¡Error! Marcador no definido.

Figura 58. Comparación de la media de afectación del CO₂ sobre la superficie corneal.

..... ¡Error! Marcador no definido.

DISCUSIÓN

Figura 59. Pendiente de temperatura corneal entre 2 parpadeos en humanos..... 98

Figura 60. Descenso de la temperatura de la superficie corneal durante un intervalo interparpadeos..... 98

Figura 61. Hipótesis fisiopatológica de la termorregulación de la superficie corneal en pacientes SS..... 101

Figura 62. . Comparación entre la respuesta de intensidad subjetiva en la E.V.A. en humanos y en \varnothing imp/s de todos los nociceptores estudiados y así como la respuesta a la estimulación química..... ¡Error! Marcador no definido.

Figura 63. Secreción lagrimal en pacientes control tras la aplicación de un estímulo moderado o fuerte sobre el centro de la córnea..... ¡Error! Marcador no definido.

Figura 64. Dispositivo “True Tear”..... ¡Error! Marcador no definido.

Figura 65. Tasa de secreción lagrimal sin estimular y estimulada con el “true tear” ¡Error! Marcador no definido.

Figura 66. Eventos adversos reportados con el dispositivo “True Tear” ¡Error! Marcador no definido.

Figura 67. Correlación entre la magnitud del estímulo químico aplicado sobre la córnea y los valores de EVA indicados por los sujetos ¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Clasificación etiológica de la enfermedad de ojo seco.....	45
Tabla 2. Manifestaciones del síndrome de Sjögren (SS) primario.....	50
Tabla 3. Criterios de clasificación de la AECG	51

RESULTADOS

Tabla 4. Datos demográficos grupo control y SS.....	70
Tabla 5. Otras enfermedades presentes en la población.....	71
Tabla 6. Comparación de la temperatura corneal en pacientes SS y controles.	78
Tabla 7. Comparación de las pendientes de descenso de temperatura corneal en ambos grupos.	81
Tabla 8. Comparación de las pendientes de caída de la temperatura corneal entre controles y pacientes SS.....	83
Tabla 9. Correlaciones entre los parámetros termográficos y clínicos en los pacientes	84
Tabla 10. Correlaciones entre los parámetros termográficos y clínicos en los controles....	87
Tabla 11. Flujos de secreción lagrimal basal y refleja en el grupo de pacientes oftálmológicos..	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 12. Tratamiento farmacológico de los pacientes SS..	¡Error! Marcador no definido.

DISCUSIÓN

Tabla 13. Valores de la temperatura corneal durante el periodo inter-parpadeos en pacientes con enfermedad de ojo seco y en sujetos sanos.....	92
Tabla 14. Comparación de las pendientes de descenso de la temperatura corneal entre parpadeos por diferentes autores..	94
Tabla 15. Comparación de cambio de temperatura corneal a través del tiempo en los diferentes grupos de edad	97

RESUMEN

La córnea es uno de los tejidos más profusamente inervados del cuerpo humano. Sus terminaciones sensitivas responden a estímulos químicos, mecánicos y térmicos de la superficie ocular, y su activación pone en marcha un complejo mecanismo regulador que genera respuestas compensadoras para el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular. La lesión de estos receptores unido a la insuficiencia de los mecanismos compensadores y el mantenimiento en el tiempo de esta condición, conducen a la aparición de la enfermedad de ojo seco (EOS).

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido evaluar en seres humanos la contribución de los termorreceptores de frío y los nociceptores polimodales de la superficie ocular a la patogenia de la EOS, valiéndonos del uso de técnicas indirectas, como la termografía corneal, que permite obtener una estimación indirecta del grado de actividad de los termorreceptores de frío y la estimulación química de los nociceptores polimodales mediante la aplicación de CO₂ sobre la superficie corneal.

Un total de 104 sujetos fueron estudiados y divididos en dos grupos: 1. Grupo de estudio preliminar: integrado por 23 voluntarios sanos en los que se evaluó únicamente el incremento del flujo lagrimal producido por la estimulación de CO₂ sobre la superficie corneal; 2) grupo de pacientes oftalmológicos: formado por los 81 sujetos restantes que a su vez se dividieron en: 30 pacientes diagnosticados de síndrome de Sjögren (SS) primario o secundario, 30 controles, 13 sujetos con enfermedad subclínica y, finalmente, 8 excluidos. En todos los pacientes del grupo oftalmológico se aplicaron las siguientes pruebas: test de Schirmer en condiciones basales (FSB) y tras la aplicación del estímulo de CO₂ sobre la superficie corneal (FSR), medida de la altura del menisco lagrimal determinada por tomografía

de coherencia óptica (OCT), tiempo de ruptura de la película lagrimal (TBUT), grado de daño de la superficie corneconjuntival tras tinción con fluoresceína según la escala Oxford y un cuestionario de sintomatología de Mcmonnies. Además, estudiamos la temperatura de la superficie corneal (TSC) mediante termografía; analizando los valores de temperatura máxima (T_{Max}), temperatura mínima (T_{min}), temperatura media (T_m), variación de TSC por segundo, tiempo medio de oclusión palpebral y pendiente de caída de la temperatura durante el intervalo entre dos parpadeos consecutivos (intervalo inter-parpadeos).

Los pacientes con SS presentaban, por definición, todos los parámetros clínicos indicativos de la presencia EOS con respecto a los sujetos normales (Test Schirmer $p < 0,001$; TBUT $p < 0,001$; Tinción corneal $p < 0,001$; cuestionario de Mcmonnies $p < 0,001$ y altura del menisco lagrimal $p < 0,001$; U de Mann-Whitney).

El grupo SS mostró valores de temperatura significativamente superiores a los controles inmediatamente tras el parpadeo (T_{Max} : SS $34,77 \pm 0,61^\circ\text{C}$ vs controles $33,93 \pm 0,84^\circ\text{C}$; $p < 0,001$ t-student) y a los 2s tras la apertura palpebral (T_m : SS $34,23 \pm 0,69^\circ\text{C}$ vs $33,56 \pm 0,84^\circ\text{C}$ controles, t-student, $p = 0,001$), siendo ligeramente superiores al final del intervalo inter-parpadeos (T_{min} : SS $33,63 \pm 0,7^\circ\text{C}$ vs $33,23 \pm 0,9^\circ\text{C}$ controles; $p = 0,078$ t-student). La pendiente de caída de la TSC durante un periodo inter-parpadeos mostró un perfil bifásico tanto en los pacientes SS como en los controles: un descenso rápido durante los primeros segundos tras la apertura palpebral (pendiente M_1), seguida de otra más lenta (pendiente M_2) y ambas pendientes de caída fueron ligeramente superiores en el grupo SS que en los controles (M_1 SS: $-0,37 \pm 0,31^\circ\text{C/s}$ vs control $-0,26 \pm 0,2^\circ\text{C/s}$; $p = 0,22$ y M_2 SS: $-0,09 \pm 0,07^\circ\text{C/s}$ vs Control: $-0,22 \pm 0,83$; $p = 0,35$). El ritmo de caída medio de la TSC por segundo en los pacientes con SS fue mayor que en los controles (SS: $-0,116$

$\pm 0,69$ °C/s vs Controles: $-0,080 \pm 0,61$ °C/s; $p=0,011$; U Mann Whitney) al igual que el tiempo medio de oclusión palpebral a pesar de que no llegó a alcanzar la significación estadística (SS: $1,18 \pm 0,6$ s vs controles $1,11 \pm 0,44$ s; $p=0,62$ t-student).

El análisis de Pearson no mostró correlaciones entre los parámetros termográficos y clínicos excepto en el grupo SS en el que se observó una relación inversa entre la severidad de afectación corneconjuntival y el valor de T_{\min} ($p=0,04$) y la edad con la T_{\min} y T_{\max} ($p=0,04$ y $p=0,01$, respectivamente). El descenso de TSC con la edad fue de $-0,02$ °C al año (Correlacion de Pearson T_{\max} $R=-0,36$ $p=0,04$; T_{\min} $r=0,46$; $p=0,01$).

La estimulación corneal con CO₂ mostró un incremento significativo en el flujo de secreción lagrimal basal en los dos grupos en respuesta a la estimulación química de los nociceptores polimodales: 1. Grupo de ensayo preliminar (FSB= $16,28 \pm 8,7$ mm vs FSR= $21,26 \pm 8,9$ mm; $p=0,034$; U de Mann-Whitney); 2. Grupo de pacientes oftalmológicos: (SS: FSB $6,6 \pm 3,02$ mm vs FSR $8,5 \pm 3,2$ mm ; Controles: FSB $13,83 \pm 6,7$ mm vs FSR $19 \pm 9,9$ mm; $p < 0,05$; U Mann-Whitney), al tiempo que generaba una sensación razonablemente poco irritante para el paciente (SS EVA=3 vs control EVA=2; $p < 0,05$, U Mann-Whitney). La determinación del flujo de secreción lagrimal refleja nos permite diferenciar claramente el paciente sano del afecto de EOS, incluso de los casos dudosos de enfermedad subclínica (FSR: Controles: $19,9 \pm 9,9$ mm vs subclínicos: $9,3 \pm 3,9$ mm; $p < 0,001$; U de Mann Whitney). La temperatura y humedad ambiental media registrada fueron $23,29 \pm 0,93$ °C y $42,48 \pm 7,12$ %, respectivamente.

La temperatura corneal superficial refleja en gran medida la de la cámara anterior, fundamentalmente dependiente de la irrigación sanguínea ocular. Los mayores valores medios de temperatura en la cornea en los pacientes de SS sugiere un cierto grado de hiperemia debida a inflamación en

el segmento anterior. La menor actividad esperable en los termorreceptores de frío de la cornea con temperaturas mas altas debería acompañarse de menor molestia e irritación en estos pacientes. El resultado contrario sugiere que la persistencia de sequedad ocular y la hiperosmolaridad de la película lagrimal lesiona las terminaciones de frío, dando lugar a su actividad anómala (neuropática). La secreción lagrimal refleja evocada por estimulación de los nociceptores polimodales en los pacientes con SS es más baja que en sujetos normales, como cabe esperar del daño en la glandula lacrimal provocado por la SS. El porcentaje de aumento sobre el valor basal es significativamente más bajo que en los controles pero la persistencia de un aumento reflejo sugiere que la capacidad de respuesta de las fibras nerviosas nociceptoras se mantiene en estos pacientes, posiblemente sensibilizada por la inflamación, lo que explica tambien las sensaciones aumentadas de molestia ocular presentes en los pacientes de ojo seco.



SUMMARY

The cornea of the eye is the most profusely innervated tissue of the human body. Its sensory nerve endings respond to chemical, mechanical and thermal (cold and heat) stimuli of the ocular surface activating some regulatory mechanisms for the protection of the ocular surface such as flickering and tearing. The integrity of the ocular surface basically depends on the lacrimal, nutritive and lubricating layer, which requires a continuous flow and a homogeneous distribution on the surface of the anterior segment of the eye thanks to the regular flickering. The insufficiency of those compensatory mechanisms in dry eye disease (DED) and its maintenance over time lead to the damage of cornea receptors and ocular surface.

The aim of this PhD thesis was to evaluate the specific contribution of cold thermoreceptors and polymodal nociceptors of the ocular surface to the pathogenesis of DED in humans. For this purpose, we use indirect techniques such as corneal thermography, which obtain an estimation of the activity of cold thermoreceptors, and as chemical stimulation of the polymodal nociceptors through the application of CO₂ upon the corneal surface.

A total of 104 subjects were studied and splitted in two groups: 1) Preliminary study group: 23 healthy volunteers were evaluated to study the increase in lacrimal flow produced by the stimulation of CO₂ on the corneal surface; 2) group of 81 ophthalmological patients divided into: 30 patients diagnosed by primary or secondary Sjögren's syndrome (SS), 30 controls, 13 subjects with subclinical disease and, finally, 8 subjects excluded. In the patients of the ophthalmological group the following tests were applied: Schirmer's test in basal conditions (STB) and after the application of the CO₂ stimulus on the corneal surface (STS), height of the lacrimal meniscus determined by optical coherence tomography (OCT), tear film break-up time

(TBUT), damage of the corneconjunctival surface after fluorescein staining according to the Oxford scale and McMonnies symptomatology questionnaire. In addition, we studied the temperature of the cornea surface (CST) by thermography, analyzing the values of maximum temperature (TMax), minimum temperature (Tmin), average temperature (Tm), variation of CST per second, average time of eyelid occlusion and slope of falling temperature during the interval between two consecutive blinks (inter-blink period). Patients with SS presented significant differences in all the clinical features indicative of DED with respect to normal subjects (STB $p < 0.001$, TBUT $p < 0.001$, corneal staining $p < 0.001$, McMonnies questionnaire $p < 0.001$ and height of the lacrimal meniscus $p < 0.001$; U of Mann-Whitney). The SS group showed significantly higher temperature on the ocular surface than the controls immediately after blinking (TMax: SS 34.77 ± 0.61 °C vs. controls 33.93 ± 0.84 °C, $p < 0.001$ t-student) and after 2 secs from the palpebral opening (Tm: SS 34.23 ± 0.69 °C vs 33.56 ± 0.84 °C controls, t-student, $p = 0.001$), being just slightly superior at the end of the inter-blink period (T min: SS 33.63 ± 0.7 °C vs 33.23 ± 0.9 °C controls, $p = 0.078$ t-student). The slope of CST's fall during the inter-blink period showed a biphasic profile both in SS patients and in controls: a rapid decrease during the first seconds after palpebral opening (slope M_1), followed by a slower one until eye closure (slope M_2) and both fall slopes were slightly higher in the SS group than in the controls (M_1 SS: -0.37 ± 0.31 °C / s vs control -0.26 ± 0.2 °C / s, $p = 0.22$ and M_2 SS: -0.09 ± 0.07 °C / s vs Control: -0.22 ± 0.83 , $p = 0.35$). The rate of average fall of the CST per second in the patients with SS was higher than in the controls (SS: -0.116 ± 0.69 °C / s vs Controls: -0.080 ± 0.61 °C / s, $p = 0.011$; U Mann Whitney) as well as the mean time of palpebral occlusion despite the fact that it did not reach statistical significance (SS: 1.18 ± 0.6 s vs controls 1.11 ± 0.44 s, $p = 0.62$ t-student). Indeed, an inverse relationship was observed between the severity of corneconjunctival involvement and the T_{min}

value ($p = 0.04$) and between age with the T_{\min} and T_{\max} ($p = 0.04$ and $p = 0.01$, respectively) in the SS group; however, Pearson's analysis didn't show any other correlation between thermographic and clinical parameters. The decrease in CST with age was -0.02 ° C per year (Pearson's correlation T_{\max} $R = -0.36$ $p = 0.04$, T_{\min} $r = 0.46$, $p = 0.01$). The corneal stimulation with CO_2 showed a significant increase in the basal tearing flow in response to the chemical stimulation of the polymodal nociceptors in the two study groups: 1) preliminary test group: $\text{STB} = 16.28 \pm 8.7\text{mm}$ vs $\text{STS} = 21.26 \pm 8.9\text{mm}$, $p = 0.034$; U of Mann-Whitney; 2) group of ophthalmological patients: (SS: $\text{STB} 6.6 \pm 3.02\text{mm}$ vs $\text{STS} 8.5 \pm 3.2\text{mm}$; Controls: $\text{STB} 13.83 \pm 6.7\text{mm}$ vs $\text{STS} 19 \pm 9.9\text{mm}$; $p < 0, 05$; U Mann-Whitney), while generating a sensation that is slightly irritating to the patient: SS $\text{EVA} = 3$ vs control $\text{EVA} = 2$, $p < 0.05$, U Mann-Whitney. The determination of the reflex tearing flow allows us to clearly differentiate the healthy patient from the DED, even in the doubtful cases of subclinical disease (STS: Controls: 19.9 ± 9.9 mm vs subclinical: $9.3 \pm 3, 9\text{mm}$; $p < 0.001$; U from Mann Whitney). The average environmental temperature and humidity recorded were 23.29 ± 0.93 ° C and $42.48 \pm 7.12\%$, respectively.

As the superficial cornea temperature reflects that of the anterior chamber of the eye and mainly depends on the ocular blood supply, the higher temperature in the SS patient's corneas suggests a certain degree of hyperemia due to inflammation in the anterior segment. Despite the fact that higher temperature in the cornea should slow the cold thermoreceptors activity and should be accompanied by less discomfort and irritation in these patients, the opposite result suggests that the persistence over time of ocular dryness and hyperosmolarity of the tear film damages the cold thermal endings, giving rise to its anomalous (neuropathic) activity. The reflex tearing secretion evoked by stimulation of polymodal nociceptors with CO_2 in

patients with SS is lower than in normal subjects, as can be expected given the damaged lacrimal gland in SS. Eventhough the basal tearing flow is significantly lower in SS, the persistence of a reflex response suggests that the activity of the nociceptors nerve fibers is maintained in these patients, possibly sensitized by inflammation, which also explains the increased sensations of ocular discomfort present in dry eye patients.



“El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles, porque, bien analizados, pueden conducir al éxito”.

Sir Alexander Fleming

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de ojo seco (EOS) es en la actualidad una de las patologías que concentra un mayor esfuerzo en el campo de la investigación ocular. Este fenómeno se justifica por diversas razones. En primer lugar, es una de las enfermedades más prevalentes que encontramos en las consultas de oftalmología estimándose en torno al 18,4% en nuestro país (¹). En segundo lugar, sus bases fisiopatológicas se conocen todavía de forma incompleta lo que conlleva, en tercer lugar, a que no exista un tratamiento curativo basado en la etiología.

De manera general está establecido que la causa fundamental del ojo seco es un defecto en la producción lagrimal o un exceso en la evaporación de la misma ^{2,3} y que existe un complejo mecanismo regulador encargado de mantener la homeostasis de la superficie ocular, cuyas alteraciones juegan un papel decisivo en la patología de la enfermedad. Sin embargo, se ignoran todavía muchas de las características funcionales del sistema de regulación de la humedad en la superficie ocular y sus trastornos en circunstancias patológicas.

La superficie ocular mantiene un grado adecuado de humedad gracias a la película lagrimal que la recubre, formada por una capa mucoacuosa en contacto con el epitelio y una capa lipídica externa. Las lágrimas son

segregadas de modo continuo por glándulas especializadas, distribuyéndose de modo homogéneo por toda la superficie ocular gracias al cierre regular de los parpados. Por otro lado, la evaporación, dependiente fundamentalmente de factores ambientales, tiende a reducir de modo continuo el componente acuoso de la película lagrimal. A pesar de los variables factores intrínsecos (cambios en la composición y volumen de la lágrima) o ambientales (humedad, viento, temperatura) que tienden a modificar la película lagrimal, esta mantiene una composición y volumen constantes gracias a complejos mecanismos de regulación nerviosa, que ajustan el flujo de lagrimas y el ritmo de parpadeo a las cambiantes condiciones ambientales a las que están continuamente expuestos los ojos de los mamíferos terrestres.

La córnea posee numerosas terminaciones nerviosas sensitivas que responden a estímulos químicos, mecánicos y térmicos sobre la superficie ocular³. La estimulación de estos terminales, especialmente sus nociceptores polimodales y termorreceptores de frío, activa un arco reflejo que tiene la finalidad de reestablecer el equilibrio homeostático de la superficie ocular mediante el aumento de la secreción lagrimal y la frecuencia de parpadeo³. Estos hallazgos se han confirmado mediante registros electrofisiológicos *in vivo* e *in vitro* de la actividad de las terminaciones nerviosas. Sin embargo, en los seres humanos dada la imposibilidad de realizar estos registros la estimación de esta actividad ha de hacerse empleando técnicas indirectas.

Una de estas técnicas es la termografía corneal que determina de forma dinámica la TSC. Las variaciones en la temperatura son detectadas por los termorreceptores de frío corneales cuya activación produce la sensación de discomfort ocular propia de la EOS.

Por otra parte, los nociceptores polimodales responden a estímulos químicos como la variación del pH lagrimal. Esta modificación del pH se puede lograr experimentalmente dirigiendo un flujo controlado y conocido de

CO₂ hacia la superficie corneal que genera ácido carbónico al contacto con la lágrima, provocando una disminución de su pH (^{4,5,6,7,8}). La activación de los nociceptores polimodales es percibida por los sujetos como una sensación de “quemazón” o molestia “punzante” (^{4,8}) y desencadenará un incremento de la secreción lagrimal. La medida objetiva de esa secreción lagrimal estimulada por CO₂ refleja de forma indirecta la actividad de los nociceptores polimodales.

En nuestro estudio se desarrollará el método para la estimación de la actividad de los termorreceptores de frío mediante el registro termográfico de la superficie ocular y de los nociceptores polimodales mediante la determinación del flujo de secreción lagrimal tras estímulo químico controlado.

En los siguientes apartados abordaremos la anatomía y fisiología de los componentes que conforman la superficie ocular como unidad funcional, y caracterizaremos la enfermedad de ojo seco.

A. ESTRUCTURA Y FISIOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR Y EL SISTEMA LAGRIMAL.

A.1 Superficie ocular: descripción anatómica e inervación.

A.1.1 La córnea

La córnea es un tejido avascular y transparente que está ricamente inervado. Estructuralmente se distinguen 5 capas que enumeramos de superficie en profundidad: 1) Epitelio, 2) Capa de Bowman, 3) Estroma, 4) Membrana de Descemet y 5) Endotelio².

El epitelio corneal, de origen ectodérmico, es estratificado, escamoso y no queratinizado. Está integrado en los mamíferos por 5 o 6 capas celulares,

dependiendo de la especie, de unas 50 micras de espesor por donde discurren las terminaciones nerviosas sensitivas. Desde la superficie hacia la base, encontramos en el epitelio distintos tipos celulares: células escamosas, células aladas y células columnares que son las únicas del epitelio con capacidad de reproducción ^(2,3,9,10). Estas últimas células descansan sobre una lámina basal que se adhiere a la capa de Bowman subyacente mediante fibras de colágeno tipo VII.

La capa de Bowman, que sólo se encuentra en primates, se compone de un tejido acelular y carece de capacidad regenerativa. Seguidamente, se sitúa el estroma que constituye el 90% del espesor total corneal. Está integrado principalmente por fibras de colágeno tipo I, cuya disposición uniforme y bien organizada en láminas determina la transparencia corneal. Esta estructura se asienta sobre la membrana de Descemet, secretada por el endotelio desde la 8ª semana de gestación. La membrana de Descemet está compuesta por colágeno tipo IV y VIII, glicoproteínas, fibronectina y laminina, y posee capacidad de regeneración.

Por último, la capa más interna la constituye el endotelio corneal, compuesto por una monocapa de células hexagonales íntimamente unidas entre sí y sin propiedad de renovación. La principal función del endotelio es la regulación de la hidratación y la nutrición corneal, permitiendo el movimiento a su través de agua, iones y pequeños nutrientes hacia el estroma ^(2,3,9,10)

La inervación sensorial del globo ocular, depende principalmente de las neuronas localizadas en la región dorsomedial del ganglio trigémino homolateral, denominada región oftálmica ^(11,12). Las fibras sensoriales alcanzan el ojo a través de los nervios ciliares largos y cortos, desde la rama nasociliar de la división oftálmica del V par craneal. Estas fibras contienen además inervación simpática y parasimpática y conforman un anillo alrededor del nervio óptico, manteniéndose la lámina cribosa desprovista de inervación.

Desde ahí avanzan recorriendo el globo ocular en dirección postero-anterior entre la coroides y la esclera (Figura 1).

Las fibras que van a inervar la córnea se originan en el plexo ciliar, separándose de las que inervarán el iris o el cuerpo ciliar. En la córnea los troncos nerviosos se distribuyen formando un sistema de plexos con varias capas interconectadas de fibras nerviosas ⁽¹³⁾ y finalizan como terminaciones nerviosas libres mostrando, a lo largo de su trayecto terminal pequeños engrosamientos, o varicosidades ⁽¹⁴⁾. La córnea recibe una parte muy significativa de la inervación ocular total alcanzando una densidad de fibras nerviosas que se estima es 300-400 veces superior a la de la yema de los dedos o los dientes ^(3,15,16). La mayoría de los axones dirigidos al ojo son amielínicos (fibras C) rodeadas, de forma incompleta, por células de Schwann, mientras que algo menos del 30% presentan una vaina mielínica (fibras A-delta y A-beta) ³.

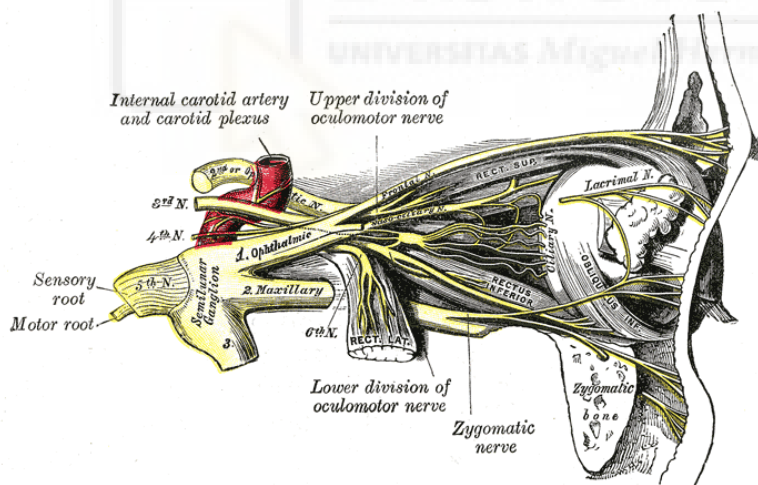


Figura 1. Trayecto de los nervios aferentes corneales desde el ganglio trigémino.

Anatómicamente, la inervación sensorial de la córnea se organiza en cuatro niveles: plexo estromal, plexo subepitelial, plexo subbasal y terminaciones intraepiteliales (Figura 2).

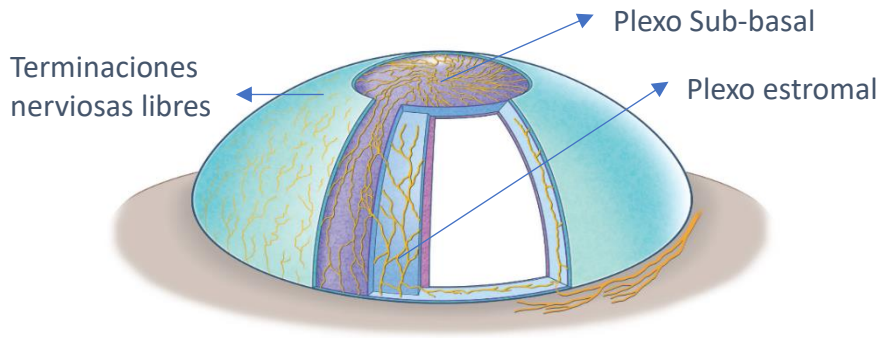


Figura 2. Inervación corneal de interior a capas más externas: plexo estromal, plexo sub-basal y terminaciones nerviosas libres.

A.1.1.1 Características funcionales de la inervación sensorial corneal:

El estudio de la respuesta electrofisiológica de las fibras nerviosas periféricas del ojo a estímulos físicos y químicos (17,18,19.) ha permitido identificar varias modalidades funcionales de receptores sensoriales en la córnea y la conjuntiva (20, 21, 22).

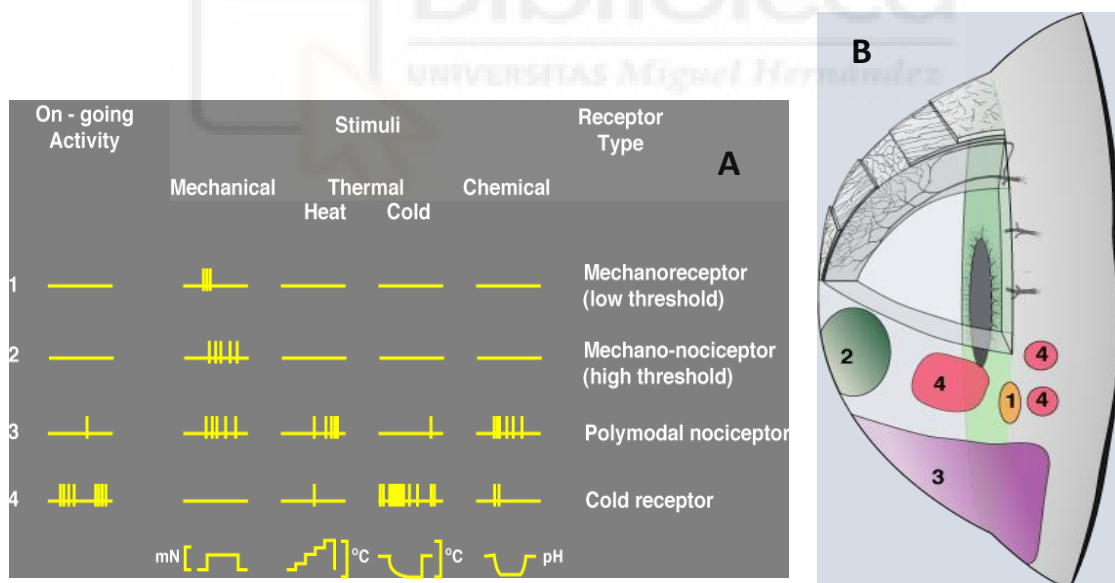


Figura 3. Receptores sensoriales de la córnea. (A) Descripción de la variedad de terminales sensoriales B. Relación de los campos receptores en la córnea de estas fibras nerviosas.

- *Nociceptores polimodales*: Corresponden aproximadamente a dos tercios de las fibras sensoriales de la córnea, en su mayoría amielínicas y se han distinguido diferentes subpoblaciones de acuerdo con su fenotipo molecular, la morfología de sus terminaciones nerviosas y la distribución epitelial dentro

de la córnea (23). Son activados por un amplio espectro de estímulos que incluyen fuerzas mecánicas, calor, frío intenso, irritantes químicos exógenos y moléculas endógenas liberadas por los tejidos lesionados. Se ha comprobado que soluciones con un pH ácido (entre 5.0-6.5) o la aplicación de CO₂ en forma gaseosa (que en contacto con la superficie ocular forma ácido carbónico, liberando protones) también activan estos receptores(3,7). En estudios psicofísicos en humanos, se ha observado que la activación de los receptores polimodales con este estímulo químico (0-80% CO₂) evoca sensaciones de dolor punzante y quemazón (3,7).

La respuesta de los receptores polimodales a los diferentes estímulos consiste en una descarga continua e irregular de impulsos nerviosos, de frecuencia más o menos proporcional a la magnitud del estímulo. Sus campos receptores son circulares, ovales o redondos y usualmente, extensos, abarcando hasta un 25% del área de la córnea. La gran amplitud de estos campos receptores y su solapamiento explican la escasa capacidad de localización de los estímulos en la superficie ocular (24).

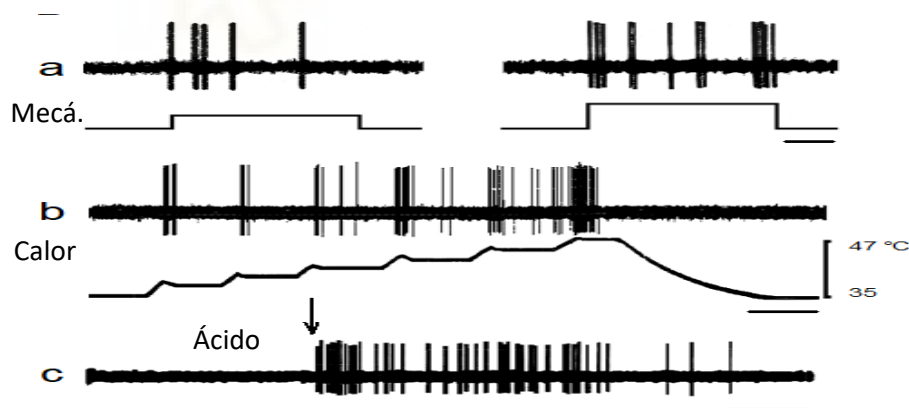


Figura 4. Incremento en la descarga de los receptores polimodales ante un estímulo mecánico(A), químico(B) y térmico(C). Ref (4,5,6)

▪ *Mecano-nociceptores*: Representan alrededor del 15-20% de las fibras sensoriales y responden a fuerzas mecánicas de una magnitud próxima a la requerida para producir daño en las células epiteliales corneales (18,25); es decir, se activan por estímulos de alta intensidad siendo, presumiblemente, los

responsables de la sensación de dolor aguda secundaria a un estímulo mecánico. Se trata en su mayoría de fibras escasamente mielinizadas (A δ), cuyos campos receptores cubren aproximadamente un 10% de la superficie corneal.

Recientemente se ha identificado un canal iónico de los receptores mecánicos, denominado Piezo2, que parece ser un marcador de estas neuronas mecano-nociceptoras (^{26,27,28}).

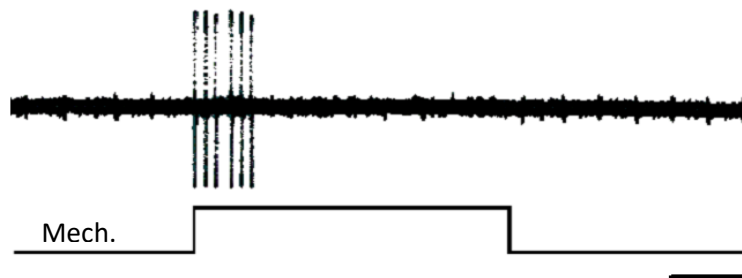


Figura 5. Respuesta de los receptores mecano-nociceptores ante un estímulo mecánico. (4,5,6).

- *Termorreceptores de frío:* Constituyen entre el 10 y el 15% del total de los receptores sensoriales de la córnea. Presentan descarga espontánea a temperaturas basales de la superficie ocular (34-35°C) y su actividad aumenta o disminuye con el enfriamiento o calentamiento de la superficie ocular, respectivamente (^{5,6,29,30,31}) (Figura 6-A). Estudios realizados en ratones han documentado que los termorreceptores incrementan también su actividad en respuesta a aumentos de la osmolaridad lagrimal (^{6,34,32,33,34}), cuando ésta pasa de 310mOsm/L a valores mayores de 340mOsm/L (Figura 6-B) (³⁶). Los termorreceptores de frío poseen campos receptores pequeños (alrededor de 1mm de diámetro) localizados en toda la superficie corneal, aunque son más abundantes en áreas periféricas.

Experimentalmente se han distinguido dos subpoblaciones de termorreceptores de frío: los llamados HB-LT (^{5,23,35}), de las siglas en inglés “*high background, low threshold*”, es decir, receptores de frío con actividad

basal alta a la temperatura normal de la cornea, que aumenta con descensos pequeños de temperatura (bajo umbral) y constituyen alrededor del 70% del total de esta clase de terminales sensoriales; y los LB-HT^(6,23,32) (*“low background, high threshold”*), terminales con actividad basal muy baja a la temperatura corneal basal y que responden sólo cuando esta desciende varios grados, es decir con alto umbral. Estos suponen cerca del 30% del total de los termorreceptores de frío (Figura 6-C).

Los HB-LT son, por tanto, muy susceptibles a cambios sutiles de la temperatura de la superficie corneal (de 0,5°C o incluso menos) ^(6,23,36,37) y su respuesta es proporcional a la magnitud del cambio ^(6,38).

La otra subpoblación de termorreceptores corneales, LB-HT, presenta una actividad espontánea muy baja y se activan solo con enfriamientos corneales de gran magnitud (mayores de 4°C), generando una respuesta menos energética ^(23,39).

Los terminales de frío deben su sensibilidad al frío a la presencia en su membrana de un canal iónico llamado TRPM8, que se abre con el enfriamiento, el incremento de osmolaridad y la exposición a algunas sustancias químicas como el mentol. ⁽³⁵⁻³⁹⁾. Se piensa que los termorreceptores de frío corneales están implicados en la detección de la sequedad ocular y en el control de la frecuencia del parpadeo ^(3,24).

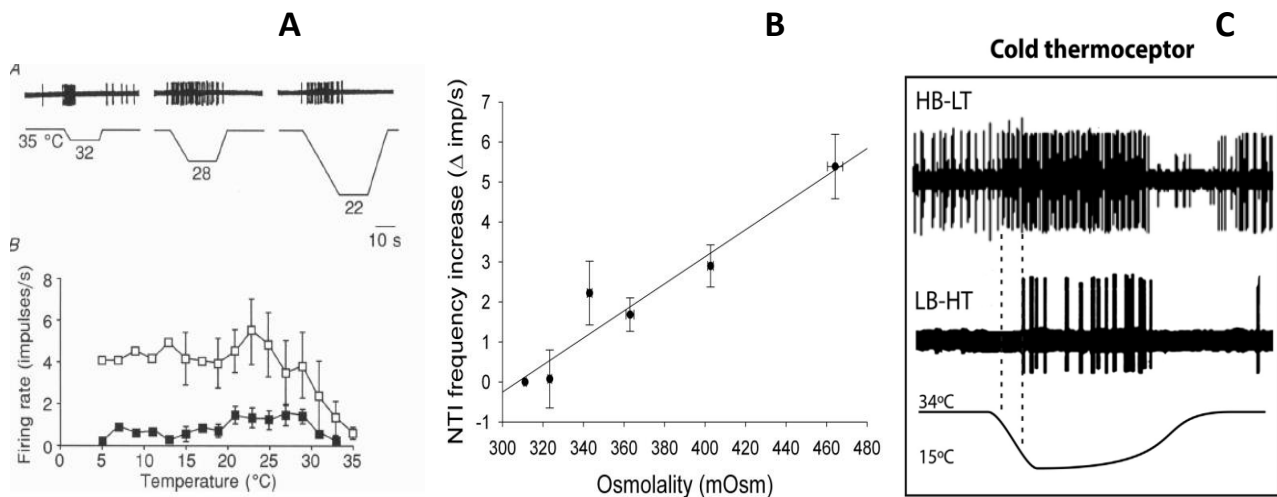


Figura 6. Respuestas de los termorreceptores de frío corneales ante el descenso de la TSC⁵(A) y el incremento de la osmolaridad³⁵ (B). C. Descarga de las dos subpoblaciones de termorreceptores de frío (HB-LT vs LB-HT) con el enfriamiento corneal⁴⁰.

La información sensorial del ojo es conducida por las neuronas ganglionares a la porción ventral del complejo nuclear del trigémino homolateral en el tronco encefálico donde se encuentran las neuronas de segundo orden. Desde allí, se proyectará hacia distintas regiones del sistema nervioso central como el núcleo motor facial y el tálamo contralateral y desde este último, a las áreas corticales somatosensoriales responsables de la sensación consciente de dolor^(3,24).

A.1.2 Conjuntiva: anatomía y regulación neural.

La conjuntiva es una membrana mucosa compuesta por un tejido conectivo laxo al cual se asocia tejido linfoide y cubierta por un epitelio estratificado no queratinizado. Sus funciones principales son: actuar como barrera frente a agresiones externas y secretar una gran variedad de productos que forman la película lagrimal⁽²⁾.

El epitelio deriva de *células pluripotenciales*, que son aquellas con una alta capacidad de diferenciación y cuya localización en la conjuntiva todavía no está clarificada^(40,41,42,43). Entre sus tipos celulares destacan las células epiteliales y caliciformes⁽²⁾.

Las *células epiteliales* producen agua, electrolitos, mucina y otras proteínas funcionales (^{44,45}). Las capas más superficiales de estas células secretan una membrana integral de mucinas que constituyen el glicocálix (⁴⁶), el cual, actúa como lubricante reduciendo la fricción en la superficie ocular y como anti-adhesivo combatiendo la colonización microbiana (^{47,48,49}). El sistema nervioso autónomo regula la secreción de estas células, mostrando una clara predominancia la actividad del sistema simpático sobre el parasimpático (⁵⁰).

Las *células caliciformes* de la conjuntiva sintetizan y almacenan proteínas y mucina ^{51,52,53} que, mediante secreción apocrina, son liberadas posteriormente hacia el exterior. Estas células están reguladas por el sistema autónomo con predominancia de la inervación parasimpática (^{54,55}).

A.1.3 Glándulas secretoras de los componentes de la película lagrimal: anatomía y regulación neural.

Las glándulas lagrimales, principal y accesorias, así como las glándulas de Meibomio, son las encargadas de la secreción de los componentes acuoso y lipídico, respectivamente, de la película lagrimal (^{2,3}).

La *glándula lagrimal* es la principal productora de electrolitos, agua y proteínas de la lágrima (^{56,57,58,59,60,61}). Se trata de una glándula serosa de estructura túbulo-acinar integrada por células acinares, tubulares y mioepiteliales. Las células acinares se encargan de generar, almacenar y liberar el agua, electrolitos, proteínas y mucinas que están contenidos en unos gránulos situados en su porción más apical (^{62,63}). Las células ductales, en cambio, se encargan de modificar el fluido secretado por las células acinares mediante la absorción o secreción de electrolitos y agua (^{64,65}). Además, la glándula lagrimal presenta, en condiciones normales, abundantes células inmunológicas que ocupan el espacio intersticial: células plasmáticas,

linfocitos B y T, células dendríticas, macrófagos, monocitos y mastocitos (66). Las células plasmáticas son las sintetizadoras de numerosas inmunoglobulinas, entre las que destaca la inmunoglobulina A que confiere a la lágrima propiedades bactericidas (63,64).

El sistema autónomo, simpático y parasimpático, regula la labor secretora de la glándula lagrimal. La actividad de estos nervios eferentes está dirigida por reflejos iniciados por la activación de los receptores sensoriales de la superficie ocular. Estudios recientes indican que los termorreceptores de frío corneales captan cambios en la superficie ocular secundarios a la sequedad ocular que activan la secreción basal lagrimal (34). La secreción refleja viene dada por el estímulo nocivo inicial registrado por los polimodales o mecano-nociceptores sensoriales de la córnea y conjuntiva (67).

A pesar de que tanto el sistema simpático como el parasimpático participan en la inervación de la glándula lagrimal, la contribución de este último es más considerable. El sistema parasimpático regula la secreción mediante la estimulación de las células acinares (68, 69, 70, 71, 72, 73); mientras que el sistema simpático, que se sitúa principalmente alrededor de las arterias y arteriolas presentes en el espacio intersticial entre los acinis de la glándula (72), regula la secreción mediante dos mecanismos: por una parte, alterando el flujo sanguíneo mediante la vasodilatación o vasoconstricción de las arteriolas (74) y por otra parte, modificando directamente la secreción de proteínas, electrolitos y agua por las células acinares (75, 76, 77).

Las glándulas lagrimales accesorias contribuyen, al igual que la principal aunque en menor medida, a la secreción de electrolitos, agua y proteínas hacia la superficie ocular; sin embargo, conocemos muy poco sobre la regulación neural de estas glándulas que parece ser muy similar a la de la glándula principal (78).

Las *glándulas de Meibomio* son de secreción holocrina y producen el componente lipídico de la película lagrimal ^(2,3). Estos lípidos se sintetizan y se acumulan en las células acinares de las glándulas hasta que maduran; la ruptura de la célula libera el contenido hacia el lumen del sistema ductal. Existen fibras simpáticas y parasimpáticas entre los acini y vascularización de las glándulas ^(79,80,81), que responden a múltiples factores: hormonas sexuales, glucocorticoides, insulina... ^(82,83,84,85,86,87,88) etc. Las glándulas de Zeiss, de secreción sebácea, contribuyen junto a las de Meibomio a la secreción lipídica de la película lagrimal.

A.2 Propiedades y componentes de la lágrima:

En condiciones de apertura palpebral, la lágrima se distribuye en tres compartimentos: 1) el fórnix conjuntival, ocupando el espacio comprendido entre este y el área retrotarsal; 2) la película preocular, donde recubre la córnea y conjuntiva expuesta y mantiene aproximadamente 3µm de espesor ⁽⁸⁹⁾; y 3) el espacio prebulbar, donde reviste el contorno de la conjuntiva bulbar.

A.2.1 Menisco lagrimal:

Se llama así a la fracción de secreción lagrimal que descansa sobre el ángulo formado por el globo ocular y la aposición del margen palpebral inferior. Se constituye a merced de las propiedades de las fuerzas de tensión superficial que presenta este fluido. Su presión hidrostática negativa dentro del propio menisco explica la concavidad de su disposición e impide el drenaje continuo de la lágrima a través del punto lagrimal ^(90,91). Este efecto se incrementa conforme disminuye el volumen del menisco, quizás favoreciendo la conservación del mismo en el ojo seco lacrimodeficiente.

La estimación de la altura del menisco lagrimal mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) se ha correlacionado directamente con el flujo de secreción lagrimal ⁽⁹²⁾.

A.2.2 Volumen, secreción y evaporación lagrimal:

El volumen del menisco lagrimal es directamente proporcional al volumen lagrimal total ⁽⁹³⁾ y al flujo de secreción de la misma ⁽⁹⁴⁾, por lo que supone un valor diagnóstico en la enfermedad de ojo seco ^(93, 95).

El volumen de la película lagrimal se ha estimado en 7 μ l ⁽⁹⁶⁾, aproximadamente, y el flujo de secreción en 1.03 \pm 0,39 μ l /min, con un recambio lagrimal de 16,19 \pm 5.10% /min ⁽⁹⁷⁾.

Por otra parte, estudios con instrumentos no invasivos han determinado una tasa de evaporación lagrimal en torno a 0.4-0.5 $\times 10^{-7}$ g/cm²/s en unas condiciones de humedad ambiental entre 30-40% ^(98,99,100,101). La tasa de evaporación lagrimal se considera un indicador de la estabilidad de la capa lipídica lagrimal ^(102,103,104,105), puesto que cifras altas de evaporación se asocian a disminuciones en el espesor de la película lagrimal y al disconfort ocular ^(106,106,107). Sin embargo, hay teorías que explican la resistencia a la evaporación lagrimal mediante la presencia de un componente combinado de mucinas y proteínas junto a la organización lipídica ^(108, 109, 110, 111).

A.2.3 Componentes de la película lagrimal:

En la película lagrimal, clásicamente, se distinguen 3 fases: la capa lipídica, la capa acuosa y la mucinosa ^(2,3) (Figura 7).

La capa lipídica deriva de la grasa secretada por las glándulas de Meibomio localizadas en el margen palpebral. Cumple un papel fundamental en la estabilización de la película lagrimal y se considera la principal barrera física frente a la evaporación lagrimal ^(112, 113). Está integrada por lípidos

polares y no polares, así como por ácidos grasos de cadena larga. Se intercalan también glicoproteínas como lisozima y mucina que contribuyen a la estabilización de esta capa (^{114, 115, 116, 117}).

La capa acuosa y la mucinosa subyacente se sitúan en profundidad a la capa lipídica y se integran en un mismo nivel conocido como *mucoacuoso* (¹¹⁸). Este nivel presenta una consistencia de gel debido a la mucina secretada por las células caliciformes (¹¹⁹) y posee una función de lubricación y de mantenimiento de la humedad de la superficie ocular (^{120, 121}). En esta capa quedarán atrapadas células epiteliales muertas, células inflamatorias y microorganismos que posteriormente serán recogidos por la mucosa en el fondo de saco conjuntival para ser finalmente eliminados a través del punto lagrimal (^{122, 122, 123}).

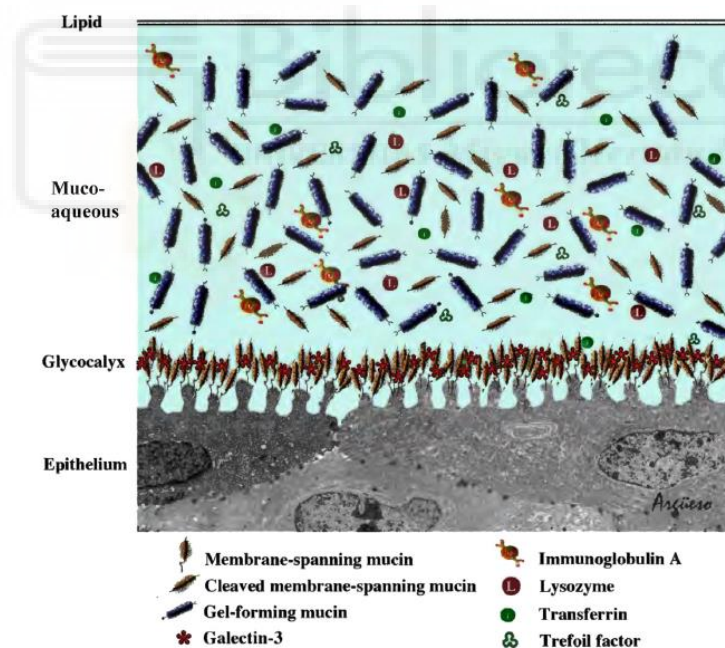


Figura 7. Componentes de la película lagrimal: capa lipídica, capa muco-acuosa y el glicocálix¹²⁹.

A.3 Homeostasis de la superficie ocular.

El mantenimiento de la integridad de las estructuras superficiales del ojo es llevado a cabo por la *unidad funcional lagrimal*, que está constituida por la superficie ocular, las glándulas secretoras lagrimales y el sistema neural que conecta ambas estructuras ⁽¹²⁴⁾ (Figura 8).

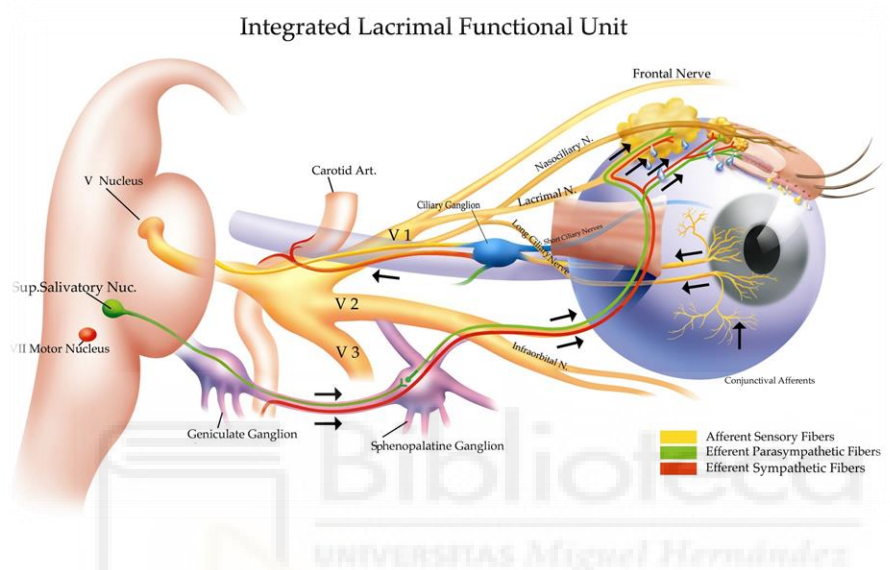


Figura 8. Unidad funcional lagrimal. Integrada por la superficie ocular, las glándulas secretoras lagrimales y la innervación de ambas estructuras ¹²⁵

El nervio trigémino suministra la innervación aferente a la córnea, conjuntiva y margen palpebral, mientras que las fibras nerviosas parasimpáticas que conforman la vía eferente generan una respuesta compensatoria activando las glándulas lagrimales, glándulas de meibomio y células caliciformes conjuntivales ^(2,3).

Profundizaremos en la contribución de los receptores sensoriales corneales al mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular.

En primer lugar, los termorreceptores de frío corneales, se activan por cambios muy sutiles de la temperatura corneal ^(6,23,33,34) y la osmolaridad lagrimal ^(6,33,35-38) que se producen entre los sucesivos parpadeos. Cuando se detecta un enfriamiento en la superficie ocular o se incrementa la osmolaridad

lagrimal, estos terminales restauran el equilibrio de la superficie ocular mediante el control reflejo del parpadeo y la producción lagrimal en condiciones basales ^(23,40) (Figura 9). Además, parecen ser los responsables de la sensación consciente de discomfort ocular ^(8,125). En este sentido, estudios realizados con mentol ⁽³⁵⁾, han puesto de manifiesto que una estimulación débil de los termorreceptores provoca una sensación de enfriamiento, mientras que una activación intensa origina una irritación ocular. Esta circunstancia podría ser explicada por el reclutamiento de las diferentes subpoblaciones de termorreceptores de frío; en el primer caso responderían los terminales HB-LT, mientras que en el segundo caso se activarían los LB-HT (ver apartado anterior) ^(23,35).

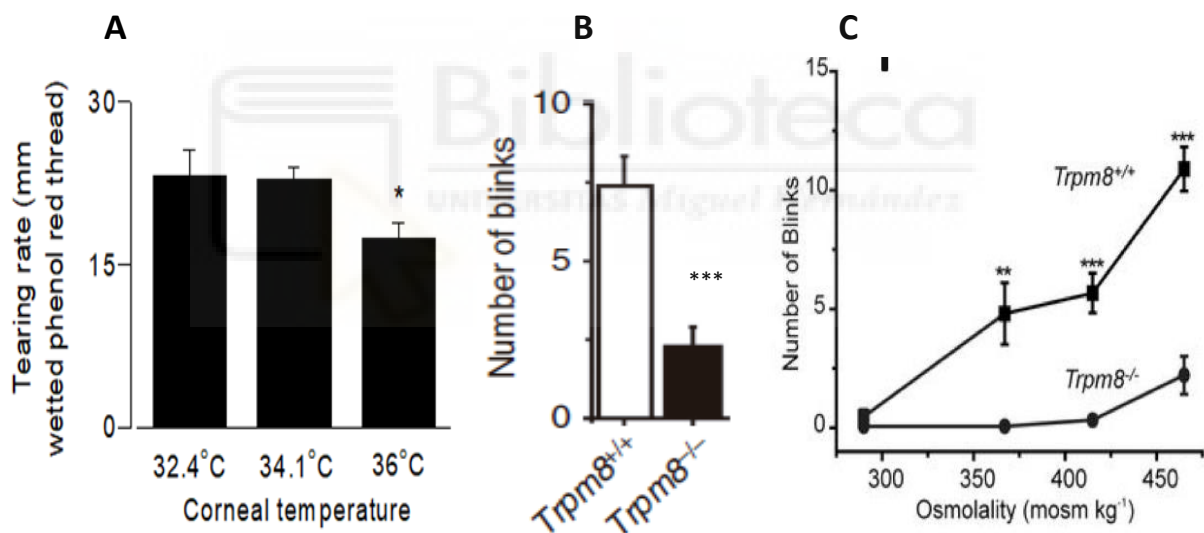


Figura 9. Los termorreceptores de frío corneales regulan el flujo de secreción lagrimal basal y el parpadeo ^{23,38}. A. Incremento de la secreción lagrimal al descenso de la temperatura en humanos. B. Incremento de la frecuencia de parpadeo en ratones al estimularse el canal de los termorreceptores de frío TRPM8 (t-student, $p < 0,001$). C. Aumento del parpadeo en los ratones TRPM8⁺ en respuesta al incremento de la osmolaridad lagrimal (Test de Tukey HSD, $p < 0,001$)

En la referencia a los mecano-nociceptores y polimodales, parece que contribuyen al incremento de la producción lagrimal respondiendo al estrés mecánico intenso provocado por la sequedad ocular (Figura 10). Así mismo, en el caso de los nociceptores polimodales también se activan por el

incremento de la osmolaridad propia de la EOS ^(23,68). La sensación de discomfort ocular en situaciones agudas con excesiva sequedad podría ser explicada por el reclutamiento de estas subpoblaciones de fibras nerviosas ⁽⁴⁰⁾.

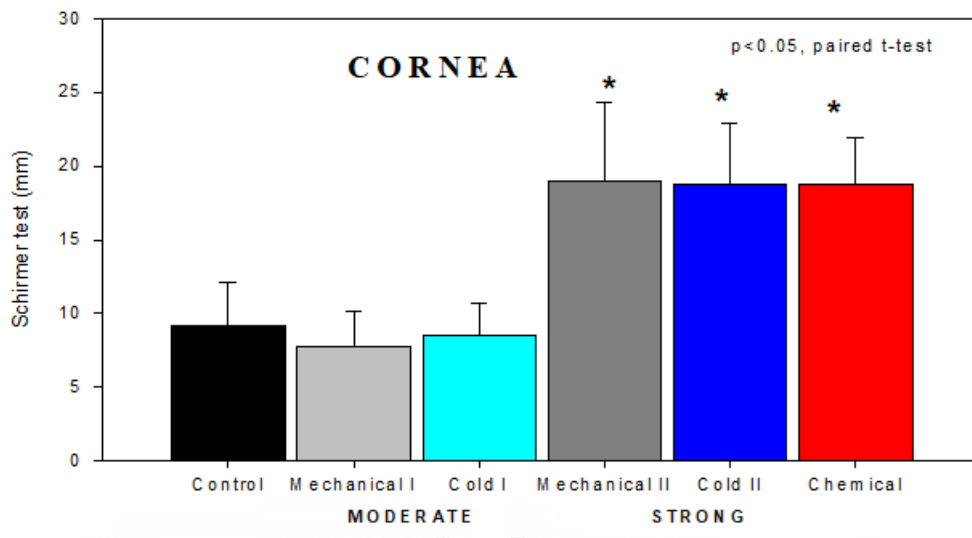


Figura 10. Incremento en el flujo de secreción lagrimal en respuesta a un estímulo intenso mecánico, químico y térmico de la superficie corneal ⁽¹²⁷⁾

Finalmente, el parpadeo juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis de la superficie ocular mediante la dispersión y distribución de la película lagrimal sobre la córnea ^(2,3). Además, contribuyen, por mediación de los termorreceptores, a la regulación de la temperatura corneal ^(23,38) mediante la activación de su canal TRPM8 ante un descenso de la temperatura o incremento en la osmolaridad ^(23,38) (Figura 9: B-C).

En el diagrama mostrado en la Figura 11, basada en los datos obtenidos por Aracil et al. (2016),¹²⁸ exponemos la hipótesis de la termorregulación corneal en ratones propuesta por nuestro laboratorio.

Las neuronas sensoriales corneales TRPM8+, que pueden ser activadas bien por un enfriamiento de la TSC, bien por un incremento en la osmolaridad, serían el principal estímulo aferente hacia el sistema nervioso

central. En los experimentos realizados en animales despiertos, el principal centro regulador recaería en los centros superiores cerebrales, todavía por determinar, y el principal activador de las estructuras eferentes (glándulas lagrimales, células caliciformes, músculo orbicular...etc.) sería el resultado de la integración de una gran variedad de estímulos.

En condiciones de anestesia general con isofluorano, el sistema funcionaría como un circuito autónomo. El bloqueo de los impulsos aferentes suprimiría todas las respuestas mediadas por centros superiores, de tal forma que el control de la temperatura de la superficie ocular recaería en los mecanismos locales termorreguladores (¹²⁶).

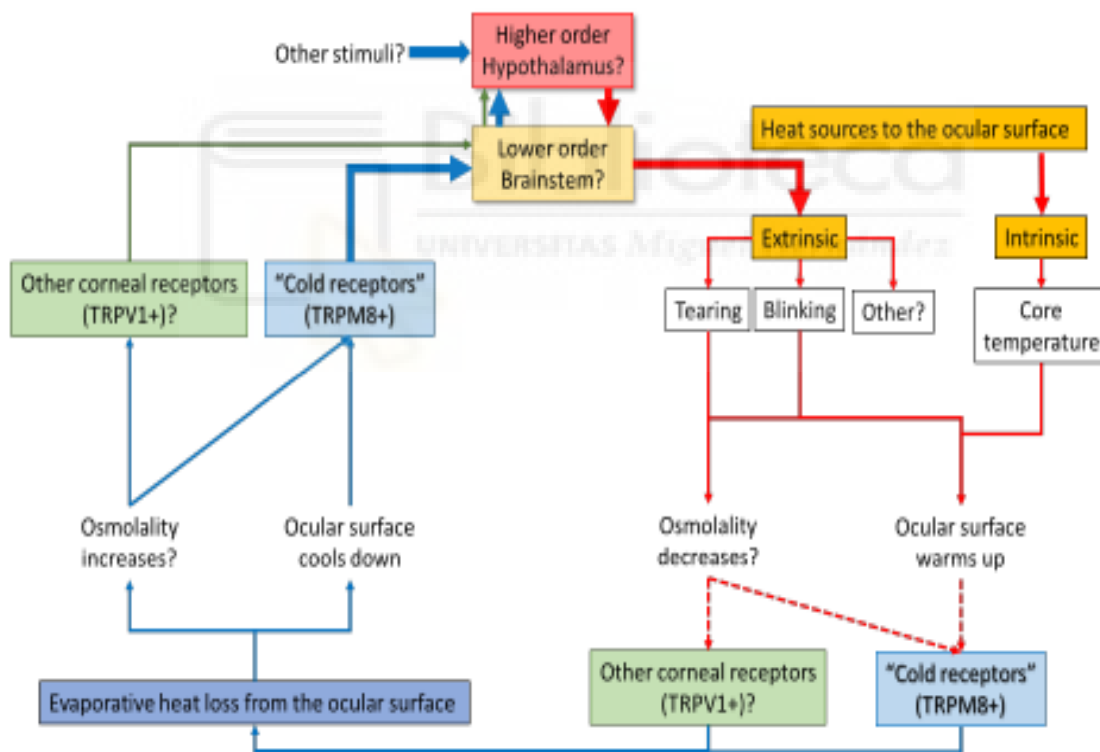


Figura 11. Hipótesis de la termorregulación corneal en ratones. Adaptada de Aracil et al., (2016).

B. ENFERMEDAD DE OJO SECO

La última actualización del DEWS Report define ojo seco como una “*enfermedad multifactorial de la superficie ocular, caracterizada por la pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y se acompaña de unos síntomas oculares en la que juegan un papel etiológico la inestabilidad de la película lagrimal, así como la hiperosmolaridad, la lesión e inflamación ocular y las alteraciones neurosensoriales*” (127).

Se trata de una enfermedad muy frecuente en nuestro entorno clínico, los estudios estiman su prevalencia en un 5-50% en EEUU (128) y en nuestro país en un 18,4% (1). Es más frecuente en mujeres que en hombres y en la raza asiática frente a la caucásica (130).

B.1 Clasificación y patogenia de la enfermedad de ojo seco.

El DEWS Report de 2007 (129) consideró la hiperosmolaridad y la inestabilidad lagrimal como los dos mecanismos cardinales que conducen a la EOS. Según esta circunstancia, se diferenciaban claramente dos subtipos de ojo seco, el *evaporativo*, resultado de una excesiva evaporación lagrimal en presencia de una glándula lagrimal íntegra, y el *acuodeficiente*, aquel que presentaba un déficit de producción lagrimal con una evaporación normal. Sin embargo, existen subtipos de enfermedad de ojo seco en los que confluyen ambos mecanismos, como es el síndrome de Sjögren (130,131,132), en el que el daño de la glándula lagrimal coexiste con una disfunción de las glándulas de Meibomio. Debido a esta y otras circunstancias, se elaboró una nueva clasificación basada en la presencia o no de sintomatología (Figura 12), sin descartar la subclasificación etiológica (129,133) (Tabla 1).

En esta nueva clasificación se incluye, por primera vez, la presencia de dolor neuropático condición secundaria a la afectación del sistema

somatosensorial que, sin embargo, no es causada por la patogenia propia de la enfermedad de ojo seco. El dolor neuropático relacionado con la enfermedad de ojo seco se considera en aquellas situaciones en las que no existe asociación entre síntomas y signos de la enfermedad y aquellos en los que persiste la sintomatología a pesar de una correcta adherencia al tratamiento (23,134, 135).

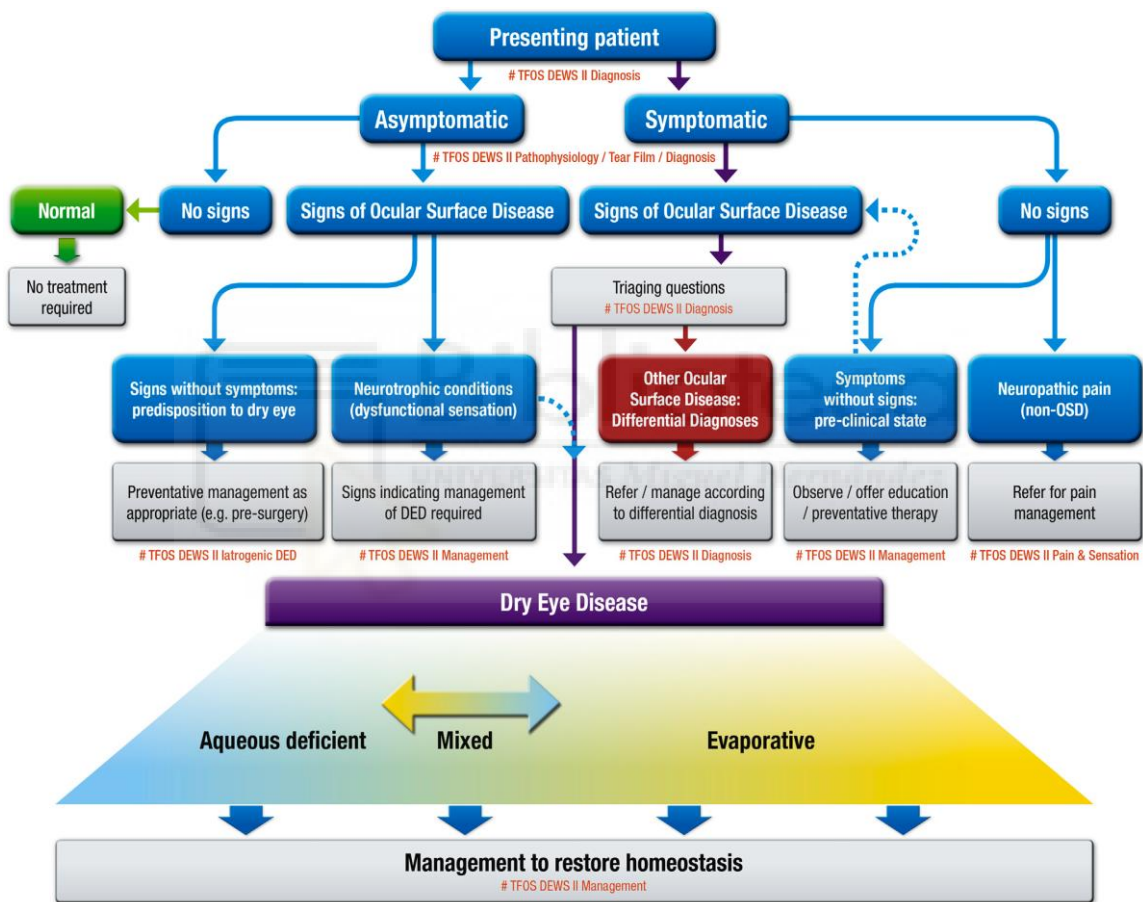


Figura 12. Clasificación actual de la enfermedad de ojo seco ¹²⁹.

Tabla 1. Clasificación etiológica de la enfermedad de ojo seco¹³⁵

ADDE		EDE	
SS 1ª			1ª
SS 2ª	Artritis Reumatoide, Poliarteritis nodosa, Lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, esclerosis sistémicas, cirrosis biliar primaria, enfermedades mixtas del tejido conectivo.		2ª: causa obstructiva cicatricial, no cicatricial: blefaritis anterior, inflamación de la superficie ocular, lentes de contacto. Enfermedades sistémicas: rosácea, dermatitis seborreica, dermatitis atópica, ictiosis, psoriasis.
No-SS	Deficiencia glándula lagrimal primaria, ablación glándula lagrimal, déficit congénito, síndrome triple A, ojo seco ADDE relacionado con la edad, otras enfermedades inflamatorias o infiltrativas de la glándula lagrimal: sarcoidosis, linfoma, infección vírica; lesión por radioterapia, conjuntivitis cicatricial, obstrucción de la glándula lagrimal, síndrome de Stevens-Johnson Síndrome, pénfigo cicatricial, tracoma, traumatismo químico, estados hiposecretores y fallo de la unidad funcional lagrimal por bloqueos de la reflejo aferente: anestesia tópica, lesión del nervio trigémino, cirugía refractiva, queratitis neurotrófica; bloqueo del sistema secreto-motor: daño del sistema parasimpático, inhibición farmacológica; combinación de lesión del sistema autónomo: disautonomía familiar. Otros desórdenes: síndrome de Meige, diabetes mellitus, pseudoexfoliación.	DGM	2ª Exposición química: 13-cis retinoico, bifenoles policlorados, antiandrógenos. Alteración genética: agenesia meibomiana, distriquiiasis, displasia ectodérmica anhidrótica, síndrome ectodactilia, epidermiolisis bullosa, ictiosis folicular, síndrome de Turner, alteraciones de la apertura, congruencia o dinámica palpebral, enfermedad de Parkinson
		EDE 2ª Enf. Superficie Ocular	Conjuntivitis alérgicas, deficiencia de vitamina A, TBUT acortado.
		Otros	enfermedades iatrogénicas

ADDE: Enfermedad de ojo seco aquo-deficiente; *EDE:* ojo seco evaporativo; *SS:* Síndrome de Sjögren; *DGM:* disfunción de las glándulas de meibomio. *TBUT:* tiempo ruptura de la película lagrimal.

En referencia a la patogenia de la EOS, se ha observado que la hiperosmolaridad lagrimal, tras un exceso de evaporación o tras una disminución en la producción lagrimal, desencadena la liberación de una cascada de moléculas proinflamatorias (proteasas, TNF_{α} , metaloproteinasa, etc.) que provocan la reducción del glicocálix de la superficie corneal y la apoptosis tanto de las células epiteliales como de las caliciformes secretoras de mucina^(135,136,137,138). Todo ello conduce a una inestabilidad de la película lagrimal, que inicialmente es contrarrestada mediante los mecanismos reflejos del lagrimeo y parpadeo. La perpetuación en el tiempo de este mecanismo ofensivo y la incapacidad de las respuestas compensatorias supondrían la aparición de la enfermedad cronicada de ojo seco ⁽¹³⁵⁾ (Figura 13).

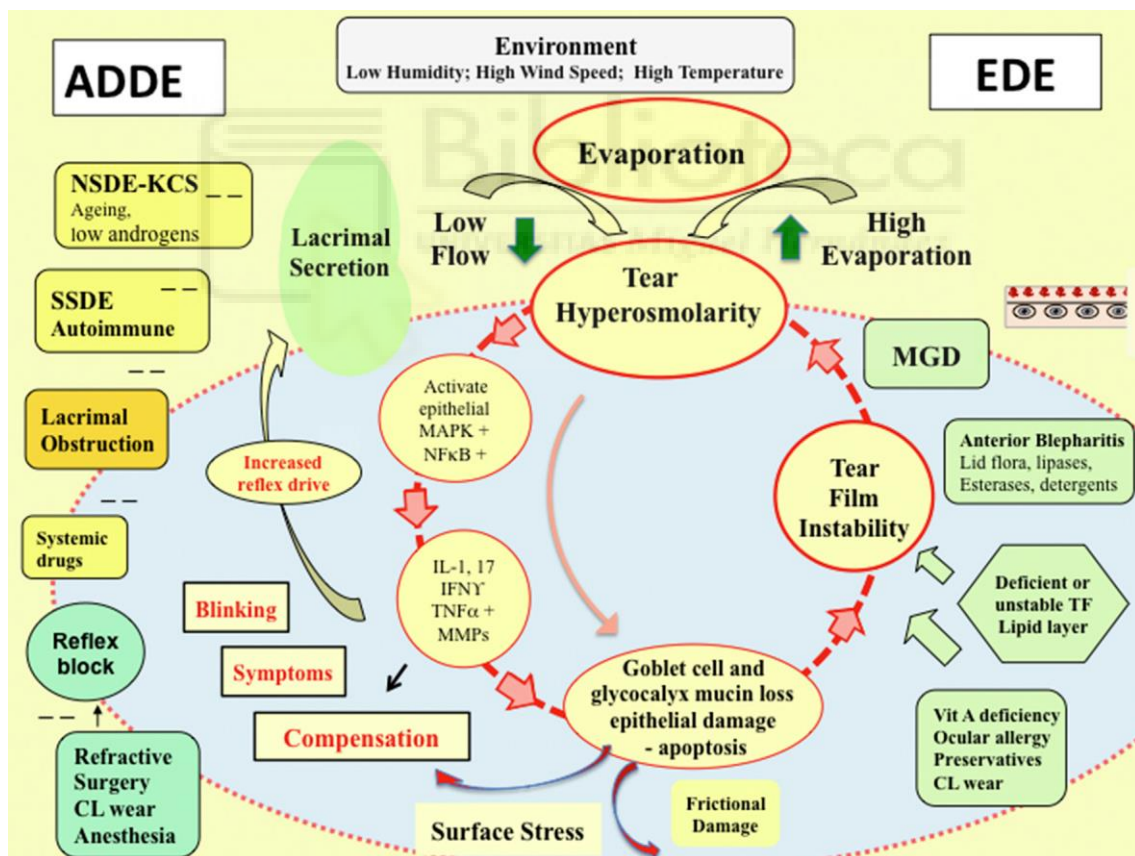


Figura 13. Esquema de la patogenia de la enfermedad de ojo seco ¹³⁵

B.2 Modificación de la actividad de los receptores sensoriales corneales en la enfermedad de ojo seco.

En virtud de los estudios electrofisiológicos realizados en animales podemos conocer el efecto que genera la deficiencia crónica de secreción lagrimal en los terminales sensoriales de la córnea (^{35,37}).

Los *termorreceptores de frío* en condiciones de enfermedad crónica de ojo seco responden con un incremento en su actividad basal, un aumento en la frecuencia del pico descarga ante el enfriamiento de la superficie corneal, un cambio en el umbral de respuesta a la temperatura hacia valores más calientes. En aquellas condiciones de enfermedad, se han detectado modificaciones funcionales sugestivas de lesión del terminal, basadas en un incremento en las corrientes de Na⁺ y disminución de las de K⁺ a través de los canales TRPM8, que implican una hiperexcitabilidad neuronal. Dicha hiperpolarización podría explicar, parcialmente, la sensación de discomfort propia de la EOS (Figura 14) (^{23,35}).

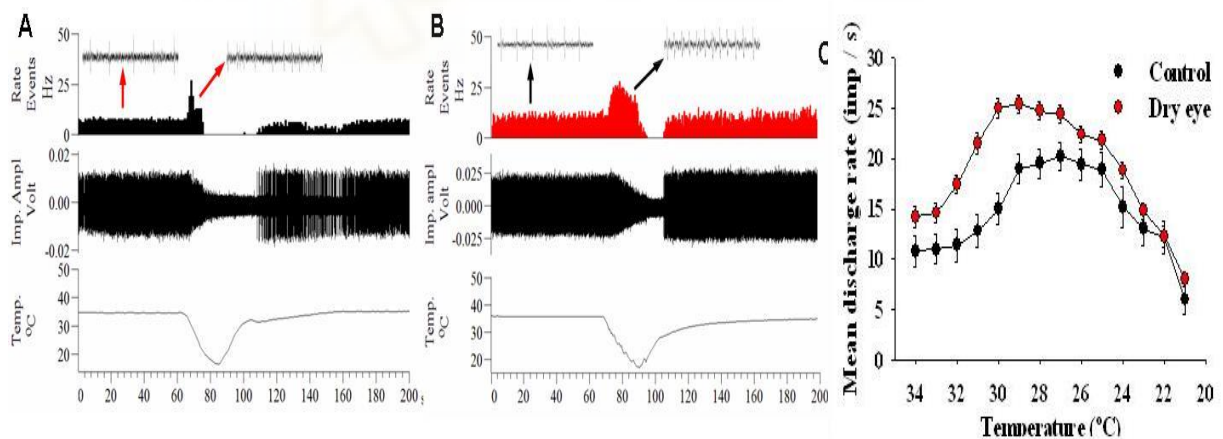


Figura 14. Respuesta de los termorreceptores de frío al enfriamiento de la superficie corneal en animales controles y con enfermedad de ojo seco (EOS). A. Registro de descarga de un termorreceptor de frío en un ratón sano y (B) en ratón con EOS tras extirpación de la glándula lagrimal a las 4 semanas. (C). Incremento de respuesta de los termorreceptores de frío ante un mismo valor de temperatura en cobayas con ojo seco (n=57) con respecto a los controles (n=45); ANOVA $p < 0,005$. (³⁵)

En los cobayas en los que se les ha extirpado la glándula lagrimal, se registra un incremento transitorio en la actividad espontánea de los *receptores polimodales y mecano-nociceptores* retornando a las 4 semanas de la cirugía lagrimal a valores similares a los iniciales ⁽³⁵⁾(Figura 15).

Mecano-nociceptores

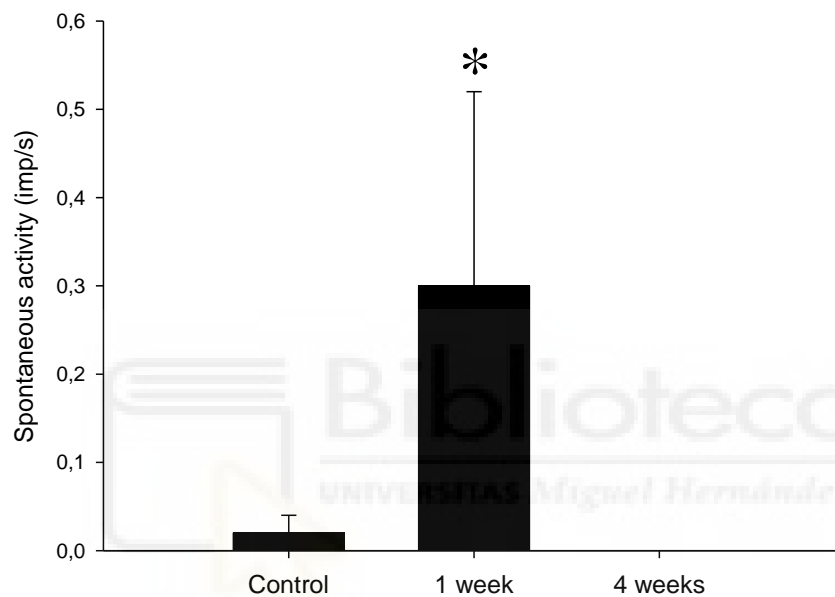


Figura 15. Respuesta de los mecano-nociceptores en cobayas controles y con EOS. En la primera semana tras la extirpación de la glándula lagrimal, se observa un incremento en la respuesta de estos receptores que, sin embargo, retorna a la normalidad a las 4 semana del procedimiento ³⁵.

La respuesta ante los estímulos mecánicos de los mecano-nociceptores no se modifica en condiciones de EOS. Sin embargo, en el caso de los polimodales, la estimulación química con ácido sobre la superficie corneal enferma, provoca un incremento en su respuesta con una moderada sensibilización posterior (Figura 16 A-B). Por otra parte, la hiperosmolaridad presente en la EOS provoca la activación de estos receptores polimodales (Figura 17).

Nociceptores Polimodales

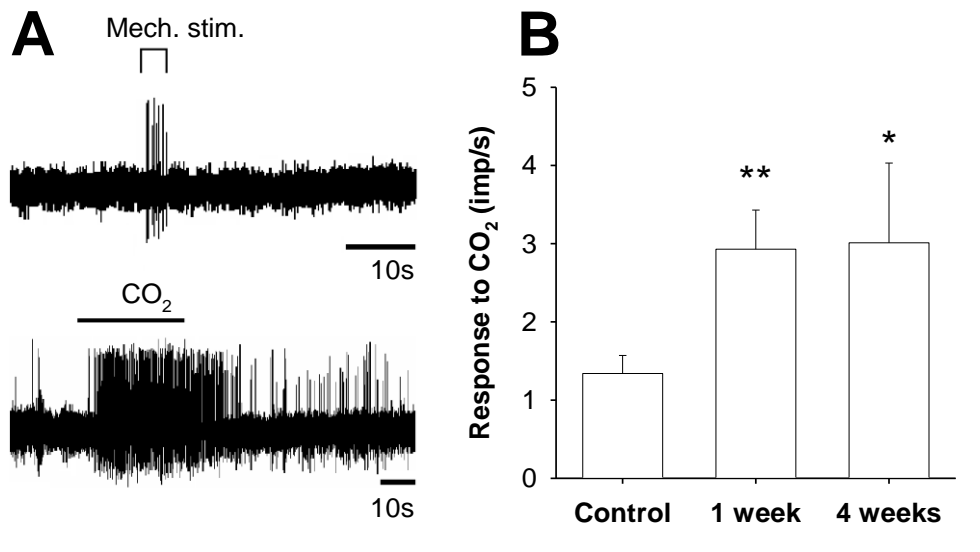


Figura 16. Respuesta de los receptores polimodales al estímulo químico con CO₂ sobre la superficie corneal. A. En cobayas con ojo seco los receptores responden de forma incrementada al estímulo químico, sin embargo, su respuesta es fisiológica al mecánico. B. Sensibilización al estímulo químico en cobayas con enfermedad de ojo seco a las 4 semanas de extirpación de la glándula lagrimal³⁵.

Nociceptores Polimodales

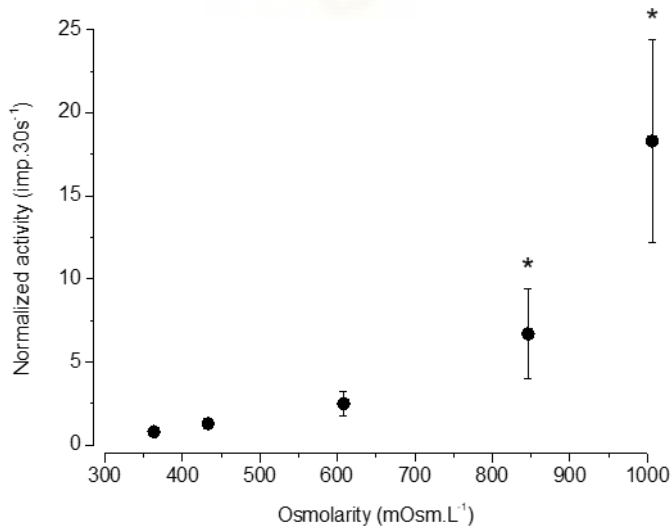


Figura 17. Respuesta de los receptores polimodales al incremento en la osmolaridad de la película lagrimal. En comparación con los termorreceptores de frío corneales, los polimodales se activan ante umbrales de osmolaridad mucho mayores, en torno a 600mOsm/L⁽³⁶⁾

B.3 Síndrome de Sjögren y enfermedad de ojo seco.

El síndrome de Sjögren es una enfermedad multisistémica, crónica y autoinmune que se caracteriza por una infiltración de células inflamatorias en las glándulas salivares y lagrimales, provocando una xeroftalmía y sequedad bucal ^(135,139). Puede asociarse a manifestaciones sistémicas secundarias al depósito de complejos autoinmunes e infiltración linfática (Tabla 2) ⁽¹⁴⁰⁾

Tabla 2. Manifestaciones del SS primario ¹⁵⁴

Epitelitis glandular exocrina

- Glándulas lagrimales y salivales
- Otras glándulas: páncreas.

Epitelitis parenquimatosa (extra glandular):

- Bronquial, hepática, renal-infiltración linfocítica peri-epitelial.

Afectación glándulas endocrinas:

- Tiroides, glándulas suprarrenales, ovarios

Enfermedades mediadas por inmunocomplejos:

- Vasculitis: afectación de pequeños vasos de la piel, nervios, y riñón.

Enfermedades linfoproliferativas:

- Linfoma de células B.
-

La prevalencia del SS primario en EEUU se estima en un 0,6% (0.19-1.39%) a pesar de que las cifras son muy variables por los diferentes criterios utilizados^(1,130). En España se está elaborando un estudio multicéntrico para determinar los datos de prevalencia de esta enfermedad, pero en la actualidad no se disponen de resultados concretos⁽¹⁴¹⁾. En cuanto a la incidencia, en EEUU se ha estimado en 3.9 casos por 100.000 habitantes al año, con una ratio 14 veces mayor en mujeres que en varones ^(130,142).

Tradicionalmente el SS se ha clasificado como primario o secundario a un proceso autoinmune sistémico como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o granulomatosis de Wegener (¹⁴³).

Desde el año 1965 hasta el 2002 se han publicado 11 clasificaciones o criterios diagnósticos de SS, sin existir un consenso internacional (¹⁴⁴). La clasificación propuesta por el grupo de consenso americano-europeo (AECG) es la que se utiliza de manera más extendida en el ámbito clínico¹⁴⁵ (Tabla 3).

Tabla 3. Criterios de clasificación de la AECG ¹⁴⁵

SÍNTOMAS OCULARES	<ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Ha padecido molestias de ojo seco de forma persistente y diaria durante más de 3 meses? 2. ¿Tiene sensación de arenilla recurrente en los ojos? 3. ¿Usa lágrimas artificiales más de 3 veces al día?
SIGNOS OCULARES	<ol style="list-style-type: none"> 1. T. Schirmer sin anestesia \leq 5mm en 5 min. 2. Tinción Rosa Bengala \geq 4mm en 5 min.
SÍNTOMAS BUCALES	<ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Ha sentido la boca seca durante más de 3 meses? 2. ¿Ha tenido, en la edad adulta, de forma recurrente o persistente inflamación de las glándulas salivares? 3. ¿Necesita frecuentemente beber para ayudar a masticar la comida seca?
HISTOPATOLOGÍA MUCOSA	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1. Focos linfocíticos >1 en biopsia de gl. lagrimales menores
GLÁNDULA SALIVAR	<ol style="list-style-type: none"> 1. Flujo salivar \leq 1.5ml en 15 min. 2. Sialografía de parótida: Sialectasias sin obstrucción 3. Escintigrafía parótida: retraso en la captación, excreción o concentración del marcador.
AUTOANTICUERPOS	<ol style="list-style-type: none"> 1. Positividad para SSA (ro) o para SSB (la)

Las causas del SS todavía hoy en día se desconocen en profundidad. Se sospecha que la respuesta del sistema inmune a determinados factores ambientales o infecciones virales en un individuo genéticamente susceptible

puede ser el desencadenante de la aparición de la enfermedad y que el sistema endocrino puede contribuir de alguna manera a ello ^(143,145).

Los síntomas derivados de la EOS producidos por el SS no difieren con respecto a los de un ojo seco no SS. No obstante, la aparición de estos síntomas sí suele acontecer de forma más prematura y afectar a pacientes más jóvenes en la población SS ⁽¹⁴⁰⁾. La prevalencia de estos síntomas en el contexto del SS es considerable, en un estudio internacional de 1208 pacientes con SS el 85% presentaban molestias oculares ⁽¹⁴⁶⁾.

Los signos clínicos que observamos son: 1) disminución en el flujo de secreción lagrimal, que se correlaciona con el grado de infiltración linfocitaria de la glándula lagrimal⁽¹⁴⁷⁾, 2) queratinización del epitelio conjuntival y pérdida de las células caliciformes secretoras de mucina; 3) afectación de las glándulas de Meibomio provocando mayor inestabilidad y evaporación de la película lagrimal y cuya su disfunción se encuentra en un 57,9% de los pacientes ⁽¹⁴⁸⁾ y 4) en los casos muy avanzados, la superficie ocular responde a la inflamación mediante una metaplasia escamosa, con pérdida del glicocálix y queratinización corneal ^(135,149,150,151).

Todos estos signos se derivan de la respuesta anómala del sistema inmunológico cuyo escenario está orquestado principalmente por los linfocitos T; la estirpe predominante de estas células permite categorizar a los pacientes y correlacionarlos con el grado de severidad de la enfermedad ^(135,152). De esta forma, Moutsopoulos ⁽¹⁵³⁾ sugiere que la activación de los linfocitos Th₁ es la más frecuente, mientras que la respuesta mediada por las citoquinas provenientes de los linfocitos Th₂ suele vincularse a los SS moderados. Además, la reactividad de los Th₁₇ se correlaciona con un mayor grado de severidad de la enfermedad que puede derivar, incluso, en la aparición de linfoma, siendo de alto riesgo aquellos casos que presenten centros germinales de células inmunológicas ^(154, 155). Por otra parte, la

hiperactividad de las células B es un elemento primordial en el proceso de pérdida de la tolerancia inmunológica, la cual se manifiesta mediante una hipergammaglobulinemia, crioglobulinemia y la producción de múltiples autoanticuerpos ⁽¹⁴⁸⁾. La contribución de otras células como las epiteliales acinares y ductales de las glándulas lagrimales se suman a esta respuesta permutando su función y actuando como células presentadoras de antígenos interviniendo, de este modo, en el reclutamiento y activación de casi todos los tipos de células inmunológicas ^(135,156).

C. TERMOGRAFÍA CORNEAL

C.1 Primeras referencias en la medida de la temperatura e historia de la termografía.

La temperatura corporal, y en concreto el calor, ha sido una de las variables clínicas más observadas para el cuidado del ser humano desde tiempos inmemorables. Hacia el año 400 aC, el célebre médico griego Hipócrates escribió que la pérdida de calor o frío en cualquier parte del cuerpo indicaba que la enfermedad estaba presente y debía ser buscada. Los egipcios y los griegos usaban para ello sus manos, técnica que persistió hasta los siglos XVI y XVII ⁽¹⁵⁷⁾.



Fue en el año 1592 cuando se le atribuye al científico italiano Galileo Galilei el primer termoscopio ⁽¹⁵⁸⁾ (Figura 18). Con este instrumento sólo podían obtenerse datos cualitativos, ya que inicialmente carecía de una escala de referencia que permitiese cuantificar las variaciones de temperatura.

Figura 18. Termoscopio de Galileo

A continuación, en 1612, su médico y amigo Santorio Santorio añadió una graduación numérica al dispositivo y le dio un uso medicinal ¹⁶⁰.

Posteriormente, Gabriel Fahrenheit⁽¹⁵⁹⁾, en el año 1714, creó el primer termómetro a base de mercurio, con una escala de 180 grados entre los puntos de congelación (32°F) y de ebullición (212°F) del agua.

Pocos años después, Anders Celsius propondría su escala que establecía esta diferencia entre 0 y 100 grados, sin embargo, consideró que el punto de ebullición sería a los 0° y descongela a los 100°. No fue hasta el 1750 cuando el biólogo danés Linnaeus propuso la inversión de la escala tal y como la conocemos hoy en día ⁽¹⁶⁰⁾. En 1868 el Dr Carl Wunderlich desarrolló el termómetro clínico que ha sido universalmente utilizado en medicina durante 130 años ⁽¹⁶⁵⁾.

Todos aquellos instrumentos medían el calor mediante el contacto corporal, sin embargo, la búsqueda de un dispositivo que permitiera medir la temperatura mediante un sensor remoto, ha sido uno de los avances más importantes en este ámbito en los últimos 60 años.

Dado que el calor puede ser transferido mediante 3 mecanismos: conducción, convección y radiación, es precisamente la medida de este último con el que se ha logrado un mayor desarrollo tecnológico. En 1934 Hardy ⁽¹⁶¹⁾ inventó el primer detector de infrarrojos para la medida de la temperatura corporal. Sin embargo, los avances más relevantes tuvieron lugar en el contexto del desarrollo armamentístico de los años posteriores en los que aparecieron instrumentos, valiéndose de la tecnología infrarroja, que permitían la visión nocturna, desarrollo de misiles localizadores de calor, etc. Entre los años 50 y 60, las investigaciones científicas comenzaron a adaptar esos prototipos militares para uso clínico en neurología, cirugía, oncología y dermatología ⁽¹⁶²⁾. Posteriormente, en los años 90, gracias a exploraciones

realizadas en el espacio y observaciones en el campo de la astronomía, se facilitó el desarrollo de sistemas muy cualificados de detección de rayos infrarrojos tal y como los conocemos hoy en día.

Los primeros datos de medida de la **temperatura ocular** fueron reportados en el año 1875 por Dohnberg ⁽¹⁶³⁾, quien utilizaba un termómetro de mercurio adaptado para colocarlo en el fondo de saco conjuntival, observando un incremento en la temperatura ante inflamaciones agudas del segmento anterior. Posteriormente, se sucedieron numerosas aportaciones hasta que en los años 60 Mapstone ^(164,165,166,167,168,169,170) condujo una serie de experimentos termográficos usando un bolómetro, dispositivo que se colocaba a 0,5cm del ojo y recogía la radiación emitida por el ojo. Ello le supuso la consideración de pionero en el ámbito de la termografía corneal (Figura 19).

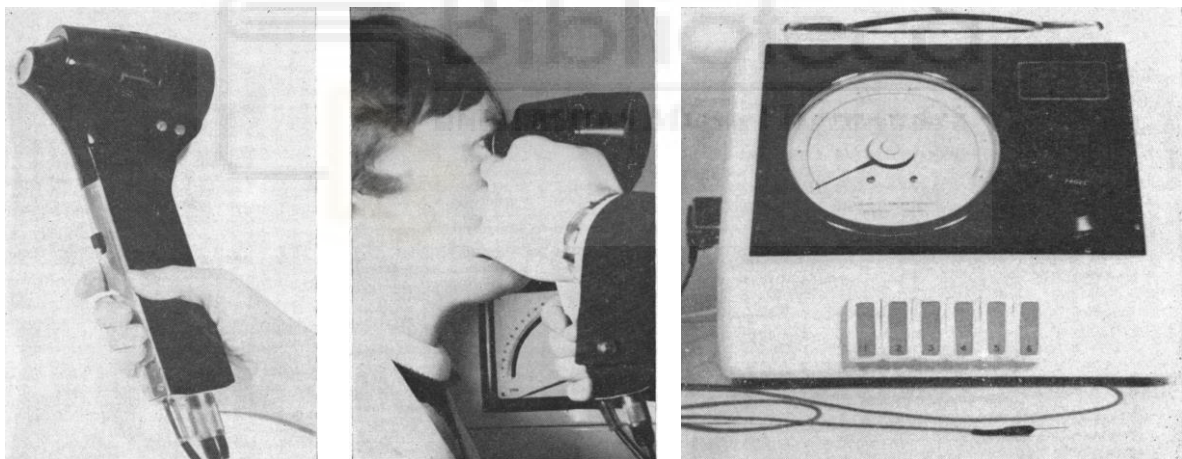


Figura 19. Bolómetro de Mapstone.

En los últimos 40 años se han desarrollado nuevos instrumentos que aportan, además de una mayor resolución, ventajas de portabilidad, menores costes y mayor rapidez en el procesamiento de las imágenes.

C.2 Perfil termográfico de la superficie ocular.

El registro termográfico del centro de la córnea ha sido objeto de estudio por numerosos autores. Los trabajos más consistentes indican rangos de temperatura entre los 32,9 y 36 °C^(171,172,173,174), siendo la temperatura en el limbo corneal entre 0.45 y 1°C mayor que en el centro; así mismo, la temperatura registrada en el canto nasal (limbar y conjuntival) es superior respecto al área localizada en temporal ⁽¹⁶⁵⁾.

Por otra parte, la TSC viene determinada por numerosos factores: temperatura corporal, temperatura ambiental, grado de vascularización perilimbar, integridad de la superficie y de la película lagrimal, parpadeo y edad.

Numerosos estudios señalan una variación circadiana de la temperatura corneal con un incremento durante el día y descenso nocturno que podría estar en relación con la misma variación de la temperatura corporal a lo largo del día ^(175,176,177,178). En este sentido, un estudio sugiere que incrementos en la temperatura corporal de 0,4°C supone un ascenso en la corneal de 2°C, sin embargo, también apunta la presencia de un límite de temperatura corneal en 36,5-37°C a pesar de continuos incrementos en la temperatura corporal ⁽¹⁷⁹⁾.

Por otra parte, la temperatura ambiental también modifica el registro corneal, de tal forma que para generar un incremento de temperatura corneal de 3°C se debe aumentar 20°C en la temperatura ambiental ⁽¹⁸²⁾. La edad se ha correlacionado inversamente con la temperatura de la superficie ocular en numerosos estudios ^(180,181,182,183) estableciendo una tasa de descenso en torno a 0,020°C por año de vida ⁽¹⁷⁶⁾. Finalmente, las modificaciones en la temperatura de la superficie ocular secundarias al parpadeo fueron documentadas por primera vez por Mapstone ⁽¹⁶⁹⁾ quien observó un

incremento de temperatura corneal de 1,5°C tras 5 minutos de oclusión palpebral.

En el presente trabajo estudiaremos el comportamiento indirecto de los termorreceptores de frío corneales y la contribución de los receptores polimodales en la EOS mediante la posible existencia de diferencias en la temperatura de la superficie corneal entre pacientes con SS y controles, en el primer caso, y la activación de secreción refleja lagrimal tras estimulación con CO₂, en el segundo.



II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es estudiar en seres humanos la contribución de los termorreceptores de frío y de los nociceptores polimodales de la superficie ocular a la patogenia de la enfermedad de ojo seco, valorando su estado funcional mediante el uso de técnicas indirectas. Para ello lo hemos subdividido en dos objetivos generales:

1. Determinar la posible existencia de diferencias en la temperatura de la superficie corneal (TSC) entre pacientes con SS y controles, así como su correlación con signos y síntomas presentes en los sujetos.
2. Establecer si el estímulo químico de CO₂ sobre los nociceptores polimodales de la superficie ocular desencadena un incremento en la secreción lagrimal y supondría, por tanto, una herramienta en el diagnóstico de la EOS.

Para poder llevar a cabo estos objetivos, previamente fue necesario establecer el método adecuado en las siguientes medidas:

1. Determinación de la TSC durante un intervalo inter-parpadeos mediante cámara termográfica de rayos infrarrojos.
2. Cuantificación de las variables termográficas: temperatura máxima, temperatura media, temperatura mínima, variación de TSC por segundo durante un intervalo inter-parpadeos, tiempo medio de oclusión palpebral, incremento de TSC tras un parpadeo, pendiente de caída inicial, pendiente final y pendiente total durante un intervalo inter-parpadeos.
3. Cálculo del flujo de secreción lagrimal basal y estimulada con CO₂ sobre la superficie corneal en individuos sanos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

A. POBLACIÓN

El estudio se ha llevado a cabo en un total de 104 sujetos adultos, divididos en dos grupos:

1. *Grupo de ensayo preliminar*, destinado a estudiar experimentalmente el equipo de estimulación de la superficie corneal, formado por 23 voluntarios sanos y asintomáticos, pertenecientes al Instituto de Neurociencias y de edades comprendidas entre los 20 y 30 años.

2. *Grupo de pacientes oftalmológicos*, pertenecientes al hospital Marina Baixa de Alicante con edad comprendida entre los 20 y 69 años y divididos en 3 grupos pareados en edad y sexo:

- Grupo 1: pacientes diagnosticados por el servicio de reumatología del Hospital Marina Baixa de SS primario o secundario según los criterios de la AECG (2012)¹⁴⁵ establecidos para la identificación del mismo (*ver introducción*).
- Grupo 2: sujetos sin ninguna sintomatología de EOS, con un T. Schirmer > 8 mm en 3 minutos, TBUT >7s y 0 grados de queratitis punctata superficial (QPS) bajo el exámen en lámpara de hendidura.
- Grupo 3: pacientes que presentaban un test de schirmer < 10mm en 3 minutos, así como un TBUT < 7 segundos y, sin embargo, sin sintomatología de EOS. Dicha cohorte sólo se incluyó para el cálculo de las tasas de secreción lagrimal.

El trabajo fue diseñado como un estudio prospectivo y transversal, aprobado tanto por el comité de ética de la Universidad Miguel Hernández, con código de aceptación IN-JGa-002-11, como por el comité de la comisión de investigación del Hospital Marina Baixa (anexo1), con el patrocinio del

Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2014-54518-C3-1-R, Mineco-FEDER). Se calculó un tamaño muestral de 55 sujetos para un nivel de confianza del 95%, ajustando las pérdidas.

El estudio se desarrolló tanto en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández como en el Hospital Marina Baixa de Alicante. Todo el protocolo de experimentación fue ejecutado siguiendo las normas definidas en la Declaración de Helsinki.

Los criterios de exclusión para ambos grupos fueron: pacientes usuarios de lentes de contacto, cirugías oftalmológicas previas, embarazo, obstrucción de glándulas de Meibomio, u otras enfermedades locales que pudieran causar EOS.

B. PARAMETROS DE VALORACIÓN DE LA HUMEDAD EN LA SUPERFICIE OCULAR

En el presente trabajo se estudiaron las variables clínicas que utilizamos frecuentemente en la práctica clínica diaria para identificar la presencia de EOS.

B.1 Secreción lagrimal: Test de Schirmer.

B.1.1 Test de Shirmer basal:

El test de schirmer consiste en una tira de papel absorbente milimetrado (papel whatman 41, 35x5mm de Haag-streit®) que se inserta en el tercio externo palpebral inferior durante un tiempo determinado, tras el cual, se cuantifican los mm de longitud de la tira humedecidos por la lágrima.

El procedimiento consistió en instilar 3µL de lidocaína al 2% con una micropipeta sobre la lengüeta de la tira de medida (que va aposicionada sobre

la conjuntiva bulbar) midiéndose, de ésta forma, el flujo de secreción lagrimal basal durante 3 minutos.

B.2 Tiempo de ruptura de la película lagrimal (TBUT)

Esta prueba se realizó empleando tiras de fluoresceína (Haag-streit®) con la que se impregna la conjuntiva bulbar inferior; tras varios parpadeos, observando a superficie ocular iluminada con luz de cobalto se medía el tiempo, en segundos, que tardaba la película lagrimal, inicialmente homogénea en quebrarse, lo que sirve como índice de la estabilidad de la película lagrimal.

B.3 Grado de afectación de la superficie ocular:

Tras la aplicación de tiras fluoresceína previamente descritas, se valoraba la integridad de la superficie ocular observada con la lámpara de hendidura bajo la luz de cobalto, cuantificando la aparición de epiteliopatía superficial corneconjuntival, según la escala Oxford (Figura 21).

NOTA

La sección B.1.2 está protegida mediante acuerdo de confidencialidad por la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández el 16 de Enero de 2019.






Staining appearance	Grade	Verbal descriptor
	0	Absent
	I	Minimal
	II	Mild
	III	Moderate
	IV	Marked
> IV	V	Severe

Figura 20. Escala de gradación del daño de la superficie corneoescleral según el esquema Oxford.

B.4 Determinación de la altura del menisco lagrimal mediante tomografía de coherencia óptica (OCT):

Mediante esta técnica se mide el volumen de lágrima dispuesta en el ángulo formado por el globo ocular y la aposición del margen del párpado, aproximadamente en el tercio central del mismo.

B.4.1 Instrumento de medida:

La medida se llevó a cabo con un tomógrafo de coherencia óptica 3D-OCT 2000, Topcon (Figura 22); la distancia de trabajo fué de 63,7mm.



Figura 21. Tomógrafo de coherencia óptica 3D-OCT2000 Topcon

B.5.2 Procedimiento de medida:

En cada ojo se determinaba automáticamente mediante la opción “*measure*”, la altura del menisco lagrimal resultante del triángulo que conformaba la córnea con el párpado y su bisectriz; dicha medida se obtenía en ambos ojos, tomándose como valor final la media de las dos cifras anteriores.

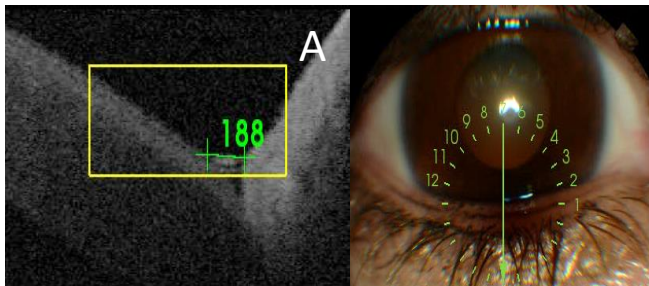


Figura 22. **Determinación de la altura del menisco lagrimal mediante OCT.** A. Medida de la altura del menisco lagrimal formado por la bisectriz entre la córnea (superior) y margen palpebral (inferior). B. Imagen fotográfica de la medida de corte transversal para la determinación del menisco lagrimal.

B.5 Cuestionario de Mcmonnies:

Este cuestionario de sintomatología de EOS consta de 14 preguntas que exploran la frecuencia de aparición de una serie de síntomas de esta enfermedad, además de considerar la presencia de patología sistémica que pudiera influir en dicha sintomatología (ver Anexo 2).

C. TERMOGRAFIA DE LA SUPERFICIE CORNEAL

C.1 Instrumento de medida:

La TSC fue registrada mediante imágenes de vídeo tomadas con una cámara termográfica de rayos infrarrojos (InfRec R300SR, Nippon Avionics Co. Ltd., Tokyo, Japan) (Figura 24). Este dispositivo es capaz de obtener hasta 60 imágenes por segundo, con una emisividad programada (proporción de radiación térmica debida a la temperatura de la superficie) de 0.96 y un

amplio rango de temperatura desde los -20°C hasta los 60°C . Se utilizó un zoom digital de 1x6 y la resolución de la grabación fue de 320x240 píxeles.



Figura 23. Cámara termográfica de rayos infrarrojos InfRec R300SR, Nippon Avionics Co. Ltd., Tokyo, Japan.

C.2 Protocolo de medida:

La cámara se situaba a 50cm del ojo a estudiar; el paciente se colocaba en la lámpara de hendidura, con la cabeza inmovilizada mediante mentonera y reposo frontal (Figura 25). Previamente al análisis, se instruía al sujeto sobre el procedimiento a seguir, indicándole que debía parpadear normalmente y a una señal, abrir los ojos, manteniéndolos de modo forzado durante 10 segundos mirando a un punto fijo, tras los cuales se realizaba la oclusión palpebral. Estos 10 segundos de apertura palpebral definen el intervalo inter-parpadeos que será objeto de análisis. Esta maniobra era repetida 3 veces, de manera sucesiva obteniendo así 3 intervalos inter-parpadeos en cada sujeto.

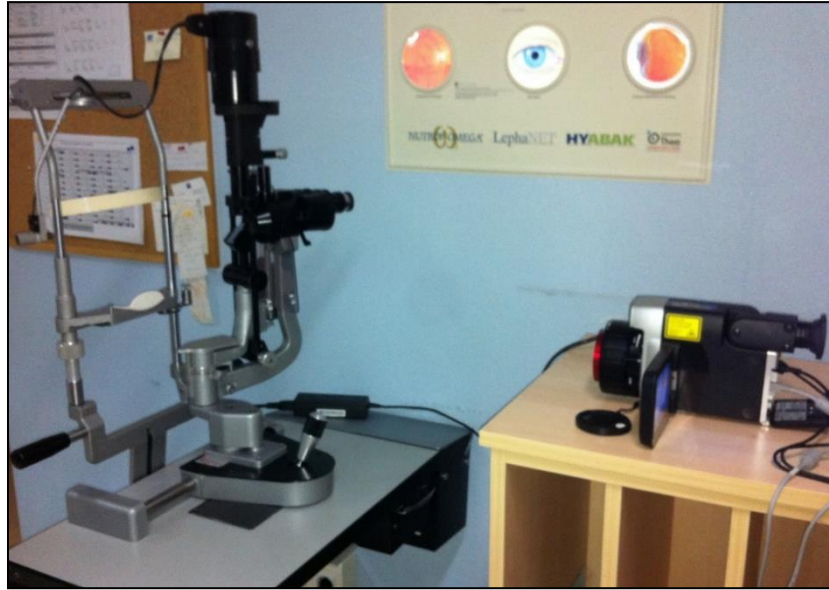


Figura 24. Ubicación de la cámara termográfica con respecto a la situación del paciente.

C.3 Procedimiento de análisis y variables termográficas:

Los datos termográficos fueron analizados con el programa informático específico proporcionado por la cámara termográfica (InfRec Analyzer NS9500 Standard, Nippon Avionics Co. Ltd.). Posteriormente eran exportados al programa excel, para ser analizados finalmente con el programa estadístico Sigmaplot.

En cada paciente se registraba la trayectoria de la curva de la TSC en un punto del centro de la córnea (figura 26) que dibujaba, generalmente, 3 picos, correspondientes a cada parpadeo (figura 27). Entre cada uno de aquellos picos de temperatura se definía un intervalo inter-parpadeos en el que descendía dicha temperatura. En los 30 segundos que duraba cada procedimiento se registraba un total de 1822 valores de temperatura.



Figura 25. Imagen termográfica del globo ocular en el que se registra la temperatura del centro de la córnea (punto a).

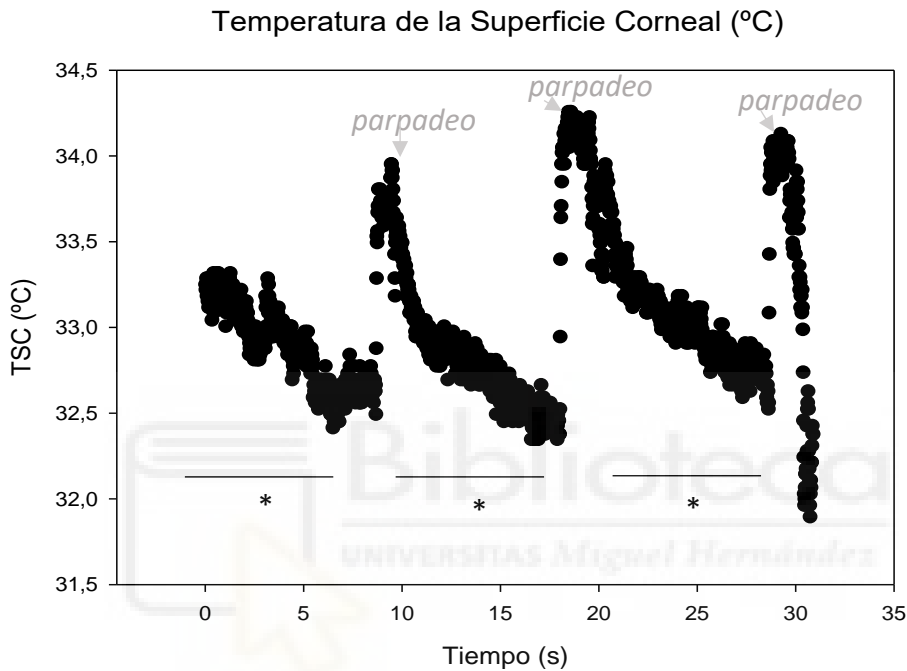


Figura 26. . Temperatura de la superficie corneal en 3 secuencias de parpadeos. Cada intervalo inter-parpadeos corresponde a 10segundos (*).

En la trayectoria de la curva de valores de la TSC registrada en el centro de la córnea determinamos:

C.3.1 Temperatura máxima (T_{Max}): temperatura inmediata tras la apertura del ojo, tras un parpadeo que es registrada en el pico de la curvatura, despreciando los valores iniciales (0,10-0,15s) por considerarlos todavía correspondientes a valores de la temperatura palpebral (Figura 28).

C.3.2. Temperatura mínima (T_{min}): temperatura previa al siguiente parpadeo que es registrada al final de la caída de la TSC y justo previa al siguiente pico correspondiente al parpadeo (Figura 28).

C.3.3 *Temperatura media (T_m)*: media aritmética entre la temperatura máxima y la temperatura mínima.

C. 3.4 *Variación media de la temperatura de la superficie corneal por segundo*. Media de la diferencia entre la T_{max} y T_{min} por segundo (Figura 28).

C. 3.5 *Incremento de TSC durante un parpadeo por segundo*: Diferencia entre la T_{min} y la sucesiva T_{max} de la superficie corneal por segundo (Figura 28).

C.3.6 *Tiempo medio de oclusión palpebral*: tiempo comprendido entre la T_{min} y la T_{max} .

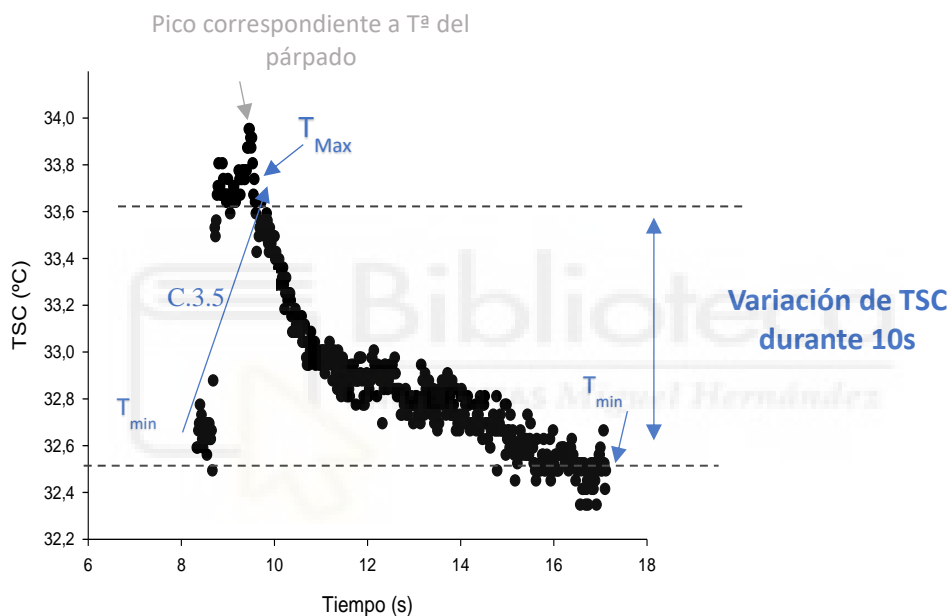


Figura 27. Curvatura de la temperatura de la superficie corneal (TSC) durante un periodo inter-parpadeo. TMax Temperatura máxima corneal; Tmin Temperatura mínima de la superficie ocular; C3.5 Incremento de TSC durante un parpadeo por segundo.

C.3.7 *Pendiente de caída de TSC durante un intervalo inter-parpadeos (M)*:

C.3.7.1 *Pendiente 1 (M_1)*: caída inicial tras el primer parpadeo. Se registraba a partir del valor de T_{Max} hasta el punto de inflexión de la curva, entre 1.5 y 2 s tras la apertura.

C.3.7.2 *Pendiente 2 (M_2)*: caída de la TSC registrada a partir de los 2 s desde la apertura palpebral dentro de un intervalo inter-parpadeos, en el que se alcanza la temperatura mínima.

C.3.7.3 Pendiente total (M_T): resultado de la regresión lineal de la variación de temperatura en el intervalo inter-parpadeos.

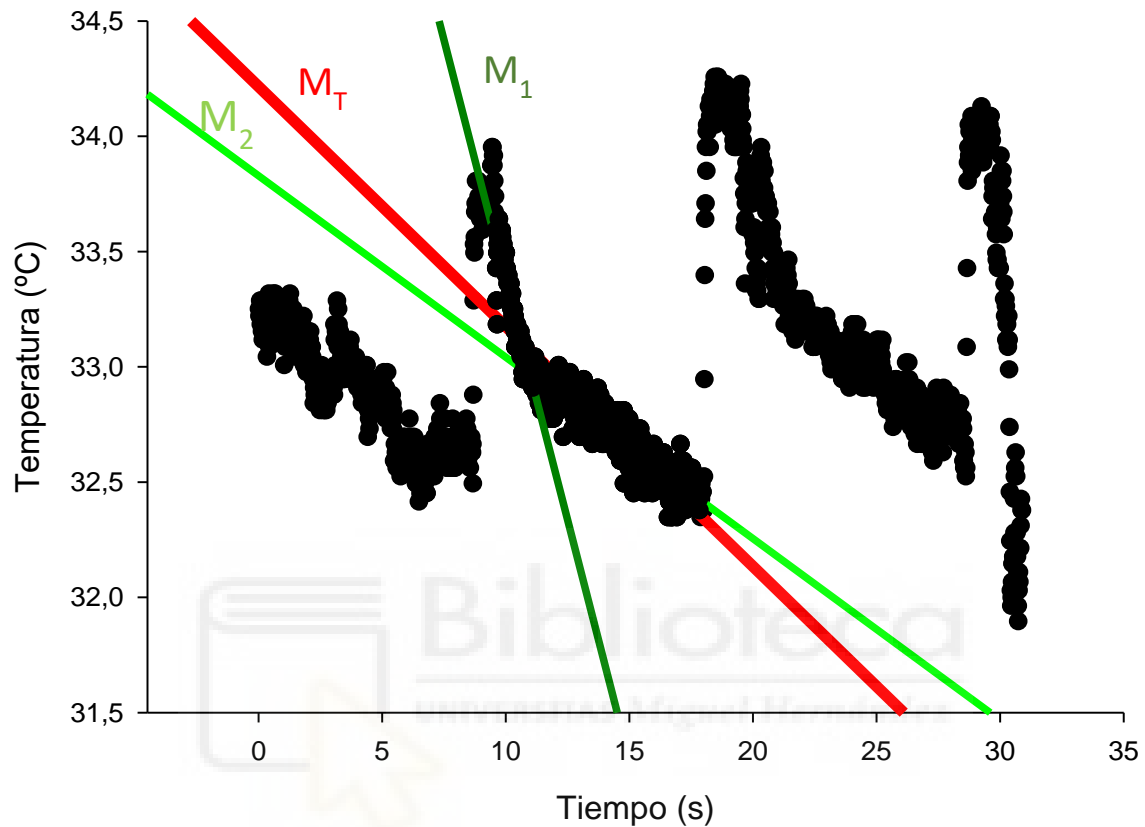


Figura 28. Pendiente de caída de la TSC entre parpadeos. M_1 pendiente de caída de la TSC inicial; M_2 pendiente de caída posterior, en la que se observa un descenso más lento; M_T , suma de las dos pendientes anteriores.

NOTA

Las secciones D (D.1, D.2, D.3) y E (Protocolo) están protegidas mediante acuerdo de confidencialidad, según a la decisión de la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández fechado el 16 de Enero de 2019.

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron procesados por el programa estadístico Sigmaplot (v11; Systat Software, London, UK). Los datos se expresaron como media \pm SE.

Para la comparación de las muestras paramétricas (temperatura ambiental, temperatura máxima, media y mínima de la superficie ocular, tiempo medio de oclusión palpebral y edad) se utilizó la t-student; para el resto de variables no paramétricas (parámetros clínicos, el resto de los datos termográficos, sexo, humedad ambiental y EVA del CO₂ sobre la superficie corneal) se utilizó la U de Mann Whitney.

Se empleó la prueba de correlación de Pearson para medir la posible relación lineal entre los parámetros clínicos y termográficos. Por último, en la comparación de tres o más muestras (valores de secreción lagrimal) se aplicó One Way ANOVA con el método de comparación múltiple post hoc de Dunn.

En todos los análisis se consideró estadísticamente significativo una $p \leq 0,050$; realizándose todos los cálculos con una $n=60$ (SS=30; controles = 30), excepto en los análisis de las tasas de secreción lagrimal, en los que se tuvo en cuenta también la muestra de población de ojo seco subclínico ($n=13$).

IV. RESULTADOS

A. DATOS DEMOGRÁFICOS

Se incluyó en el estudio un total de 104 sujetos, 23 de ellos reclutados únicamente para el estudio preliminar de la validación del método de estimulación irritativa corneal. El grupo final de pacientes oftalmológicos incluyó a 60 individuos: 30 correspondientes al grupo SS y 30 individuos control, homogéneos en edad y sexo y con un predominio de mujeres en ambas muestras (tabla 4). Trece pacientes correspondientes a la población de ojo seco subclínico se emplearon únicamente para el estudio de los flujos de secreción lagrimal. Ocho pacientes fueron excluidos: 2 por enfermedad de rosácea, 1 paciente por antecedente de parálisis VII par craneal y 5 por obstrucción severa de las glándulas de meibomio.

	CONTROL (n=30)	SS (n=30)	P-valor
EDAD	47±9	51±11	P=0,056
SEXO	30% V 70% M	10% V 90% M	P=0,218

Tabla 4. Datos demográficos grupo control y SS

En el grupo SS se incluyeron 13 pacientes con SS primario y 17 con SS secundario, de los cuales: 8 presentaban un lupus eritematoso sistémico, 7 artritis reumatoide y 2 espondilitis anquilopoyética. El tiempo medio de evolución de la enfermedad SS fue de 12 ± 8 años.

Otras comorbilidades presentes en la población estudiada fueron (tabla 5):

Enfermedad	Control	SS
HTA	3,3%	20%
DM	6,6%	3,3%
F. Raynaud	-	6,6%
Enf. Distioidea	-	6,6%
Tto antidepresivos	-	13,3%
Fibromialgia	-	6,6%

Tabla 5. Otras enfermedades presentes en la población.

HTA: Hipertensión arterial; DM: Diabetes mellitus. F. Raynaud: fenómenos de Raynaud. Enf. Distiroidea: enfermedad distiroidea. Tto: tratamiento.

B. EVALUACIÓN DE LA HUMEDAD DE LA SUPERFICIE OCULAR.

B.1 Flujo de secreción lagrimal basal

Los valores medios de secreción lagrimal medidos con el test de Schirmer mostraron valores significativamente mas bajos en el grupo SS que en los controles (controles: $13,83 \pm 6,7$ mm vs grupo SS: $6,6 \pm 3$ mm; $P < 0,01$; U de Mann-Whitney, Figura 32).

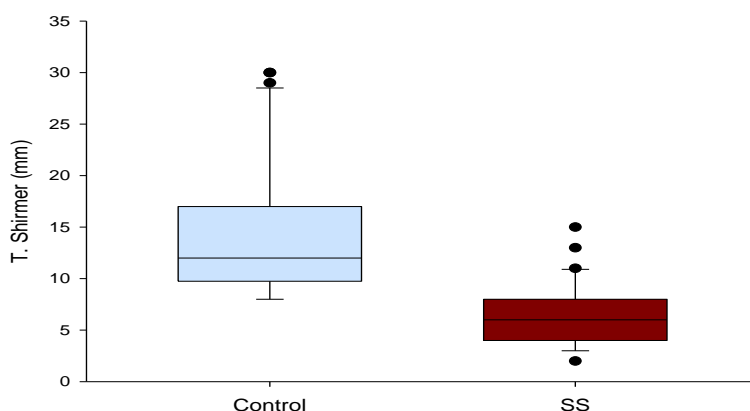


Figura 29. Comparación del flujo de secreción lagrimal basal entre pacientes SS y controles. ($p < 0,001$)

B.2 Tiempo de ruptura de la película lagrimal (TBUT)

Como se muestra en la Figura 33, la película lagrimal se rompía en un tiempo significativamente mas corto en los pacientes con SS que en los individuos sanos (grupo control $13,83 \pm 6,7s$ vs SS $6,6 \pm 3s$; $p < 0,001$. *U de Mann Whitney*).

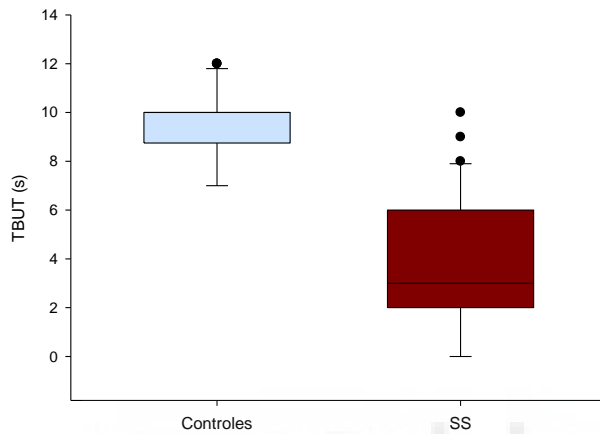


Figura 30. Comparación del TBUT entre pacientes SS y controles.

B.3 Daño en la superficie corneoconjuntival:

Los pacientes SS presentaron afectación de la superficie ocular con un valor medio de 1.8, según la Escala de Oxford mientras que en los controles el valor medio fue de 0 ($p < 0,001$; *U de Mann Whitney*) (Figuras 34 y 35).

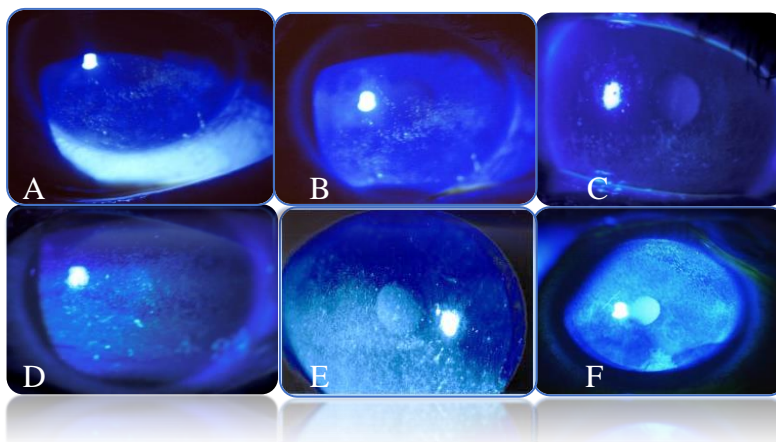


Figura 31. Imágenes de la superficie ocular de seis pacientes con síndrome de Sjögren, que muestran la presencia de distintos grados de epitelopatía punctata superficial secundaria a la enfermedad. A. Grado I escala de Oxford. B. Grado II, C-D Grado III, E-F Grado IV.

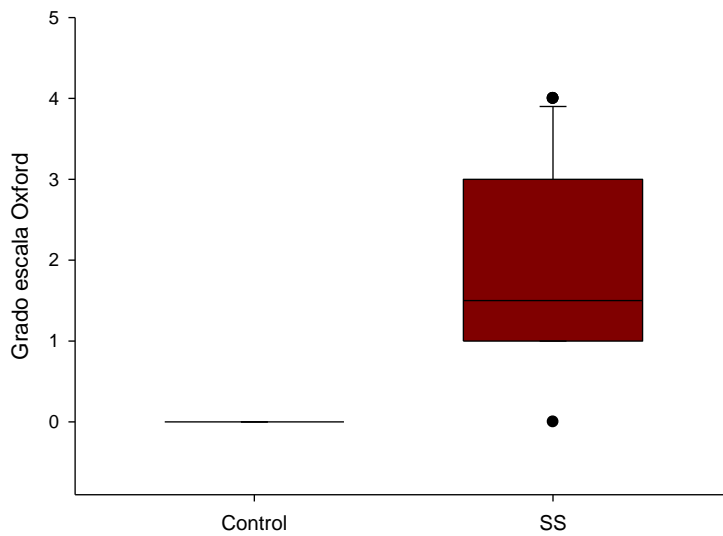


Figura 32. Comparación del daño de la superficie corneconjuntival entre pacientes SS y controles.

B.4 Volumen del menisco lagrimal.

Los pacientes SS presentaban un volumen lagrimal, estimado a partir del valor de la altura del menisco inferior, significativamente inferior al de los individuos sanos (control $219,56 \pm 70,78 \mu\text{m}$ vs SS: $161,91 \pm 79,4 \mu\text{m}$; $p < 0,001$; *U de Mann-Whitney*).

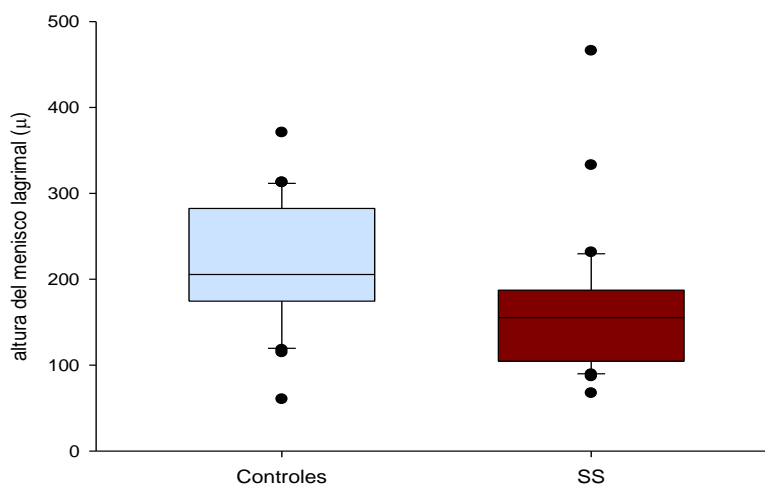


Figura 33. Comparación de la altura del menisco lagrimal entre grupo SS y sujetos sanos.

B.5 Cuestionario Mcmonnies

El grupo de pacientes SS mostró mayor sintomatología de enfermedad de ojo seco que el grupo control (grupo control $3,7 \pm 2,2$ vs SS: $13,50 \pm 3,2$; $<0,001$. *U de Mann-Whitney*).

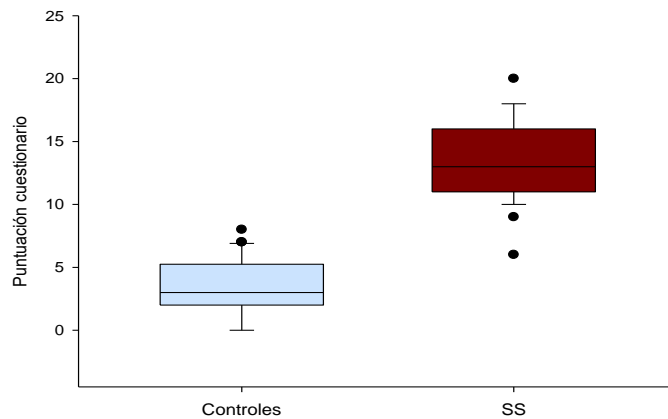


Figura 34. Comparación cuestionario de McMonnies entre grupo SS y control. En ordenadas se muestra la suma de los valores otorgados a las preguntas del cuestionario por los individuos control y enfermos con SS.

C. TERMOGRAFÍA:

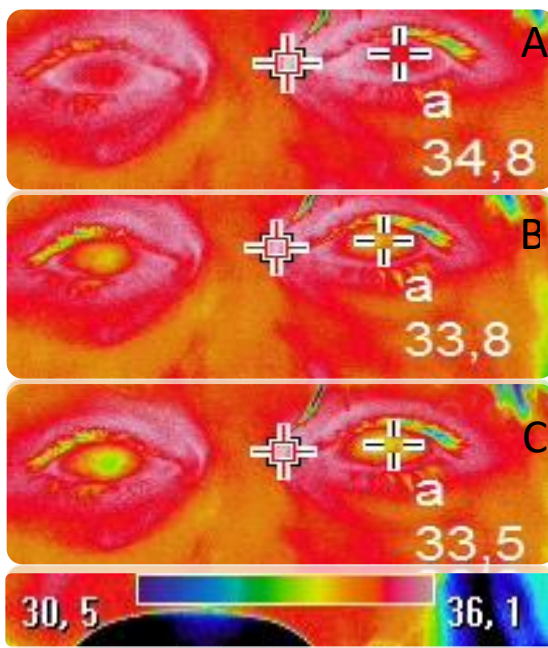


Figura 35. Imágenes termográficas de la superficie ocular enfocadas al centro de la córnea (A-C). Evolución del descenso de la TSC a lo largo del tiempo entre 2 parpadeos. La banda inferior muestra la escala de temperaturas y su equivalencia en colores.

C.1 Los pacientes SS mostraban valores de temperatura corneal máxima (T_{Max}) significativamente mayores que los controles.

Los pacientes con SS mostraron una T_{Max} , contabilizada a partir de los 0,10-0,15s tras el pico del parpadeo (*ver métodos*), más alta que los sujetos sanos (controles $33,93 \pm 0,84$ °C vs SS $34,77 \pm 0,61$ °C; $p < 0,001$; *t-student*).

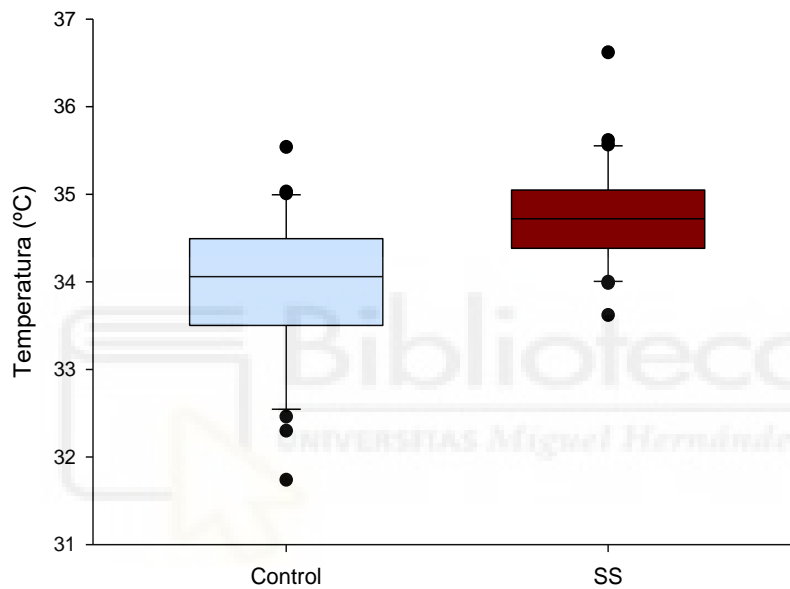


Figura 36. Comparación de la media de la T_{MAX} entre los pacientes SS y los controles ($p < 0,001$; *t-student*)

C.2 La Temperatura media (T_m) fue mayor en los pacientes con SS que en los controles.

Los pacientes SS registraron una T_m superior a los controles (controles: $33,56 \pm 0,84$ °C vs SS: $34,23 \pm 0,69$ °C; *t-student*, $p = 0,001$).

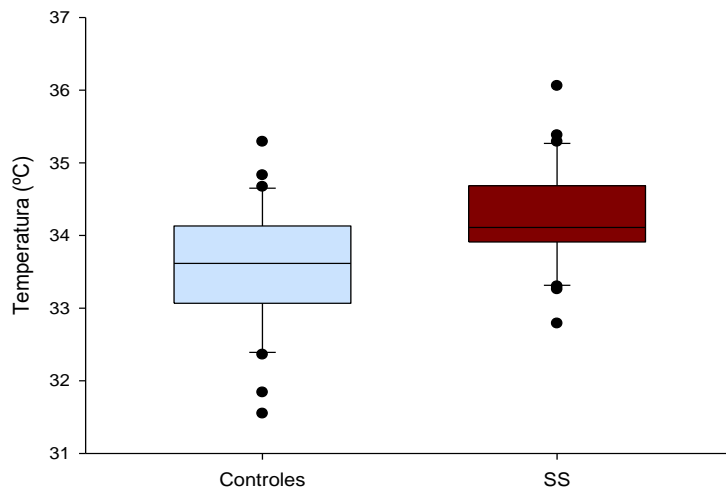


Figura 37. Comparación de la temperatura media corneal durante un intervalo inter-parpadeos entre pacientes SS y controles (t-student, $p=0,001$).

C.3 La temperatura mínima (T_{\min}) de la superficie corneal durante el intervalo inter-parpadeos era mayor en los pacientes SS pero su diferencia con los controles no fue significativa.

La temperatura mínima (T_{\min}) de los pacientes con SS era algo más alta que la de los controles, aunque la diferencia no resultó significativa (grupo control $33,23 \pm 0,9$ °C vs SS $33,63 \pm 0,7$ °C; $p=0,078$ t-student).

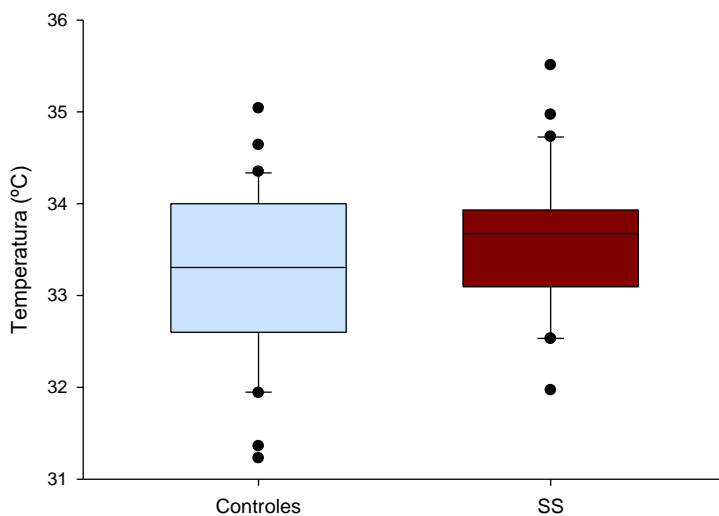


Figura 38. Comparación de la temperatura mínima (T_m) en el periodo interparpadeo entre los pacientes SS y sujetos control.

C.4 Los pacientes con SS presentaban una variación media de TSC durante el periodo interparpadeo ($-\Delta T$), mayor que los sujetos controles.

El ritmo de caída media de la TSC en los pacientes con SS fue de $-0,116 \pm 0,69$ °C/s, mientras que en el grupo control fue de $-0,080 \pm 0,61$ °C/s. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0,011$; U Mann Whitney)

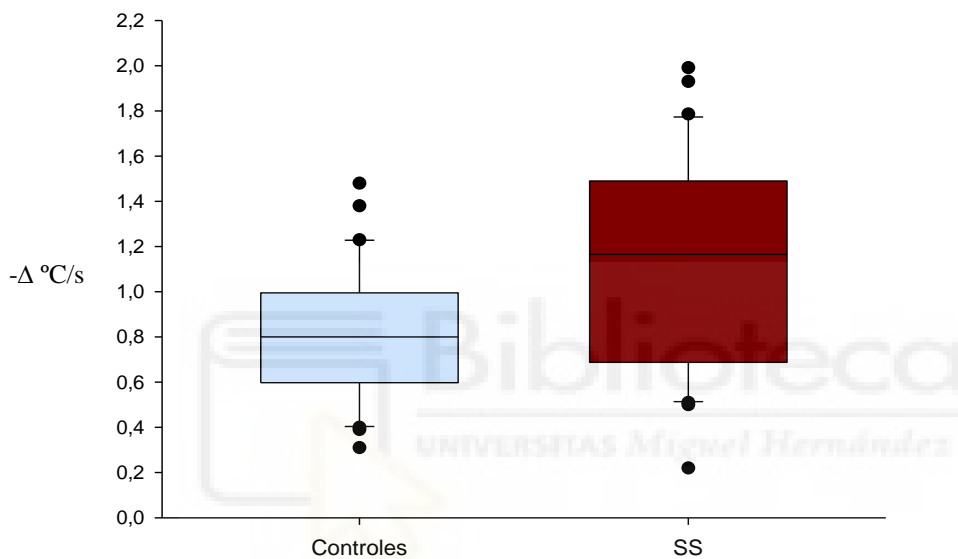


Figura 39. Comparación de la variación media de TSC durante un periodo interparpadeo entre pacientes SS y sujetos control. ($p=0,011$; U Mann Whitney)

C.5. La TSC al abrir el ojo tras un parpadeo era más alta en los pacientes SS que en los sujetos control.

El incremento de la TSC que tiene lugar durante el tiempo en el que el ojo permanece cerrado se valoró determinando el incremento de temperatura entre la T_{\min} del intervalo interparpadeos anterior y la T_{\max} del intervalo siguiente, dividido por el tiempo comprendido entre ambas variables. Esta medida fue superior en los pacientes con SS que en los sujetos control, sin

embargo, dicha diferencia no fue significativa entre ambos grupos (grupo control: $0,98 \pm 0,6$ °C/s vs SS: $1,19 \pm 0,58$ °C /s; $p=0,53$ U Mann Whitney).

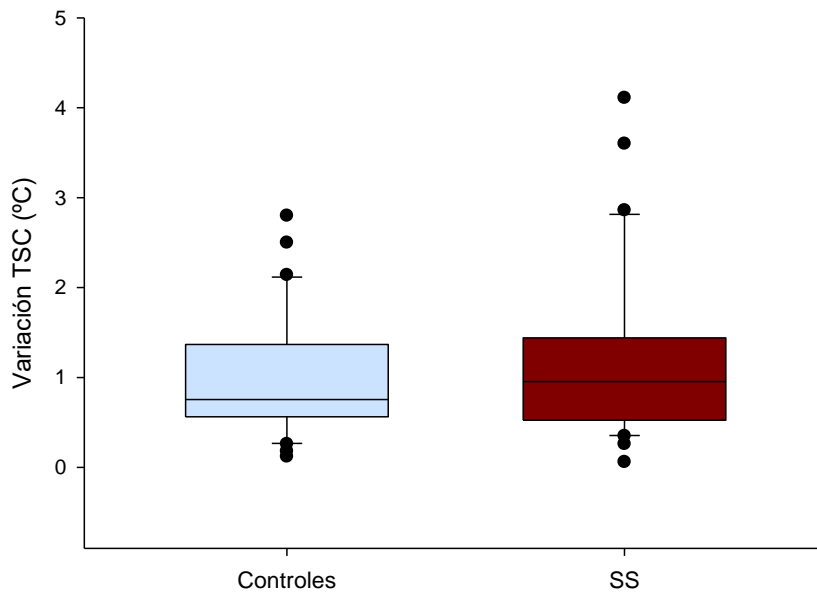


Figura 40. Aumento de TSC entre la Tmin y la Tmax inmediata tras un parpadeo.

Tabla 6. Comparación de la temperatura corneal en pacientes SS y controles.

	Controles	SS	P-valor
T_{MAX}	$33,93 \pm 0,84^{\circ}C$	$34,77 \pm 0,6^{\circ}C$	<0,001
T_{min}	$33,23 \pm 0,9^{\circ}C$	$33,63 \pm 0,7^{\circ}C$	0,078
ΔT	$-0,080 \pm 0,61^{\circ}C$	$-0,116 \pm 0,69^{\circ}C$	0,011
T_m	$33,56 \pm 0,84^{\circ}C$	$34,23 \pm 0,69^{\circ}C$	0,001

T_{MAX} : Temperatura máxima; T_{min} : temperatura mínima; ΔT : variación media de temperatura durante un intervalo inter-parpadeos; T_m : temperatura media. Cada valor es expresado como media \pm SE.

C.6 El tiempo medio de oclusión palpebral fue ligeramente más alto en los pacientes SS que en los controles.

Los pacientes con SS mostraron un tiempo de oclusión palpebral ligeramente superior a los controles, a pesar de que dicha relación no resultó significativa. (controles $1,11 \pm 0,44s$ vs SS: $1,18 \pm 0,6 s$; t-student; $p=0,62$).

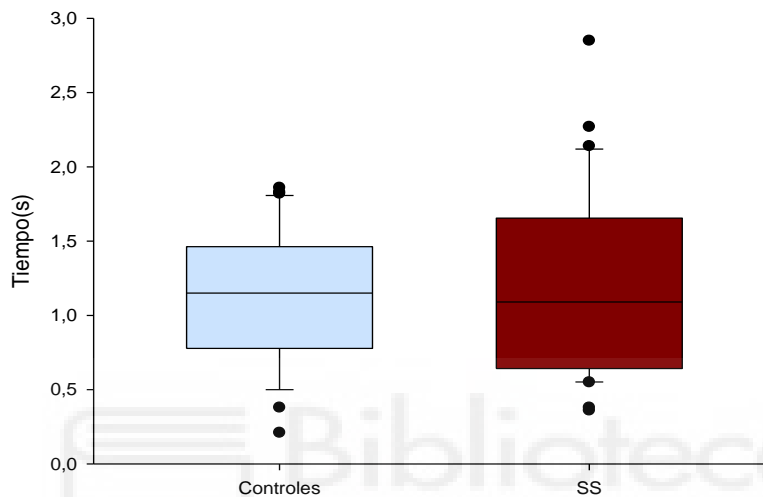


Figura 41. Tiempo medio de cierre palpebral en los pacientes SS y controles.

C.7 La caída de la TSC mostraba 2 velocidades de descenso durante un periodo interparpadeo.

Los primeros análisis de determinación de la pendiente de caída de la TSC pusieron de manifiesto un descenso de la temperatura a diferente velocidad a lo largo de un intervalo inter-parpadeos. Inicialmente la curva de TSC adoptaba un perfil más abrupto (pendiente M_1) que era continuado con otro de morfología más lineal (pendiente M_2) (Figura 29).

Por ello, decidimos calcular dicho descenso en dos fases. La comparación entre ambos perfiles de la curva de TSC (M_1 y M_2) en un intervalo inter-parpadeos fue estadísticamente significativa tanto en los pacientes con SS como en los controles (SS: $M_1 -0,37 \pm 0,31$ °C/s vs $M_2 -0,08$

$\pm 0,07$ °C/s; $p < 0,001$; U de Mann Whitney. Controles: $M_1 -0,26 \pm 0,2$ °C/s vs $M_2 -0,22 \pm 0,83$ °C/s; $p < 0,001$; U de Mann Whitney).

C.7.1 Pacientes SS:

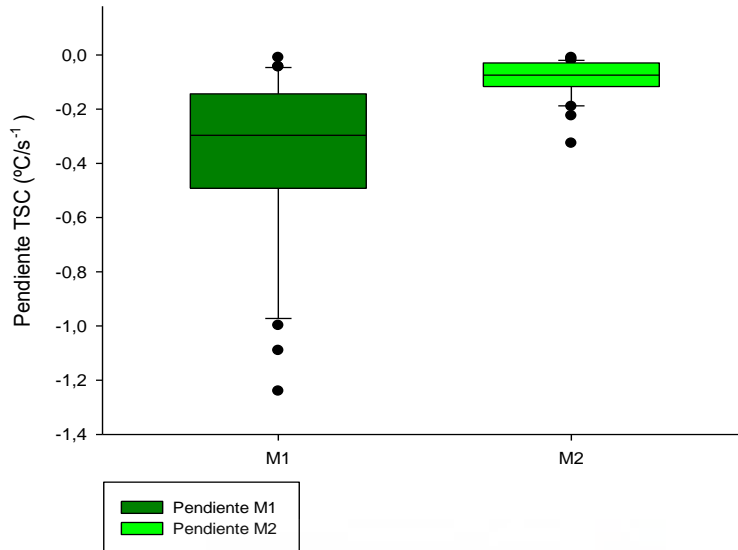


Figura 42. Comparación descenso de TSC (inicial (M_1) menos final (M_2)) durante el periodo inter-parpadeos en el grupo SS.

C.7.2 Controles:

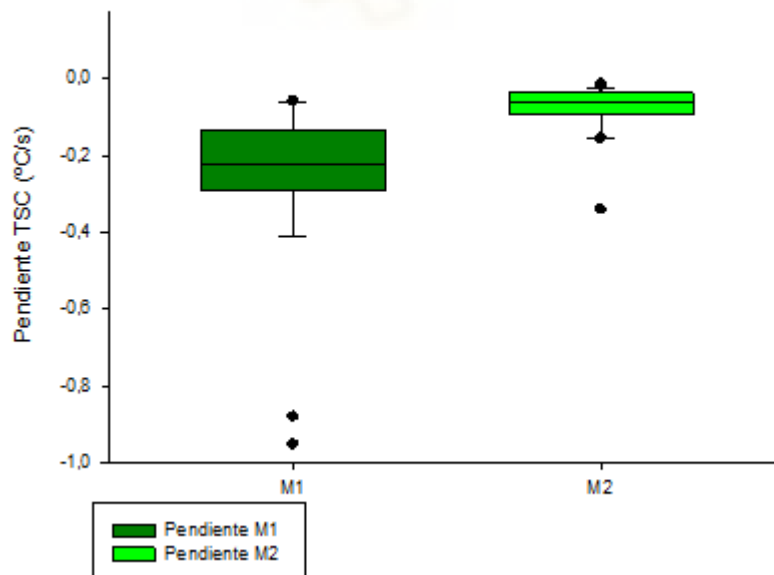


Figura 43. Comparación del descenso de TSC durante el periodo inter-parpadeos en sujetos control. En la pendiente M_2 se ha desechado un valor outlander de -4,640.

Tabla 7. Comparación de las pendientes de descenso de temperatura corneal en ambos grupos.

	$M_1(^{\circ}\text{C/s})$	$M_2(^{\circ}\text{C/s})$	P -valor
Controles	-0,26±0,2	-0,22±0,83	<0,001
SS	-0,37±0,31	-0,08±0,07	<0,001

Todos los valores son expresados como la media± SE.

C.8 El descenso total de la TSC a lo largo de un intervalo interparpadeos tendía a ser más rápido en los pacientes SS que en los controles.

Los pacientes SS mostraron una caída de la TSC mayor que los sujetos sanos, a pesar de que dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa. Esto podría deberse, en parte, al empleo de test no-paramétricos al existir una mayor dispersión de los datos. Para realizar esta valoración comparamos la pendiente total (M_T) entre los casos y los controles (controles: $-0,11 \pm 0,05$ $^{\circ}\text{C/s}$ vs SS: $-0,141 \pm 0,08$ $^{\circ}\text{C/s}$ vs; $p=0,35$; U de Mann Whitney), haciendo lo propio con la pendiente M_1 (controles : $-0,26 \pm 0,20$ $^{\circ}\text{C/s}$ vs SS: $-0,37 \pm 0,315$ $^{\circ}\text{C/s}$; $p=0,22$ U Mann Whitney) y con la pendiente M_2 (controles: $-0,22 \pm 0,8$ $^{\circ}\text{C/s}$ vs SS: $-0,087 \pm 0,07$ $^{\circ}\text{C/s}$; $p=0,35$; U de Mann Whitney).

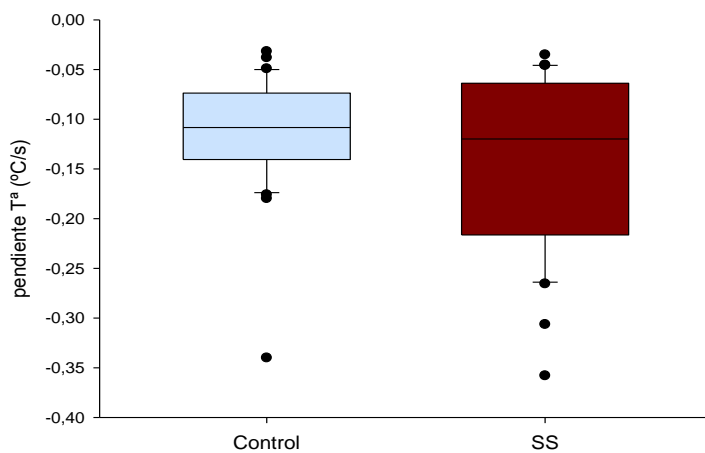


Figura 44. . Comparación de la pendiente total de descenso de la TSC entre pacientes SS y controles. Los sujetos sanos mostraron una caída más lenta que los pacientes SS durante el intervalo interparpadeos, a pesar de no resultar significativa esta relación ($p=0,35$; U de Mann Whitney).

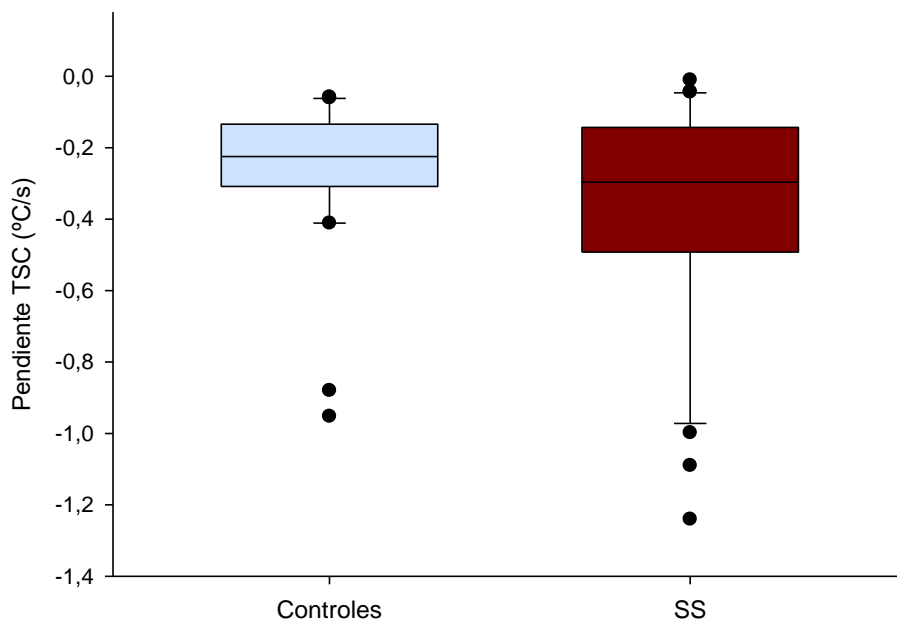


Figura 45. Comparación de la pendiente M₁ entre controles y pacientes SS. En los pacientes SS la pendiente M₁ descendía ligeramente más rápida que en los controles durante el intervalo inter-parpadeos (p=0,22 U Mann Whitney).

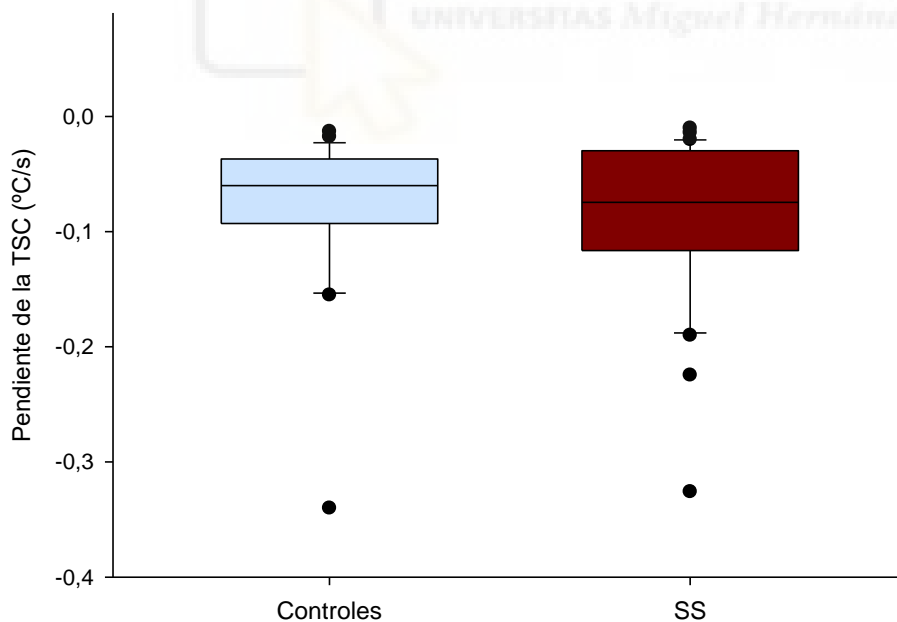


Figura 46. Comparación pendiente M₂ entre controles y pacientes SS. En el grupo SS la pendiente M₂ descendía ligeramente más rápida que en los controles durante el periodo interparpadeo (p=0,35; U de Mann Whitney). En la pendiente M₂ de los controles se ha desecha un valor *outlayer* de -4,640.

Tabla 8. Comparación de las pendientes de caída de la TSC entre controles y pacientes SS.

Pendiente TSC	Controles	SS	<i>p</i>-valor
M₁(°C/s)	-0,26±0,2	-0,37±0,31	0,22
M₂(°C/s)	-0,22±0,83	-0,08±0,07	0,35
M_T(°C/s)	-0,11±0,05	-0,14±,08	0,35

Todos los valores son expresados como media± SE.

C.9 Correlaciones entre los parámetros clínicos y termográficos

Todas las variables clínicas (flujo de secreción lagrimal basal, flujo de secreción refleja estimulada mediante CO₂, daño de la superficie corneal, altura del menisco lagrimal y cuestionario de Mcmonnies) se correlacionaron con las variables termográficas (Temperatura máxima, temperatura mínima, variación de temperatura en el periodo inter-parpadeos, pendiente de caída M₁, pendiente de caída M₂ y pendiente de caída total M_T) tanto en los casos como en los controles. Se consideró significativo un $p \leq 0,05$.

▪ Pacientes SS

	T. Schirmer ₂	T. Schirmer CO ₂	QPS	H. Menisco	Variación TSC	T _{min}	T _{MAX}	M1	M2	MT	Mcmo.	T ^a Amb.	%Humedad	Edad
TBUT	0,16	0,27	-0,7	0,08	-0,13	0,147	0,08	0,225	0,12	-0,07	-0,60	-	0,10	-0,30
T.Schirmer₂		0,6*	-0,28	0,43*	0,1	-0,07	0,01	-0,12	-0,19	-0,30	-0,16	-	-0,25	0,07
T. Schirmer CO₂			-0,33	0,45*	-0,07	0,19	0,25	0,08	-0,03	-0,19	-0,29	0,09	-0,3	-0,18
QPS				-0,32	0,22	-0,37*	-	-0,16	0,05	0,23	0,6*	-	-0,02	0,30
H. Menisco					-0,06	0,12	0,10	0,06	-0,12	-0,06	-	0,11	-0,2	0,06
Variación TSC						-0,67*	-	-0,4*	-0,5*	-0,6*	0,1	-	-0,20	0,3
T_{min}							0,80*	0,1	0,48*	0,2	-0,18	-	0,28	-0,46*
T_{MAX}								-0,19	0,18	-0,23	-0,13	0,10	0,21	-0,3*
M1									0,28	0,44*	-0,18	0,11	-0,02	-0,27
M2										0,58*	-0,02	0,03	0,11	-0,19
MT											0,13	0,03	-0,04	-0,09
Mcmo.												-	0,2	-0,01
T^a Amb													0,09	-0,3*
%Humedad														-0,3*

Tabla 9. Correlaciones entre los parámetros termográficos y clínicos en los pacientes SS. *: $p \leq 0,05$. QPS: queratitis punctata superficial; H. menisco: altura del menisco lagrimal; Variación TSC: Variación media de la temperatura de la superficie corneal inter-parpadeos; T_{min}: Temperatura mínima inter-parpadeos; T_{MAX}: Temperatura máxima inter-parpadeos; M1: Pendiente de caída de la TSC inicial; M2: pendiente de caída de la TSC final; MT: pendiente de descenso de la TSC total; Mcmo: cuestionario de Mcmonnies; T^a amb: Temperatura ambiental; % Hume.: % humedad.

C.9.1 En los pacientes SS se observó una correlación inversa entre el daño de la superficie corneoconjuntival y la temperatura mínima de la superficie ocular.

Dicha correlación supone que a mayor afectación de la superficie corneal menor temperatura mínima registrada ($r=0,37$; $p=0,04$; Correlación de pearson).

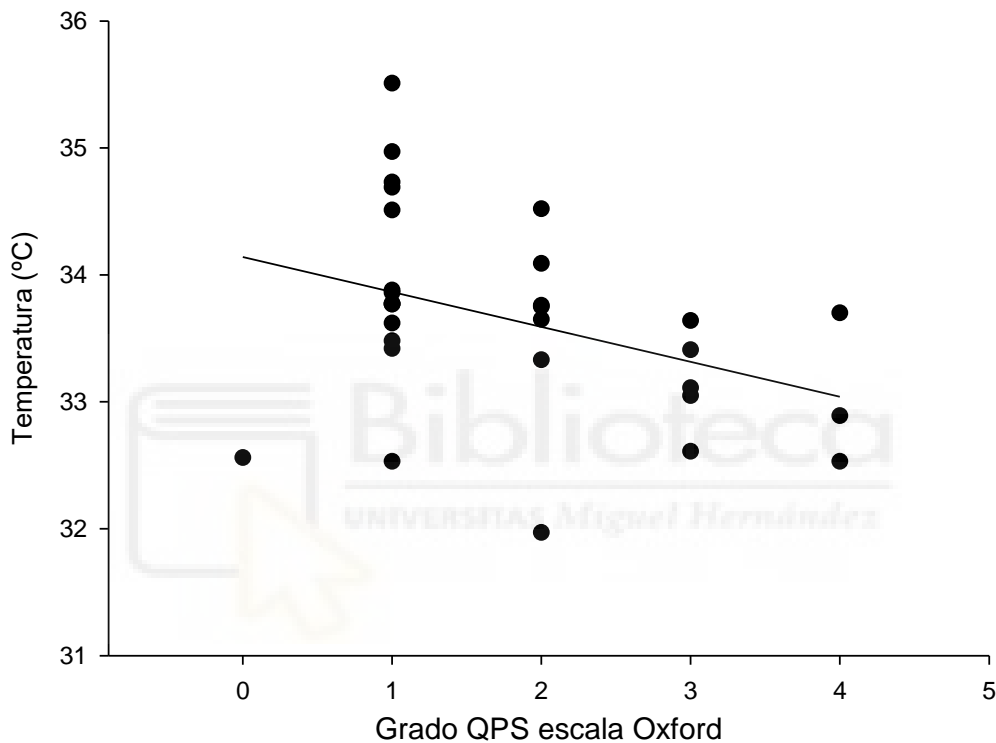


Figura 47. Correlación entre la afectación de la superficie corneoconjuntival y la temperatura mínima de la superficie corneal.

C.9.2 La temperatura de la superficie ocular estaba inversamente relacionada con la edad.

En los casos, los pacientes más añosos presentaban una TSC más fría que los más jóvenes. La disminución de temperatura máxima por año es a razón de $-0,032^{\circ}\text{C}/\text{año}$ ($r=0,36$; $p=0,04$; correlación de Pearson) y la

mínima - $0,019^{\circ}\text{C}/\text{año}$ ($r=0,46$; $p=0,01$; *correlación de Pearson*), siendo la media de $-0,020^{\circ}\text{C}$.

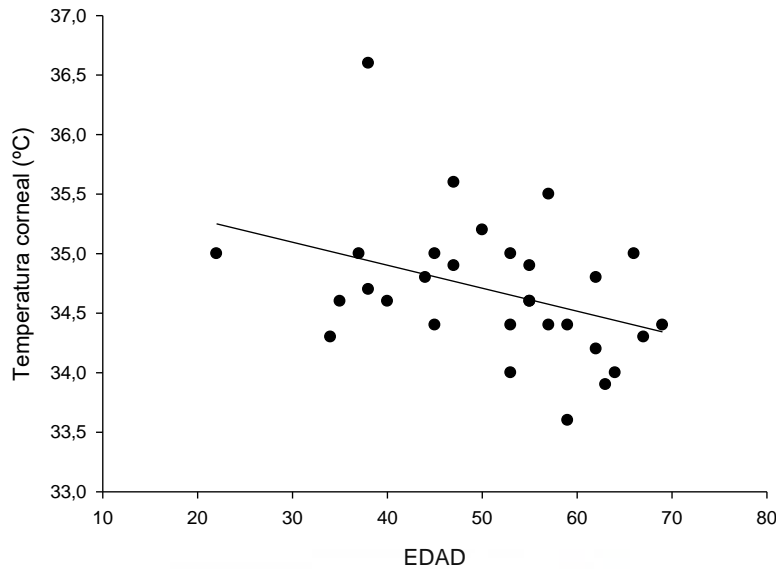


Figura 48. Correlación entre la edad y la temperatura máxima de la superficie ocular. ($r=0,36$; $p=0,04$; *correlación de Pearson*)

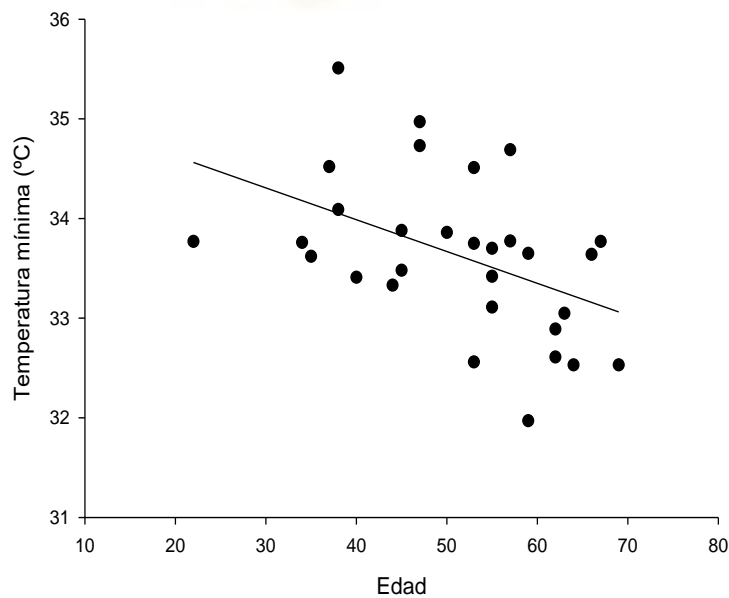


Figura 49. Correlación entre la edad y la temperatura mínima de la superficie ocular. ($r=0,46$; $p=0,01$; *correlación de Pearson*).

▪ En los controles:

No se encontraron correlaciones entre los parámetros clínicos y los termográficos (Tabla 12).

	T.Schirmer _g	T. Schirmer CO ₂	QPS	H. Menisco	Variación TSC	T _{min}	T _{MAX}	M1	M2	MT	Mc mo.	T ^a Amb.	%Humedad	Edad
TBUT	-0,28	-0,33	0,07	0,120	-0,2	0,19	0,18	0,08	0,32	0,10	-0,21	-0,08	-0,03	-0,27
T.Schirmer_g		0,65*	-0,05	0,09	0,10	-0,08	-0,13	0,12	0,10	-0,04	0,01	-0,27	0,3	0,07
T. Schirmer CO₂			0,07	0,05	0,2	-0,2	-0,2	-0,06	0,12	-0,07	-0,07	0,16	0,05	
QPS				0,18	-0,08	0,03	0,02	0,004	0,04	0,008	-0,2	-0,02	0,2	0,07
H. Menisco					0,11	-0,1	-0,14	-0,35	0,08	0,005	-0,04	0,3	-0,1	0,3
Variación TSC						-0,7*	-0,3*	0,006	-0,3	0,007	0,07	0,1	-0,1	0,04
T_{min}							0,85	0,17	0,25	0,18	-0,22	0,02	0,04	-0,08
T_{MAX}								0,31	0,14	0,2	-0,2	0,05	-0,004	0,14
M1									0,12	0,3	-0,09	-0,17	0,01	0,22
M2										-0,11	-0,06	0,2	-0,03	0,02
MT											-0,10	0,06	0,42	0,15
Mc mo.												-0,29	0,007	0,2
T^a Amb													0,2	-0,12
%Humedad														0,04

Tabla 10. Correlaciones entre los parámetros termográficos y clínicos en los controles. *: $p \leq 0,05$. QPS: queratitis punctata superficial; H. menisco: altura del menisco lagrimal; VariaciónTSC: Variación media de la temperatura de la superficie corneal interparpadeos; T_{min}: Temperatura mínima inter-parpadeos; T_{MAX}: Temperatura máxima interparpadeos; M₁: Pendiente de caída de la TSC inicial; M₂: pendiente de caída de la TSC final; M_T: pendiente de descenso de la TSC total; Mcmo: cuestionario de Mcmonnies; T^a amb: Temperatura ambiental; % Hume.:% humedad.

NOTA

La sección D (Resultados de la estimulación irritativa de la superficie corneal) está protegida mediante acuerdo de confidencialidad, según a la decisión de la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández fechado el 16 de Enero de 2019.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo hemos estudiado los cambios en la temperatura corneal y la secreción refleja lagrimal que pueden tener lugar en la enfermedad de ojo seco secundaria al SS, empleando dos técnicas específicas: la termografía corneal y la determinación del FSR lagrimal evocado por estimulación química de la superficie corneal con CO₂. Ninguna de ellas está siendo todavía utilizada en la práctica clínica diaria. Nuestro trabajo las emplea por vez primera para este fin y sugiere que ambas pueden ser útiles para un mejor diagnóstico y consecuentemente, un tratamiento más eficaz de la enfermedad. Complementariamente, pueden también servir para el estudio y la mejor comprensión de las bases fisiopatológicas de la enfermedad de ojo seco.

A. CARACTERÍSTICAS DE LOS MÉTODOS DE EXPLORACIÓN EMPLEADOS

A.1. Termografía de la superficie ocular.

La termografía corneal realizada mediante cámaras de rayos infrarrojos de precisión disponibles en el mercado, constituye un método no invasivo, reproducible, objetivo y de sencilla utilización, para medir con exactitud la temperatura de la superficie corneal a lo largo del tiempo. Su primer uso oftalmológico fue propuesto por Mapstone¹⁷¹ en el año 1968. Desde entonces, numerosos trabajos han descrito los valores de la temperatura de la superficie ocular en sujetos normales o en pacientes oftálmológicos, con resultados muy dispares. Ello es atribuible por una parte a las diferencias en la sensibilidad y rango dinámico de los sistemas de medida empleados y por otra a la falta de homogeneidad en los protocolos experimentales empleados por

los diferentes autores. Los avances tecnológicos conseguidos en años recientes han logrado aumentar acusadamente la capacidad de las cámaras de infrarrojos para detectar pequeños cambios de temperatura, tanto en lo que se refiere a su magnitud (cambios $<0,025^{\circ}\text{C}$) como a la resolución temporal (60 Hz).

El equipo empleado en nuestro estudio (cámara termográfica de rayos infrarrojos InfRec R300SR, ver *Métodos*) nos ha permitido obtener un valor de la temperatura corneal cada 16.6 milisegundos y discriminar diferencias $<0.03^{\circ}\text{C}$. Los resultados obtenidos, como se comenta mas abajo, indican que esta capacidad de discriminación es suficiente para detectar con precisión pequeñas variaciones en la temperatura corneal y en el curso temporal de tales cambios en el intervalo entre parpadeos. La comodidad y sencillez de esta exploración permite concluir que la termografía corneal superficial puede ser un procedimiento útil para el diagnóstico de algunas enfermedades oculares que se acompañen de cambios térmicos.

A.2. Estimulación de la secreción lagrimal refleja

En nuestro trabajo, empleamos por vez primera un nuevo dispositivo liberador de CO_2 sobre la superficie corneal, que estimula fundamentalmente los nociceptores polimodales corneales, generando un incremento reflejo de la secreción lagrimal. Este dispositivo se basa en los estudios sobre la sensibilidad corneal en animales de experimentación y en seres humanos llevados a cabo en los últimos 25 años por el grupo de trabajo de los Directores de esta tesis ^{4,6,7,8,20,21,22,24,25,37,38,40}.

B. SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

El grupo oftalmológico incluido en nuestro estudio fueron 30 pacientes diagnosticados de SS por el Servicio de Reumatología del Hospital Marina Baixa y 30 sujetos controles. Existía una clara predominancia de población femenina. En referencia a la edad, la cohorte SS es ligeramente más envejecida que la muestra control (controles: 47 ± 9 años vs 51 ± 11 SS), una diferencia cercana a la significación estadística ($p=0,056$), que puede introducir un sesgo en nuestro estudio, dado que la edad es uno de los condicionantes tanto de la TSC como de la producción lagrimal.

Del mismo modo, en la población de pacientes SS aparecen, además, una serie de enfermedades sistémicas, tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus, fibromialgia o enfermedad distiroidea, que podrían haber influido en la mayor frecuencia y/o intensidad de los síntomas de ojo seco, constituyendo del mismo modo un sesgo en el estudio.

La población SS está caracterizada, por definición, por la afectación de todos los parámetros clínicos con los que evaluamos rutinariamente la enfermedad de ojo seco, siendo estadísticamente significativa su diferencia con respecto a la cohorte control.

C. RESULTADOS TERMOGRÁFICOS

C.1. Estudios previos en el ratón sugieren que la reducción de la película lagrimal con la edad y la disminución de la producción de lagrime producen cambios en la temperatura de la superficie corneal.

Los estudios preliminares en ratones intactos de edades diferentes incluidos en este trabajo, realizados por A. Aracil et al,¹²⁸ mostraban una correlación inversa entre la edad y la TSC, medida con el mismo sistema que

en el presente trabajo. No existen, hasta donde sabemos, estudios sistemáticos previos, analizando en ratones u otros animales de experimentación las diferencias en la TSC con la edad. Sin embargo, los datos disponibles sobre los cambios en la secreción lagrimal basal en ratones de 2 a 24 meses indican que ésta se va reduciendo paulatinamente (Alcalde et al., 2018), lo que sugiere que el menor espesor de la película lagrimal con el envejecimiento favorece el enfriamiento corneal. Por el contrario, cuando se produce una desecación más intensa, como la que tiene lugar tras la resección aguda de la glándula lagrimal principal, la inflamación concomitante puede dar lugar a una elevación de la temperatura, como se comenta más adelante.

En conjunto, los datos experimentales en ratones, además de ser útiles para la puesta a punto del método de medida de la temperatura corneal en ojos humanos, indicaban que los cambios de esta variable podían estar asociados tanto al grado de humidificación de la superficie ocular como a la integridad del epitelio corneal y la presencia de procesos inflamatorios en el mismo.

C.2 Los pacientes con SS presentan una temperatura media de la superficie corneal mayor que los sujetos control.

Los resultados de la TSC observada en nuestros pacientes SS son coincidentes con los obtenidos por Morgan et al ¹⁸⁴ y Mori et al ¹⁸⁵. Sin embargo, difieren de otros muchos en los que se encuentra una TSC menor en los pacientes con enfermedad de ojo seco^{175,177,186,187,188,189}, (tabla 13).

Autor	TSC Enf. Ojo seco (°C)	TSC Control (°C)	P-valor
Morgan et al. ⁽¹⁸⁶⁾	32,38±0,69	31,94±0,54	p<0,001
Mori et al. ⁽¹⁸⁷⁾	35,6±1,6	35,4±1,8	P=0,78
Fujishima et al. ⁽¹⁸⁸⁾	34±0,5	34,2±0,4	p<0,001
Kamao et al. ⁽¹⁸⁹⁾	34,45±0,86	34,58±0,75	p<0,05
Azharuddin et al. ⁽¹⁹⁰⁾	30,33-39,37*	33,26-36,26*	p<0,001
Abreau et al. ⁽¹⁷⁷⁾	34,40 ±0,62	35,11± 0,64	p<0,001
P. Vesura et al. ⁽¹⁹¹⁾	34,1	34,6	p<0,001
Craig et al. ⁽¹⁷⁵⁾	33,24± 0,78	33,82±0,36	p=0,032

Tabla 11. Valores de la TSC durante el periodo inter-parpadeos en pacientes con enfermedad de ojo seco y en sujetos sanos. Todos los valores son expresados como la media±SE, excepto los marcados con * que representan el rango de variación de la TSC.

Las divergencias en los resultados obtenidos pueden deberse a la heterogeneidad de las diferentes poblaciones de pacientes de ojo seco estudiadas, la intensidad de la afectación, la variabilidad de instrumentos utilizados o el diferente protocolo de experimentación desarrollado en cada estudio.

La mayor TSC en los pacientes con SS con respecto a los controles, observada en nuestro trabajo se puede explicar por varias razones.

En primer lugar, numerosos estudios han mostrado un aumento de la temperatura corneal conforme se incrementa el flujo vascular al segmento anterior o en caso de inflamación del mismo ^{169,172,174,190,191}. Mapstone¹⁷² cifra este incremento de temperatura en 1,75°C cuando lo compara con el ojo sano. Por tanto, es razonable esperar que un ojo con enfermedad de ojo seco en el que subyace un ambiente inflamatorio pueda presentar un incremento en su temperatura corneal con respecto al sano.

En segundo lugar, nuestros pacientes con SS presentaban una disminución en la producción lagrimal (tabla 11), así como una mayor

inestabilidad de la misma. La reducción del espesor de la capa lipídica de la película lagrimal en los pacientes con ojo seco parece desencadenar valores de TSC mayores¹⁹² que en los sujetos sanos debido a la mayor evaporación, fundamentalmente cuando hay los patrones lipídicos marmóreos visualizados mediante *Tearscope*¹⁹³. En conjunto estas alteraciones conducen a un debilitamiento de la capacidad amortiguadora que ejerce la película lagrimal en la termorregulación corneal.

En tercer lugar, el parpadeo juega un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular, a través de una estimulación de la secreción lagrimal y a la dispersión de la lágrima por la superficie ocular. Estudios previos han mostrado un incremento significativo de la frecuencia de parpadeo en los pacientes con enfermedad de ojo seco⁹⁵, desencadenado tanto por la inestabilidad de la película lagrimal como por el de la superficie corneconjuntival¹⁹⁴. Con cada parpadeo se produce una transferencia de calor desde el párpado hacia la córnea, registrándose un pico en la temperatura de ésta última y posteriormente un descenso tras la apertura del parpado (Figura 27). Por lo tanto, la mayor frecuencia de parpadeo en los pacientes SS podría contribuir también a la mayor temperatura de la superficie ocular registrada.

C.3 Los pacientes con SS presentan mayor descenso de temperatura de la superficie corneal con respecto a los controles durante el periodo interparpadeo.

A pesar de que nuestros resultados no alcanzan a arrojar unos valores significativos, son numerosos los estudios previos que apoyan esta conclusión. Todos^{177,186,189,190,191} excepto uno¹⁸⁸, reportan un mayor descenso en la TSC en los pacientes con enfermedad de ojo seco en comparación con los sujetos sanos (tabla 14). Quizás podrían haber contribuido a la falta de significación estadística de nuestro estudio las diferencias poblacionales en

cuanto a la edad, así como a la presencia de otras comorbilidades en la cohorte SS.

Autor	Pendiente Enf.ojo seco	Pendiente Control	P-valor
Morgan et al ¹⁸⁶	0,88±0,23	0,21±0,27	p<0,0001
Fujishima et al ¹⁸⁸	0,2	0,61	P=0,0001
Kamao et al ¹⁸⁹	-0,32±0,23	-0,06±0,008	p<0,001
Azhaudidin et al ¹⁹⁰	30,33-39,37*	33,26-36,26	p<0,001
Abreau et al ¹⁷⁷	-0,73	-0,52	-
Vesura et al ¹⁹¹	-0,2(-0,2 a 0)*	-0,1(-0,3 a 0)	p<0,01
Craig et al ¹⁷⁵	0,24±0,06	0,17±0,73	P=0,024

Tabla 12. Comparación de las pendientes de descenso de la TSC entre parpadeos por diferentes autores. Las medidas son expresadas como la media ± SE, excepto (*) expresadas en rango de variación.

Los mecanismos de pérdida de calor desde la superficie lagrimal son diversos¹⁶⁹. En primer lugar, se produce un fenómeno de *convección* generado por el flujo de aire sobre la superficie corneal. En segundo lugar, cuando existe un gradiente de temperatura entre el medio ambiente, más frío, y la superficie corneal, más cálida, se genera una pérdida de calor por *radiación*. En tercer lugar, durante la apertura palpebral se produce una transferencia de calor por *evaporación* desde la superficie ocular al ambiente exterior debida al cambio de estado, de la fase líquida a la gaseosa, lo que absorbe calor. Este último dato es estimado por Scott et al ¹⁹⁵, quienes estiman en 0.24 °C por cada 20W m⁻² el descenso de la TSC por la evaporación. Es conocido que las

soluciones con mayor capacidad de evaporación generan una mayor tasa de enfriamiento^{196,197}, por lo que cabe esperar que en los pacientes con enfermedad de ojo seco, en los que el porcentaje de evaporación es mayor que en los sanos^{196,198,199}, el grado de enfriamiento de la superficie corneal será mayor.

Adicionalmente, la mayor oscilación de temperatura en los pacientes con enfermedad de ojo seco puede explicarse por las alteraciones cualitativas en la película lagrimal. Como se ha mencionado anteriormente, la disminución en el espesor de la capa lipídica y la predominancia de un patrón morfológico inestable, provocarían una mayor evaporación de la lágrima con el consiguiente enfriamiento de la superficie corneal^{176,196}. En este sentido, un estudio realizado por Li y colaboradores²⁰⁰ en el que analizan de forma simultánea el TBUT y la TSC, encuentra áreas localizadas de enfriamiento de la superficie corneal que preceden a la observación del TBUT y que representarían zonas concretas de elevada evaporación. Por lo tanto, estiman que el TBUT podría considerarse una medida indirecta del grado de evaporación que se da en la córnea.

Craig et al¹⁷⁵ apuntan, además, que el gradiente de temperatura existente entre el centro de la córnea, más frío y la zona limbar, más caliente por la inflamación local en los pacientes SS, podría contribuir a la mayor fluctuación de temperatura en éstos. Por otra parte, dado que en nuestro estudio dichos pacientes con SS registraban una TSC superior a los sanos, el gradiente existente entre la temperatura ambiental y el corneal es, en conjunto, mayor que en los sujetos sanos, por lo que cabe esperar que la fluctuación de temperatura también sea mayor que en éstos.

Finalmente, el mecanismo del parpadeo puede contribuir igualmente a este fenómeno. El ritmo de parpadeo parece determinado por factores locales de la superficie ocular, mecanismos psicológicos y circunstancias ambientales

²⁰¹. Todas aquellas circunstancias que disminuyen la humedad de la superficie ocular, por evaporación de la lágrima, disminuiría la temperatura y activaría el mecanismo reflejo del parpadeo, por mediación de los termorreceptores de frío, para el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular. Dado que los pacientes con EOS presentan una mayor frecuencia de parpadeo, así como un menor intervalo máximo inter-parpadeos^{196,197} y que con cada parpadeo se incrementa la temperatura de la superficie ocular, la fluctuación de la misma también será mayor en estos pacientes.

En referencia a las correlaciones obtenidas en nuestro estudio, encontramos que, en los pacientes con SS, aparecía una correlación inversa significativa entre el grado de lesión de la superficie corneconjuntival y la temperatura mínima durante un intervalo inter-parpadeos ($r=0,37$; $p=0,04$; correlación de pearson). Este hallazgo podría reflejar que en los pacientes con mayor inflamación se produce también una mayor pérdida de calor. No obstante, hay que precisar que la presencia de lesión en la superficie corneal no implica necesariamente un mayor ambiente inflamatorio puesto que esta respuesta se observa a veces en las fases iniciales de la enfermedad, en las que todavía no se ha evidenciado la queratopatía corneconjuntival.

Por otra parte, tanto la temperatura corneal máxima ($r=0,36$; $p=0,04$; correlación de Pearson) como la mínima ($r=0,46$; $p=0,01$; correlación de Pearson) registrada durante un intervalo inter-parpadeos se correlacionaron negativamente con la edad. Este dato coincide con los resultados publicados por otros autores^{183,184,185,202} que tratan, por otra parte, de establecer una tasa específica de descenso de temperatura a lo largo del tiempo.

Tanto Hoven y colaboradores⁽¹⁸⁵⁾ como Isenberg y Green⁽¹⁸³⁾ coinciden en un descenso de temperatura de $-0,02^{\circ}\text{C}$ al año utilizando un instrumento de contacto. Alió y Padrón⁽²⁰⁴⁾ establecen la misma tasa que los anteriores midiéndolo, por primera vez, con una cámara no invasiva. Morgan

et al (¹⁸²) establece que el cambio de temperatura a lo largo del año es de -0,010 °C y en el estudio más reciente publicado por Acharya (¹⁸⁴) analiza la temperatura en 3 grupos de edad en los que demuestra el descenso de la temperatura con el paso del tiempo (tabla 15), sin embargo, no establece una tasa específica de descenso. En nuestro estudio la obtención de una disminución de -0,025°C en la superficie corneal al año coincide con los datos propuestos por los 3 primeros autores.

Parameters	Below 30 years old	30 to 49 years old	50 years old and above	P-value
Temperature deviation across cornea (TDC) (°C)	0.137±0.10	0.175±0.11	0.243±0.16	<0.05
Average cornea temperature (ACT) (°C)	34.038±0.59	33.35±0.53	32.64±0.22	<0.0001

Tabla 13. Comparación de cambio de temperatura corneal a través del tiempo en los diferentes grupos de edad²¹².

C.4 El patrón de descenso de la temperatura de la superficie ocular muestra dos velocidades de caída, una inicial más abrupta seguida de otra más lenta.

Nuestro trabajo evidencia que la trayectoria de caída de la TSC entre 2 parpadeos tiene, tanto en los pacientes SS como en los controles, dos pendientes de descenso de temperatura, uno inicial, brusco (M₁) que se produce tras la apertura del párpado (fig. 59, línea roja) que interpretamos como resultante de los mecanismos físicos pasivos de pérdida de calor: convección, radiación y evaporación; y una segunda pendiente (M₂), de morfología más aplanada (fig. 59, línea azul), que podría corresponder a la

activación de los mecanismos compensadores de la termorregulación corneal y que amortiguarían el descenso de la TSC.

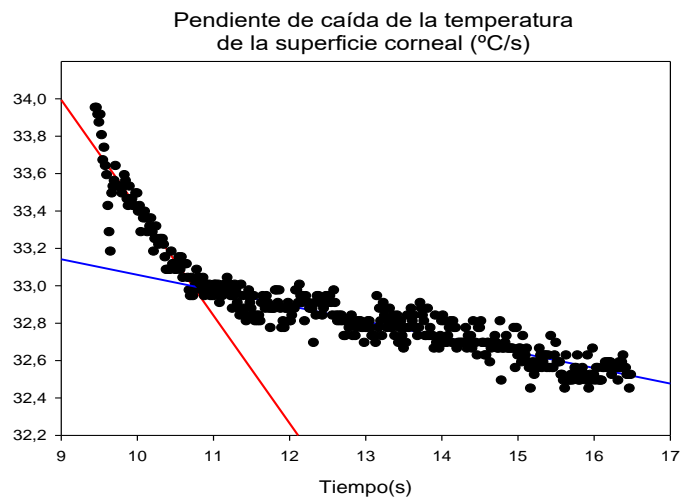


Figura 50. Pendiente de TSC entre 2 parpadeos en humanos (°C/s). El descenso de temperatura perfila 2 fases: una inicial más rápida (pendiente M_1 , línea roja) seguida de otra más lentificada (pendiente M_2 , línea azul).

P. Vesura et al¹⁹¹ describen un perfil diferente de enfriamiento máximo de la TSC tras la apertura palpebral, distinguiendo entre los pacientes con enfermedad de ojo seco de tipo evaporativo y los controles. En los primeros, los autores distinguen 3 fases de descenso, una primera, suave, seguida de otra más pronunciada que termina aplanándose. En sus controles, el descenso general de temperatura es mucho más suave y homogéneo (Figura 60).

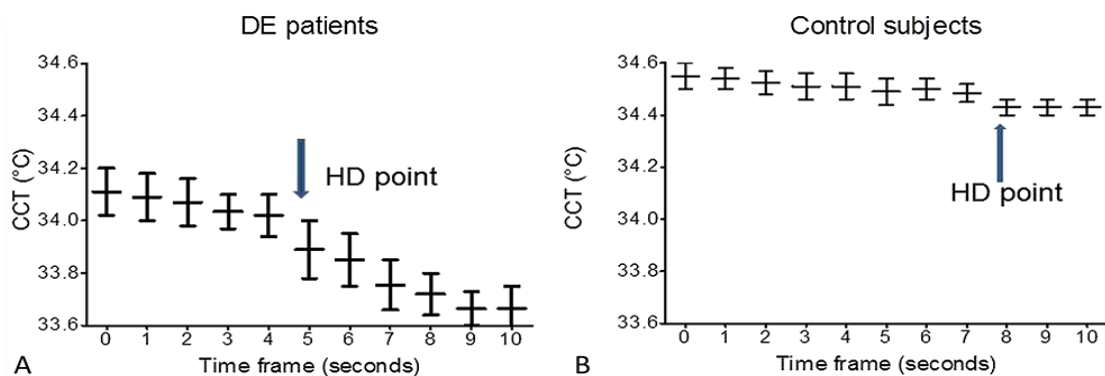


Figura 51. Descenso de la temperatura de la superficie corneal durante un intervalo inter-parpadeos¹⁹¹ (A) Pacientes con enfermedad de ojo seco, donde se muestran 2 pendientes de caída de la temperatura; (B) Controles, en los que el descenso de temperatura es mucho más lineal. HD: Punto de máximo descenso de temperatura.

No tenemos una explicación obvia a estas diferencias, excepto atribuir las a una mayor sensibilidad y velocidad de respuesta de nuestra cámara, que nos permitió apreciar una doble pendiente también en los sujetos normales, no evidente en los datos de Vesura et al. Así como a diferencias tanto en el tipo de enfermedad de ojo seco evaluada que en nuestro caso fue lacrimodeficiente mientras que en el estudio de Vesura fue evaporativo y la realización de una metodología dispar. En este estudio los sujetos debían parpadear de forma natural, y a una señal mantener los ojos cerrados durante 5 segundos, tras lo cual debían abrirlos de forma forzada todo el tiempo que fueran capaces de aguantar sin parpadear.

En todo caso, ambos estudios ponen en evidencia la mayor velocidad de caída de la temperatura en los pacientes SS que en los controles, lo que podría deberse, entre otros factores, a una mayor tasa de evaporación como consecuencia de la baja estabilidad de la película lagrimal en estos pacientes.^{176,201,202}

C.5 Hipótesis fisiopatológica de la termorregulación corneal en pacientes con SS.

Los pacientes con SS presentan varias condiciones que conducen a una mayor fluctuación de temperatura de la superficie ocular con respecto a los sujetos sanos: 1) la mayor evaporación lagrimal (^{176,201,202}), 2) la disminución en la secreción lagrimal, 3) el mayor gradiente entre la temperatura ambiental y corneal, así como entre la temperatura limbar y el centro de la córnea (¹⁷⁵) y 4) un incremento en la frecuencia de parpadeo (^{195,203}). Esta oscilación en la temperatura junto al incremento en la osmolaridad lagrimal presente en los

pacientes con enfermedad de ojo seco (^{203,204}), activa los termorreceptores de frío produciendo una sensación de discomfort inicial.

Sin embargo, el sustrato inflamatorio subyacente en la enfermedad de ojo seco inicialmente silenciaría estos receptores (^{23,35,40,205,206}). No obstante, la perpetuación en el tiempo de los mecanismos ofensivos propios de la inflamación producirían modificaciones anatómicas y funcionales en los termorreceptores de frío constatando, como cambio más evidente, la presencia de un incremento en las corrientes de Na⁺ y disminución de las de K⁺ en sus canales de membrana (^{23,35,207}). De esta forma se produce una despolarización mantenida en condiciones basales, que podría ser la responsable del discomfort posterior y mantenido que padecen estos pacientes (⁶⁸). Además, se especula que la inflamación cronicada, podría desplazar el umbral de respuesta de los termorreceptores de frío hacia niveles más elevados de temperatura (^{23,38}), lo cual podría estar sucediendo en los pacientes con SS en los que hemos detectado un incremento en su temperatura corneal con respecto a los sanos al igual que un mayor discomfort ocular.

Por otra parte, los nociceptores polimodales también contribuyen a la termorregulación de la superficie corneal. Tras su activación por factores inflamatorios, estimulan la secreción lagrimal así como el reflejo del parpadeo, aunque en menor medida que los termorreceptores de frío y aparecen implicados en situaciones agudas de discomfort ocular(^{23,35,209}). (Figura 61).

Hipótesis fisiopatológica de la termorregulación de la superficie ocular en pacientes con SS.

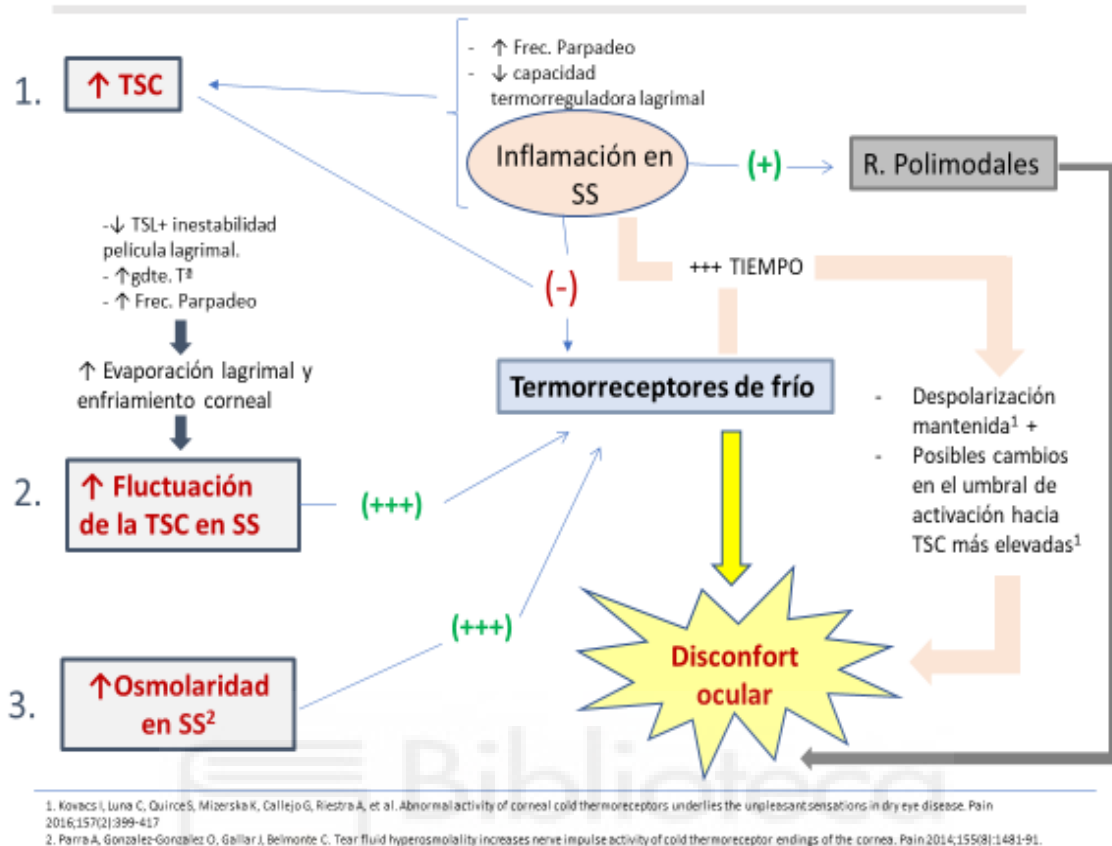


Figura 52. Hipótesis fisiopatológica de la termorregulación de la superficie corneal en pacientes SS.

NOTA

La sección D (Estimulación corneal mediante co en la inducción de la secreción lagrimal refleja) está protegida mediante acuerdo de confidencialidad, según a la decisión de la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández fechado el 16 de Enero de 2019.

VI. CONCLUSIONES

1. La termografía por infrarrojos es un método útil, no invasivo, objetivo y reproducible de medir de forma dinámica la temperatura de la superficie corneal.
2. Con respecto a los sujetos controles, los pacientes con SS presentan una más elevada temperatura de la superficie corneal, así como un más rápido enfriamiento durante el intervalo entre parpadeos.
3. El incremento de temperatura observado en pacientes con SS es atribuible a la presencia de inflamación en el segmento anterior del ojo y al incremento en la frecuencia de parpadeo, que favorecen el calentamiento de la superficie del tejido avascular corneal en estos pacientes. Estos mismos factores, junto a la baja estabilidad de la película lagrimal precorneal y un mayor gradiente de temperatura entre el medio ambiente y la córnea, y entre el limbo y el centro de la córnea, explicarían también la más pronunciada fluctuación de temperatura corneal observada en los pacientes con SS.
4. En sujetos normales, los valores de temperatura corneal presumiblemente se codifican con fidelidad por la actividad en los termorreceptores corneales de frío, de manera que los aumentos de temperatura tenderían a disminuir su frecuencia de disparo y, consecutivamente, la sensación de discomfort ocular. Sin embargo, la coexistencia de temperaturas corneales altas y de un mayor discomfort en los pacientes SS sugiere que dicha sensación se deba a una actividad aumentada y anómala de los termorreceptores de frío en estos pacientes, similar a la observada en animales con ojo seco experimental crónico.
5. El envejecimiento va acompañado de un descenso de la temperatura de la superficie ocular a razón de $-0,025^{\circ}\text{C}/\text{año}$, que podría atribuirse a la progresiva disminución del metabolismo basal con la edad.

6. Se describe un nuevo dispositivo que libera CO₂ sobre la superficie ocular, evocando volúmenes máximos de secreción lagrimal refleja en sujetos normales. Este dispositivo estimulador con CO₂ permite disponer de un procedimiento sencillo, objetivo, reproducible y de bajo riesgo, para estimular controladamente y evaluar la secreción lagrimal refleja.
7. La elevada tasa de secreción lagrimal refleja obtenida en sujetos control es causada por una estimulación total de los nociceptores polimodales corneales, y puede interpretarse como una medida de la máxima capacidad secretora de las glándulas lacrimales en respuesta a la activación refleja de su inervación parasimpática como consecuencia de la actividad sensorial trigeminal.
8. En pacientes con ojo seco, el flujo de secreción lagrimal refleja que se evoca por la estimulación corneal con CO₂, aparece significativamente reducido en comparación con el de la población normal. Los datos del flujo de secreción lagrimal refleja obtenidos con este procedimiento pueden servir para un diagnóstico más preciso tanto de los pacientes con SS, como de pacientes con ojo seco subclínico, y abren la posibilidad de una mejor planificación del tratamiento sistémico a instaurar, al permitir la identificación objetiva de los pacientes susceptibles de beneficiarse del tratamiento con secretagogos de las glándulas lagrimales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Viso E, Rodríguez-Ares MT, Gude F. Prevalence of and associated factors for dry eye in a Spanish adult population (the Salnes Eye Study). *Ophthalmic Epidemiol* 2009 Jan-Feb;16(1):15-21.
- 2 Duke-Elder S y Wybar KC. Cornea. En: Tje anatomy of the visual system. *System of Ophthalmology*, Vol II. S. Duke-Elder ed., Henry Kimpton, 1961:95-131.
- 3 Leonard Levin, Siv Nilsson, James Ver Hoeve, Samuel Wu, Paul Kaufman, Albert Alm. *Adler's Physiology of the Eye*. 11th Edition. Elsevier.
- 4 Belmonte C, Giraldez F. Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol* 1981; 321:355-68.
- 5 Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I. Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. *J Physiol* 1991; 437:709-25.
- 6 Gallar J, Pozo MA, Tuckett RP, Belmonte C. Response of sensory units with unmyelinated fibres to mechanical, thermal and chemical stimulation of the cat's cornea. *J Physiol* 1993; 468:609-22.
- 7 Chen X, Gallar J, Pozo MA, Baeza M, Belmonte C. CO₂ stimulation of the cornea: a comparison between human sensation and nerve activity in polymodal nociceptive afferents of the cat. *Eur J Neurosci* 1995;7(6):1154-63.
- 8 Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Sensory experiences in humans and single unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J Physiol* 2001;534(Pt. 2):511-25.
- 9 Knupp C., Pinateli C., et al. The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Advances in protein chemistry and structural biology* 2009; 78:25-49.
- 10 Delmonte D., W and T. Kim. Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract and Refract Surg* 2011; 37(3):588-598.
- 11 Marfurt C.F. The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *Anat Rec* 1981;201(1):105-118.
- 12 De Felipe C., Gonzalez G.G., Gallar J., Belmonte C. Quantification and immunocytochemical characteristics of trigeminal ganglion neurons projecting to the cornea: effect of corneal wounding. *Eur J Pain* 1999; 3:31-39.
- 13 Zander & Weddel G. Observations of the innervation of the cornea. 1951. *J Anat* 1951;85:68-105.
- 14 Lawrenson JG, Ruskell GL. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat.* 1991; 177:75-84.
- 15 Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vils Sci* 1996; 37:475-488.
- 16 Rozsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* 1982; 14:105-120.
- 17 Simková M, Prouza A. Study of the innervation of the cornea after different physical noxious effects I. Analysis of the problems and methods. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 1982; 28:3-24.
- 18 Simková M. Study of the innervation of the cornea after different physical noxious effects II. Effects of ionizing radiation. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 1982; 28:25-57.

-
- 19 Simková M. Study of the innervation of the cornea after different physical noxious effects III. Comparison of the effect of ionizing radiation with mechanical and thermal factors. *Acta Univ Carol Med(Praha)* 1982; 28:59-86.
 - 20 Belmonte C., Aracil A., Acosta MC, Luna C, Gallar J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res* 2004; 78:513-525.
 - 21 Belmonte C., Aracil A., Acosta MC, Luna C, Gallar J. Nerves and sensation from the eye surface. *The Ocular Surface* 2004;2:248-253.
 - 22 Belmonte C., García-Hirschfeld J, Gallar J. Neurobiology of ocular pain. *Prog Ret EYE Res* 1997; 16:117-156.
 - 23 Belmonte C., Nichols J., Cox S. et al. TFOS DEWS II pain and sensation report. *The Ocular Surface* 15 (2017):404-437.
 - 24 Belmonte J, Belmonte J, Gallar J. Exploración de la sensibilidad ocular: estesiometría. Métodos diagnósticos en segmento anterior. Monografía SECOIR. Alfredo Castillo. 2011 SECOIR (1ª Edición) Mac-Line S.L.
 - 25 Chen X, Gallar J, Belmonte C. Reduction by antiinflammatory drugs of the response of corneal sensory nerve fibers to chemical irritation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38(10):1944-53.
 - 26 MacIver MB, Tanelian DL. Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurosci* 1993;13(10):4511-24.
 - 27 Bron R, Wood RJ, Brock JA, Ivanusic JJ. Piezo2 expression in corneal afferent neurons. *J Comp Neurol* 2014;522(13):2967-79.
 - 28 Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, et al. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010;330(6000):55-60.
 - 29 Tanelian DL, Beuerman RW. Responses of rabbit corneal nociceptors to mechanical and thermal stimulation. *Exp Neurol* 1984;84(1):165-78.
 - 30 Carr RW, Pianova S, Fernandez J, Fallon JB, Belmonte C, Brock JA. Effects of heating and cooling on nerve terminal impulses recorded from cold-sensitive receptors in the guinea-pig cornea. *J Gen Physiol* 2003;121(5):427-39.
 - 31 Brock J, Acosta MC, Al Abed A, Pianova S, Belmonte C. Barium ions inhibit the dynamic response of guinea-pig corneal cold receptors to heating but not to cooling. *J Physiol* 2006;575(Pt 2):573-81.
 - 32 Parra A, Gonzalez-Gonzalez O, Gallar J, Belmonte C. Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain* 2014;155(8):1481-91.
 - 33 Kurose M, Meng ID. Corneal dry-responsive neurons in the spinal trigeminal nucleus respond to innocuous cooling in the rat. *J Neurophysiol* 2013;109(10):2517-22.
 - 34 Talisia Quallo, Nisha Vastani¹, Elisabeth Horridge¹, Clive Gentry, Andres Parra, Sian Moss, Felix Viana, Carlos Belmonte, David A. Andersson & Stuart Bevan. TRPM8 is a neuronal osmosensor that regulates eye blinking in mice. *Nature communications* 2015:1-12.
 - 35 Gonzalez-Gonzalez O, Bech F, Gallar J, Merayo-Llodes J, Belmonte C. Functional properties of sensory nerve terminals of the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(1):404-15.
 - 36 Hirata H, Meng ID. Cold-sensitive corneal afferents respond to a variety of ocular stimuli central to tear production: implications for dry eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(8):3969-76.

-
- 37 Parra A, Madrid R, Echevarria D, del Olmo S, Morenilla-Palao C, Acosta MC, et al. Ocular surface wetness is regulated by TRPM8-dependent cold thermoreceptors of the cornea. *Nat Med* 2010;16(12):1396-9.
- 38 Kovacs I, Luna C, Quirce S, Mizerska K, Callejo G, Riestra A, et al. Abnormal activity of corneal cold thermoreceptors underlies the unpleasant sensations in dry eye disease. *Pain* 2016;157(2):399-417
- 39 Hirata H, Oshinsky ML. Ocular dryness excites two classes of corneal afferent neurons implicated in basal tearing in rats: involvement of transient receptor potential channels. *J Neurophysiol* 2012;107(4):1199-209.
- 40 Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999; 145:769-82.
- 41 Wei ZG, Sun TT, Lavker RM. Rabbit conjunctival and corneal epithelial cells belong to two separate lineages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:523-33.
- 42 Wei ZG, Wu RL, Lavker RM, Sun TT. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:1814-28.
- 43 Stewart RM, Sheridan CM, Hiscott PS, Czanner G, Kaye SB. Human conjunctival stem cells are predominantly located in the medial canthal and inferior Forniceal areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56:2021-30.
- 44 Dartt DA. Regulation of mucin and fluid secretion by conjunctival epithelial cells. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21:555-76.
- 45 Schmidt TA, Sullivan DA, Knop E, Richards SM, Knop N, Liu S, et al. Transcription, translation, and function of lubricin, a boundary lubricant, at the ocular surface. *JAMA Ophthalmol* 2013; 131:766-76.
- 46 Argueso P, Gipson IK. Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function. *Exp Eye Res* 2001; 73:281-9.
- 47 Sumiyoshi M, Ricciuto J, Tisdale A, Gipson IK, Mantelli F, Argueso P. Antiadhesive character of mucin O-glycans at the apical surface of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:197-203.
- 48 Blalock TD, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Heimer SR, Gilmore MS, Ramesh V, et al. Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48:4509-18.
- 49 Ricciuto J, Heimer SR, Gilmore MS, Argueso P. Cell surface O-glycans limit *Staphylococcus aureus* adherence to corneal epithelial cells. *Infect Immun* 2008; 76:5215-20.
- 50 Marfurt CF, Jones MA, Thrasher K. Parasympathetic innervation of the rat cornea. *Exp Eye Res* 1998;66(4):437-48.
- 51 Candia OA, Shi XP, Alvarez LJ. Reduction in water permeability of the rabbit conjunctival epithelium by hypotonicity. *Exp Eye Res* 1998;66(5):615-24.
- 52 Jumblatt MM, McKenzie RW, Jumblatt JE. MUC5AC mucin is a component of the human precorneal tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(1):43-9.
- 53 Ellingham RB, Berry M, Stevenson D, Corfield AP. Secreted human conjunctival mucus contains MUC5AC glycoforms. *Glycobiology* 1999;9(11):1181-9.
- 54 Ríos JD, Zoukhri D, Rawe IM, Hodges RR, Zieske JD, Dartt DA. Immunolocalization of muscarinic and VIP receptor subtypes and their role in stimulating goblet cell secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(6):1102-11.

-
- 55 Li D, Jiao J, Shatos MA, Hodges RR, Dartt DA. Effect of VIP on intracellular [Ca²⁺]_i, extracellular regulated kinase 1/2, and secretion in cultured rat conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:2872-84.
- 56 Morrison M, Allen PZ. Lactoperoxidase: identification and isolation from Harderian and lacrimal glands. *Science* 1966;152(3729):1626-8.
- 57 Allen PZ, Morrison M. Lactoperoxidase. VI. Immunochemical studies on lactoperoxidase from the milk of several species. *Arch Biochem Biophys* 1966;113(3):540-7.
- 58 Broekhuysen RM. Lactoferrin and the protective function of the lacrimal fluid. *Ophthalmologica* 1976;173(3e4):268-70.
- 59 Franklin RM, Prendergast RA, Silverstein AM. Secretory immune system of rabbit ocular adnexa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979;18(10):1093-6.
- 60 Rennie IG, Parsons MA. Lysozyme distribution in human lacrimal glands and other ocular adnexa. *Arch Ophthalmol* 1981;99(10):1850-3.
- 61 Delaire A, Lassagne H, Gachon AM. New members of the lipocalin family in human tear fluid. *Exp Eye Res* 1992;55(4):645-7.
- 62 Dartt DA. Neural regulation of lacrimal gland secretory processes: relevance in dry eye diseases. *Prog Retin Eye Res* 2009; 28:155-77.
- 63 Dartt DA. Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion: a review. *Curr Eye Res* 1989; 8:619-36.
- 64 Mircheff AK. Lacrimal gland fluid and electrolyte secretion: a review. *Curr Eye Res* 1989; 8:607-17.
- 65 Mircheff AK. Water and electrolyte secretion and fluid modification. In: Albert D, Jakobiec F, editors. *Principles and Practice of Ophthalmology: Basic Sciences*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1994. p. 466-72.
- 66 Wieczorek R, Jakobiec FA, Sacks EH, Knowles DM. The immunoarchitecture of the normal human lacrimal gland. Relevancy for understanding pathologic conditions. *Ophthalmology* 1988; 95:100-9.
- 67 Begley C, Simpson T, Liu H, Salvo E, Wu Z, Bradley A, et al. Quantitative analysis of tear film fluorescence and discomfort during tear film instability and thinning. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(4):2645-53.
- 68 Nikkinen A, Lehtosalo JI, Uusitalo H, Palkama A, Panula P. The lacrimal glands of the rat and the Guinea pig are innervated by nerve fibers containing immunoreactivities for substance P and vasoactive intestinal polypeptide. *Histochemistry* 1984;81(1):23-7.
- 69 Dartt DA, Baker AK, Vaillant C, Rose PE. Vasoactive intestinal polypeptide stimulation of protein secretion from rat lacrimal gland acini. *Am J Physiol* 1984;247: 502-9.
- 70 Sibony PA, Walcott B, McKeon C, Jakobiec FA. Vasoactive intestinal polypeptide and the innervation of the human lacrimal gland. *Arch Ophthalmol* 1988;106(8):1085-8.
- 71 Matsumoto Y, Tanabe T, Ueda S, Kawata M. Immunohistochemical and enzyme histochemical studies of peptidergic, aminergic and cholinergic innervation of the lacrimal gland of the monkey (*Macaca fuscata*). *J Auton Nerv Syst* 1992;37(3):207-14.
- 72 Seifert P, Spitznas M. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of the human eyelid glands. *Exp Eye Res* 1999;68(6):685-92.
- 73 Ríos JD, Horikawa Y, Chen LL, Kublin CL, Hodges RR, Dartt DA, et al. Agedependent alterations in mouse exorbital lacrimal gland structure, innervation and secretory response. *Exp Eye Res* 2005;80(4):477-91.

-
- 74 Botelho SY, Martinez EV, Pholpramool C, Prooyen HC, Janssen JT, De Palau A. Modification of stimulated lacrimal gland flow by sympathetic nerve impulses in rabbit. *Am J Physiol* 1976;230(1):80-4
- 75 Ding C, Walcott B, Keyser KT. Sympathetic neural control of the mouse lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(4):1513-20.
- 76 Parod RJ, Putney Jr JW. An alpha-adrenergic receptor mechanism controlling potassium permeability in the rat lacrimal gland acinar cell. *J Physiol* 1978; 281:359-69
- 77 Parod RJ, Putney Jr JW. Stimulus-permeability coupling in rat lacrimal gland. *Am J Physiol* 1980;239(2): 106-13.
- 78 Ubels JL, Gipson IK, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Van Dyken RE, Hatton MP. Gene expression in human accessory lacrimal glands of Wolfring. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(11):6738-47.
- 79 Seifert P, Spitznas M. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of the human eyelid glands. *Exp Eye Res* 1999;68(6):685-92.
- 80 Seifert P, Spitznas M. Immunocytochemical and ultrastructural evaluation of the distribution of nervous tissue and neuropeptides in the meibomian gland. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234(10):648-56
- 81 Montagna William, Ellis Richard A. Cholinergic innervation of the meibomian glands. *Anat Rec* 1959;135(2):121-7.
- 82 Kam WR, Sullivan DA. Neurotransmitter influence on human meibomian gland epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:8543-8.
- 83 Sullivan DA, Liu Y, Kam WR, Ding J, Green KM, Shaffer SA, et al. Serum-induced differentiation of human meibomian gland epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55:3866-77.
- 84 Ding J, Liu Y, Sullivan DA. Effects of insulin and high glucose on human meibomian gland epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56:7814-20.
- 85 Ding J, Sullivan DA. The effects of insulin-like growth factor 1 and growth hormone on human meibomian gland epithelial cells. *JAMA Ophthalmol* 2014; 132:593-9.
- 86 Gidfar S, Afsharkhamseh N, Sanjari S, Djalilian AR. Notch signaling in meibomian gland epithelial cell differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57:859-65.
- 87 Khandelwal P, Liu S, Sullivan DA. Androgen regulation of gene expression in human meibomian gland and conjunctival epithelial cells. *Mol Vis* 2012; 18:1055-67
- 88 Liu S, Hatton MP, Khandelwal P, Sullivan DA. Culture, immortalization, and characterization of human meibomian gland epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:3993-4005.
- 89 King-Smith PE, Fink BA, Fogt N, Nichols KK, Hill RM, Wilson GS. The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3348-59.
- 90 Doane MG. Dynamics of the human blink. *Ber Zusammenkunft Dtsch Ophthalmol Ges* 1979:13-7.
- 91 Yokoi N, Kinoshita S, Bron AJ, Tiffany JM, Sugita J, Inatomi T. Tear meniscus changes during cotton thread and Schirmer testing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3748-53.
- 92 Mainstone JC, Bruce AS, Golding TR. Tear meniscus measurement in the diagnosis of dry eye. *Curr Eye Res* 1996; 15:653-61.
- 93 Yokoi N, Bron AJ, Tiffany JM, Maruyama K, Komuro A, Kinoshita S. Relationship between tear volume and tear meniscus curvature. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:1265-9.
- 94 Mishima S, Gasset A, Klyce Jr SD, Baum JL. Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol* 1966; 5:264-76.

-
- 95 Shen M, Li J, Wang J, Ma H, Cai C, Tao A, et al. Upper and lower tear menisci in the diagnosis of dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:2722-6.
- 96 Mishima S. Some physiological aspects of the precorneal tear film. *Arch Ophthalmol* 1965; 73:233-41.
- 97 Tomlinson A, Doane MG, McFadyen A. Inputs and outputs of the lacrimal system: review of production and evaporative loss. *Ocul Surf* 2009; 7:186-98.
- 98 Peng CC, Cerretani C, Li Y, Bowers S, Shahsavarani S, Lin MC, et al. Flow evaporimeter to assess evaporative resistance of human tear-film lipid layer. *Ind Eng Chem Res* 2014; 53:18130-9.
- 99 Bron AJ, Tiffany JM, Gouveia SM, Yokoi N, Voon LW. Functional aspects of the tear film lipid layer. *Exp Eye Res* 2004; 78:347-60.
- 100 Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:1938-78.
- 101 Khanal S, Tomlinson A, Diaper CJ. Tear physiology of aqueous deficiency and evaporative dry eye. *Optom Vis Sci* 2009; 86:1235-40.
- 102 Mathers WD. Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye. *Ophthalmology* 1993; 100:347-51.
- 103 Shimazaki J, Sakata M, Tsubota K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:1266-70.
- 104 Mathers WD, Lane JA. Meibomian gland lipids, evaporation, and tear film stability. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438:349-60.
- 105 Khanal S, Tomlinson A, McFadyen A, Diaper C, Ramaesh K. Dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:1407-14.
- 106 Rolando M, Refojo MF, Kenyon KR. Increased tear evaporation in eyes with keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:557-8.
- 107 Mathers WD, Daley TE. Tear flow and evaporation in patients with and without dry eye. *Ophthalmology* 1996; 103:664-9.
- 108 Iwata S, Lemp MA, Holly FJ, Dohlman CH. Evaporation rate of water from the precorneal tear film and cornea in the rabbit. *Invest Ophthalmol* 1969; 8:613-9.
- 109 Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, et al. In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics* 2012; 75:3877-85.
- 110 Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L, Nichols JJ. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis* 2008; 14:456-70.
- 111 Argueso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjogren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:1004-11.
- 112 Bron AJ, Tiffany JM. The contribution of meibomian disease to dry eye. *Ocul Surf* 2004; 2:149-65.
- 113 Tiffany JM. The lipid secretion of the meibomian glands. *Adv Lipid Res* 1987; 22:1-62.
- 114 McCulley JP, Shine W. A compositional based model for the tear film lipid layer. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997; 95:79e88. discussion 88-93.
- 115 Butovich IA. On the lipid composition of human meibum and tears: comparative analysis of nonpolar lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:3779-89.

-
- 116 Green-Church KB, Butovich I, Willcox M, Borchman D, Paulsen F, Barabino S, et al. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on tear film lipids and lipid-protein interactions in health and disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1979-93.
- 117 Millar TJ. Elucidate the contribution of proteins to tears. A challenge for researchers. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2006;81:187-90.
- 118 Cher I. A new look at lubrication of the ocular surface: fluid mechanics behind the blinking eyelids. *Ocul Surf* 2008; 6:79-86.
- 119 Yokoi N, Bron AJ, Georgiev GA. The precorneal tear film as a fluid shell: the effect of blinking and saccades on tear film distribution and dynamics. *Ocul Surf* 2014; 12:252-66.
- 120 Holly FJ, Lemp MA. Wettability and wetting of corneal epithelium. *Exp Eye Res* 1971; 11:239-50.
- 121 Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 2004; 78:379-88.
- 122 Norn MS. Vital staining of the canaliculus lacrimalis and the palpebral border (Marx' line). *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1966; 44:948-59.
- 123 Norn MS. Dead, degenerate, and living cells in conjunctival fluid and mucous thread. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1969; 47:1102-15.
- 124 Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004; 78:409-16.
- 125 Acosta MC, Tan ME, Belmonte C, Gallar J. Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(9):2063-7.
- 126 Adolfo Aracil, Acosta MC., Gallar J. Homeostatic control of the corneal surface temperature is impaired in aged mice lacking the expression of TRPM8. Póster presentado en el Congreso sociedad española de neurociencias; 2017; Alicante. España.
- 127 Jennifer P. Craig, Kelly K. Nichols, Esen K. Akpek. Et al. TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *The Ocular Surface* 15 (2017) 276-283.
- 128 Fiona Stapleton, Monica Alves, Vatinee Y. Bunya, et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *The Ocular Surface* 15 (2017) 334-365.
131. Report of the international dry eye workshop (DEWS). *Ocul Surf* 2007;5:65-204.
- 130 Shimazaki J, Goto E, Ono M, Shimmura S, Tsubota K. Meibomian gland dysfunction in patients with Sjogren syndrome. *Ophthalmology* 1998; 105:1485-8.
- 131 Shimazaki J, Sakata M, Tsubota K. Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:1266-70.
- 132 Krenzer KL, Cermak JM, Tolls DB, Papas AS, Dana MR, Sullivan DA. Comparative signs and symptoms of dry eye in primary and secondary Sjögren's syndrome and meibomian gland disease. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2000;40. S2864 (Abstract).
- 133 Anthony J. Bron, Cintia S. de Paiva, Sunil K. Chauhan, et al. TFOS DEWS II pathophysiology report. *The Ocular Surface* 15 (2017) 438-510.
- 134 Rosenthal P, Borsook D. The corneal pain system. Part I: the missing piece of the dry eye puzzle. *Ocul Surf* 2012;10(1):2-14.
- 135 Rosenthal P, Baran I, Jacobs DS. Corneal pain without stain: ¿is it real? *Ocul Surf* 2009;7(1):28-40.
- 136 Yeh S, Song XJ, Farley W, Li DQ, Stern ME, Pflugfelder SC. Apoptosis of ocular surface cells in experimentally induced dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:124-9.

-
- 137 Brignole F, Pisella PJ, Goldschild M, De Saint Jean M, Goguel A, Baudouin C. Flow cytometric analysis of inflammatory markers in conjunctival epithelial cells of patients with dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1356-63.
- 138 Baudouin C. A new aproche for better comprehension of diseases of the ocular surface. *J Fr Ophtalmol* 2007; 30:239-46.
- 139 Thompson N, Isenberg DA, Jury EC, Ciurtin C. Exploring BAFF: its expression, receptors and contribution to the immunopathogenesis of Sjogren's syndrome. *Rheumatol Oxf* 2016; 55:1548-55.
- 140 Nocturne G, Mariette X. Advances in understanding the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9:544-56.
- 141 Seoane-Mato D, et al. Prevalencia de enfermedades reumáticas en población adulta en España (estudio EPISER 2016). *Objetivos y metodología. Reumatol Clin* 2017.
- 142 Pillemer SR, Matteson EL, Jacobsson LT, Martens PB, Melton 3rd, O'Fallon WM, et al. Incidence of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001;76(6):593-9.
- 143 Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8.
- 144 Vidya Sankar, Jenene L. Noll, Michael T. Brennan. Diagnosis of Sjögren's Syndrome American-European and the American College of Rheumatology Classification Criteria *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am* 26 (2014) 13–22.
- 145 Voulgarelis M, Tzioufas AG. Pathogenetic mechanisms in the initiation and perpetuation of Sjogren's syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6:529-37..
- 146 Whitcher JP, Shiboski CH, Shiboski SC, Heidenreich AM, Kitagawa K, Zhang S, et al. A simplified quantitative method for assessing keratoconjunctivitis sicca from the Sjögren's Syndrome International Registry. *Am J Ophthalmol* 2010;149(3):405-15.
- 147 Tsubota K, Xu KP, Fujihara T, Katagiri S, Takeuchi T. Decreased reflex tearing is associated with lymphocytic infiltration in lacrimal glands. *J Rheumatol* 1996; 23:313-20.
- 148 Bron AJ, Yokoi N, Gafney E, Tiffany JM. Predicted phenotypes of dry eye: proposed consequences of its natural history. *Ocul Surf* 2009; 7:78-92.
- 149 Argueso P, Balaram M, Spurr-Michaud S, Keutmann HT, Dana MR, Gipson IK. Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjogren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:1004-11.
- 150 Aguilar AJ, Fonseca L, Croxatto JO. Sjogren's syndrome: a comparative study of impression cytology of the conjunctiva and buccal mucosa, and salivary gland biopsy. *Cornea* 1991; 10:203-6.
- 151 Raphael M, Bellefqih S, Piette JC, Le Hoang P, Debre P, Chomette G. Conjunctival biopsy in Sjogren's syndrome: correlations between histological and immunohistochemical features. *Histopathology* 1988; 13:191-202.
- 152 Kapsogeorgou EK, Christodoulou MI, Panagiotakos DB, Paikos S, Tassidou A, Tzioufas AG, et al. Minor salivary gland inflammatory lesions in Sjogren syndrome: do they evolve? *J Rheumatol* 2013; 40:1566-71.
- 153 Moutsopoulos HM. Sjogren's syndrome: a forty-year scientific journey. *J Autoimmun* 2014; 51:1-9.

-
- 154 Bombardieri M, Barone F, Humby F, Kelly S, McGurk M, Morgan P, et al. Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjogren's syndrome. *J Immunol* 2007; 179:4929-38.
- 155 Theander E, Vasaitis L, Baecklund E, Nordmark G, Warfvinge G, Liedholm R, et al. Lymphoid organisation in labial salivary gland biopsies is a possible predictor for the development of malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:1363-8.
- 156 Triantafyllopoulou A, Moutsopoulos HM. Autoimmunity and coxsackievirus infection in primary Sjogren's syndrome. *Ann N. Y Acad Sci* 2005; 1050:389-96.
- 157 Sherry, David (2011). «Thermoscopes, thermometers, and the foundations of measurement». *Studies in History and Philosophy of Science* 42: 509-524.
- 158 Valleriani, Matteo (3 de junio de 2010). *Galileo Engineer*. Springer Science and Business Media.
- 159 Court, Arnold (12 de mayo de 1967). Concerning an Important Invention.
- 160 Ring, E.F.J., 1995, The history of thermal imaging. In: K. Ammer and E.F.J. Ring (Eds) *The Thermal Image in Medicine & Biology* (Vienna: Uhlen Verlag), pp. 13 – 20.
- 161 Hardy J. The radiation of heat from the human body. *J Clin Invest* 1934; 13:593–604,605–514,515–524.
- 162 Purslow C., Wolffsohn J. Ocular surface temperature. *Eye&Contact Lens* 2005; 31(3):117-123.
- 163 Holmberg A. The temperature of the eye during the application of hot packs, and after milk injections. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1952;30: 347–364.
- 164 Mapstone R. Measurement of corneal temperature. *Exp Eye Res* 1968; 7:237–243.
- 165 Mapstone R. Anterior segment hyperaemia and ischaemia. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1970; 90:329 –335.
- 166 Mapstone R. Determinants of ocular temperature. *Br J Ophthalmol* 1968; 52:729 –741.
- 167 Mapstone R. Thermometry and the eye. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK* 1969; 88:693–699.
- 168 Mapstone R. Normal thermal patterns in cornea and periorbital skin. *Br J Ophthalmol* 1968c; 52:818–827.
- 171 Mapstone R. Corneal thermal patterns in anterior uveitis. *Br J Ophthalmol* 1968d; 52:917–921.
- 170 Mapstone R. Ocular thermography. *Br J Ophthalmol* 1970; 54:751– 754.
- 171 Morgan PB, Soh MP, Efron N, et al. Potential applications of ocular thermography. *Optom Vis Sci* 1993; 70:568 –576.
- 172 Efron N, Young G, Brennan N. Ocular surface temperature. *Curr Eye Res* 1989; 8:901–906.
- 173 Craig J, Singh I., Tomlinson A. et al. The role of tear physiology in ocular surface temperature. *Eye* (2000) 14,635-641
- 174 Abreau K., Callan C., Kottaiyan R. et al. Temperatures of the ocular surface, lid and periorbital regions of sjögren´s evaporative, and aqueous-deficient dry eyes relative to normals. *The ocular surface* 2016 (14):64-72
- 175 Morgan PB. *Ocular Thermography in Health and Disease*. Manchester, University of Manchester, 1994.
- 176 Schwartz B. Environmental temperature and the ocular temperature gradient. *Arch Ophthalmol* 1965; 74:237–243.

-
- 177 Kocak I, Orgul S, Flammer J. Variability in the measurement of corneal temperature using a non-contact infrared thermometer. *Ophthalmologica* 1999; 213:345–349.
- 178 Schwartz B, Packer S, Himmelstein SC. Ocular thermoradiometry. *Invest Ophthalmol* 1968; 7:231.
- 179 Kessel L., Johnson L., Arvidsson H., Larsen M., The relationship between body and ambient temperature and corneal temperature. *IOVS* 2010; 51:6593-97.
- 180 Morgan PB., Poey M., Efron N. Corneal surface temperature decreases with age. *Contact Lens and Anterior Eye* 1999;22:11-13.
- 181 Isenberg S, Green B. Changes in conjunctival oxygen tension and temperature with advancing age. *Cri Care Med* 1985;13:682-5.
- 184 Acharya R., Chang G., Jian T., Kagathi M. Analysis of normal human eye with different age groups using infrared images. *J Med Syst* 2009;33:207-213
- 183 Horven I. Corneal temperature in normal subjects and arterial occlusive disease. *Acta Ophthalmol* 1975;53:863-74.
- 184 Morgan PB, Tullo AB, Efron N. Infrared thermography of the tear film in dry eye. *Eye* 1995;9(5): 615-618.
- 185 Mori A., Oguchi Y, Okusawa Y, Onon M, Fujishima H, Tsubota K. Use of high-speed, high-resolution thermography to evaluate the tear film layer. *Am J Ophthalmol* 1997;124:729-35.
- 186 Fujishima H, Toda I, Yamada M, Sato N, Tsubota K. Corneal temperature in patients with dry eye evaluated by infrared radiation thermometry. *Br J Ophthalmol* 1996;80(1):29-32.
- 187 Kamao T, Yamaguchi M, Kawasaki S et al. Screening for dry eye with newly developed ocular surface thermographer. *Am J Ophthalmol* 2011;151:782-791.
- 188 Azharuddin M, Bera K, Datta H, Dasgupta A. Thermal fluctuation based study of aqueous deficient dry eyes by non-invasive thermal imaging. *Experimental Eye Research* 120(2014):97-102.
- 189 Versura P., Giannaccare G., Fresina M., Campos E. Subjective Discomfort Symptoms Are Related to Low Corneal Temperature in Patients With Evaporative Dry Eye. *Cornea* 2015;34:1079–1085.
- 190 Mikesell GW, Jr. Corneal temperatures-a study of normal and laser-injured corneas in the dutch belted rabbit. *Am J Optom Physiol Opt* 1978;55:108-15.
- 191 Efron N, Brennan NA, Hore J et al. Temperature of the hyperemic bulbar conjunctiva. *Curr Eye Res* 1988;7:615-8.
- 192 Prause JU, Norn M. Relation between blink frequency and break-up time. *Acta Ophthalmol* 1987;65:19-22
- 193 Giraldez MJ, Naroo S.A., Garcia Resua C. A preliminary investigation into the relationship between ocular surface temperature and lipid layer thickness. *Contact Lens&Anterior Eye* 32(2009) 177-180.
- 194 Gilbard JP, Farris RL. Ocular surface drying and tear film osmolarity in thyroid eye disease. *Acta Ophthalmol* 1983;61:108-116.
- 195 Scott JA. A finite element model of heat transport in the human eye. *Phys Med Biol* 1988;33:227-41.
- 196 Miller W., Millis E. Estimating evaporation from Utah's Great Salt Lake using thermal infrared satellite imagery. *J Am Water Resources Assoc* 1989;25:541-50.
- 197 Kalma JD., Jupp DLB. Estimating evaporation from pasture using infrared thermometry: evaluation of a one-layer resistance model. *Ar Forest Meteorol* 1990;51:223-46.

-
- 198 Mathers WD, Binarao G, Petroll M. Ocular water evaporation and the dry eye: a new measuring device. *Cornea* 1993;12:335-40.
- 199 Rolando M, Rejfo MF, Kenyon KR. Increased tear evaporation in eyes with keratoconjunctivitis sicca. *Arch ophthalmol* 1983;101:557-8.
- 200 Li W., Graham A., Selvin S, Lin M. Ocular surface cooling corresponds to tear film thinning and breakup. *Optom Vis Sci* 2015;92:248--256.
- 201 Nakamori K, Odawara M, Nakajima R, Mizutani T, Tsubota K. Blinking is controlled primarily by ocular surface conditions. *Am J Ophthalmol* 1997;124:24-30.
- 202 Alió J, Padron M. influence of age on the temperature of the anterior segment of the eye. *Ophthalmic Res* 1982;14:153-9.
- 203 López-Miguel A, Tesón M, Martín-Montañez V, Enríquez-de-Salamanca A, Stern ME, González-García MJ, Calonge M. Clinical and Molecular Inflammatory Response in Sjögren Syndrome-Associated Dry Eye Patients Under Desiccating Stress. *Am J Ophthalmol*. 2016 Jan;161:133-41.e1-2.
- 204 Utine CA1, Bıçakçıgil M, Yavuz S, Çiftçi F. Tear osmolarity measurements in dry eye related to primary Sjögren's syndrome. *Curr Eye Res*. 2011 Aug;36(8):683-90.
- 205 Acosta MA., Luna C., Quirce S., Belmonte C., Gallar J. Changes in sensory activity of ocular surface sensory nerves during allergic keratoconjunctivitis. *Pain* 2013;154:2353-2362.
- 206 Zhang X., Mak S, Li L, Parra A, Delinger B, Belmonte C, McNaughton PA. Direct inhibition of the cold-activated TRPM8 ion channel by Gαq. *Nat Cell Biol*. 2012;14:851-8.
- 207 Kurose M, Meng ID. Dry eye modifies the thermal and menthol responses in rat corneal primary afferent cool cells. *J Neurophysiol* 2013;110:495-504.

IX. ANEXOS:

ANEXO 1.

HOJA DE INFORMACIÓN A PARTICIPANTES

Título del estudio: Bases fisiopatológicas del ojo seco: mecanismos de membrana implicados en la modificación de la actividad de los nervios oculares, las sensaciones anormales y la reducción de la tasa de lagrimación basal (Participación de la inervación sensorial del ojo en el control del parpadeo y la lagrimación, y su modificación con la edad).

Código del estudio: IN-JGa-002-11

Introducción

A usted se le pide que participe en un estudio de investigación básica patrocinado por el Ministerio de Ciencia e Innovación. En esta hoja de información describe el estudio, para ayudarle a decidir si desea participar en el mismo. Por favor plantee al investigador cualquier pregunta o cuestión que no entienda de esta hoja de información. No firme el consentimiento informado posterior a menos que esté satisfecho con las respuestas a sus preguntas y desee participar en este estudio.

Objetivos y desarrollo del estudio

A usted se le propone participar como voluntario en un estudio cuyo objetivo es determinar el papel de los diferentes tipos de receptores sensoriales que inervan la superficie ocular en la determinación de la frecuencia de parpadeo y el control de la secreción lagrimal cuando se estimula la córnea. En el estudio van a participar 80 voluntarios de ambos sexos y será desarrollado en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández de Elche y en el Hospital Marina Baixa de Alicante. El estudio ha sido aprobado por la Comisión de Ética en la Investigación Experimental de la Universidad Miguel Hernández (CEIE).

El instrumento que se va a utilizar es un instrumento diseñado y patentado por nuestro grupo de investigación (Belmonte et al, 1999) cuyo funcionamiento se basa en la aplicación sobre la córnea de un chorro de gas de flujo, temperatura y

composición controlados, con lo que es posible realizar la estimulación selectiva de la superficie ocular.

El estesiómetro de gas ha sido ampliamente usado en estudios previos de nuestro grupo (Belmonte y cols, 1999; Rosenberg y cols., 2000; Vesaluoma y cols., 2000a; Vesaluoma y cols., 2000b; Acosta y cols., 2001a; Acosta y cols., 2001b; Gallar y cols, 2004; Acosta y cols., 2004; Bourcier y cols, 2005; Acosta y cols., 2002005a; Acosta y cols., 2005b; 2006; Peral y cols, 2006; Gallar et al, 2009; 2010) y de otros equipos de investigación (Feng y Simpson, 2003, 2004, 2005; De Paiva y Pflugfelder, 2004; Stapleton y cols., 2004; Henderson y cols, 2005; Benitez del Castillo y cols, 2007). Su uso se ha demostrado hasta ahora totalmente inocuo y no ha supuesto ningún riesgo para los sujetos de experimentación, y cuenta con la conformidad CE.

Su participación en el estudio, se llevará a cabo de la siguiente manera: Antes de comenzar se le realizará una historia clínica abreviada y una exploración física ocular general, incluyendo un test para determinar si presenta síntomas de ojo seco. Si usted no presenta antecedentes de enfermedades graves (excluyendo sd ojo seco severo), no ha sido sometido a cirugía ocular ni a cirugía refractiva de la córnea y no es portador habitual de lentes de contacto, se le incluirá en el estudio, que consistirá en una sesión de aproximadamente 20 minutos de duración cada una, en las que, en una habitación con temperatura y humedad controladas, se realizarán estas tres determinaciones:

Determinación de la secreción lagrimal:

Al inicio de la sesión, tras 15 minutos de adaptación a las condiciones ambientales de la habitación, se le medirá la producción lagrimal usando el test de producción de lágrima. A tal fin, una tira comercial llamada tira de Schirmer, se le colocará durante 3 minutos, en la conjuntiva tarsal temporal del párpado inferior de ambos ojos. También se le medirá la producción de lágrimas tras finalizar la determinación de la sensibilidad corneal basal de cada ojo.

Estesiometría (medida de la sensibilidad de la superficie ocular):

La medida de el flujo de secreción lagrimal reflejo se realiza con un instrumento cuya extensión presenta un receptáculo que se coloca sobre la cuenca orbitaria, sin establecer contacto ocular, a 1cm de separación del mismo. Se aplicará, a un flujo muy ligero, un chorro de gas a temperatura neutra conteniendo un porcentaje de CO₂ (80% de CO₂ en aire), con lo que puede variarse de forma progresiva la acidez corneal (estímulo químico).

Inmediatamente después de cada pulso, deberá evaluar la intensidad subjetiva de la sensación que le ha producido el pulso de gas en una escala analógica visual (VAS), consistente en una línea continua de 10 cm de longitud sobre la que debe realizar un trazo, considerando que el valor 0 (cero) equivale a ausencia de sensación y el valor 10 (diez) equivale al grado máximo de sensación que pueda imaginar. También tendrá que describir la sensación con sus propias palabras.

Determinación del patrón termográfico corneal

Con ésta prueba, tras 10-15 minutos de adaptación a la temperatura de la habitación, se le solicitará que permanezca con los párpados cerrados durante 3 segundos posteriormente, deberá mantener los ojos abiertos durante los 10 segundos, tiempo en el que se tomarán una secuencia de imágenes con una cámara termográfica. Ésta aportará unas imágenes de las zonas en las que se objetiva un enfriamiento corneal.

Determinación de la altura del menisco lagrimal mediante OCT

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de imagen interferométrica, con capacidades de resolución micrométrica y de corte transversal. Es una técnica de diagnóstico, control y seguimiento, que nos permite el estudio de cortes histológicos de la retina en vivo, así como el estudio de la altura del menisco lagrimal analizando el segmento anterior del globo ocular. Es una prueba que no es molesta para el paciente, que no requiere contacto con el ojo, es rápida y carece de efectos secundarios.

Este instrumento dispone de una mentonera donde el paciente se coloca y permanece con los ojos abiertos durante 3-5 segundos que dura la toma de la imagen.

Riesgos del estudio

No se prevé ningún efecto adverso en el empleo del instrumento, ni tampoco con el uso de las tiras de Schirmer comerciales. No obstante, si durante la realización de las sesiones se presenta alguna incidencia, indíquelo inmediatamente al investigador, que procederá al lavado ocular con solución salina estéril y a aplicar las medidas indicadas por el fabricante. Al finalizar puede realizar su actividad normal (conducción, etc.)

Compensación

Si como consecuencia de la participación en este estudio, usted presentase algún efecto indeseable derivado de las técnicas experimentales, el equipo investigador le dispensará los cuidados médicos oportunos.

La UMH tiene suscrita una póliza de seguro por responsabilidad civil que cubre los eventuales daños y perjuicios que como consecuencia de este estudio de investigación competitiva pudieran resultar en la persona o personas participantes, de conformidad con lo dispuesto en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.

Usted no tendrá ningún gasto adicional a causa del estudio.

Participación

Su participación es voluntaria y puede retirarse del mismo en cualquier momento sin ningún perjuicio ni penalización. Si usted desea abandonar su participación en el ensayo, por favor, notifíquese al investigador responsable del estudio. Asimismo, podrá ser retirado del estudio, sin su consentimiento, si el investigador responsable considera que es preferible para su salud o bienestar, o si incumple sus compromisos. En caso de dudas sobre el estudio o sus derechos, debe contactar con la investigadora responsable, Dra. Juana Gallar Martínez, en los teléfonos 965919532 ó 965919365 y Dra Merino Suárez 625114368.

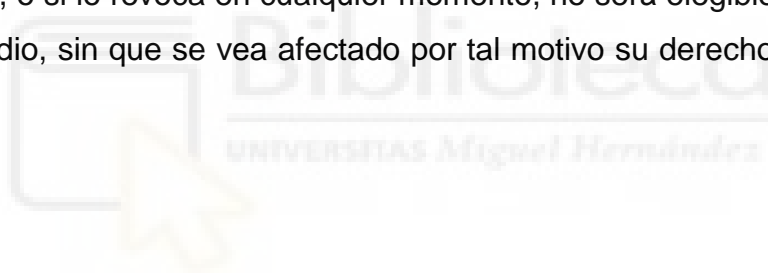
Confidencialidad

El archivo con sus datos personales (iniciales de su nombre, edad, sexo, color de los ojos, actividad profesional, actividades físicas que realiza, fase del ciclo menstrual, antecedente médicos significativos para el estudio) se realizará guardando la más estricta confidencialidad, de forma que no se viole en ningún momento la intimidad personal de los participantes en el estudio. Sus datos serán objeto de un tratamiento disociado, de modo que la información que se obtenga se trasladará a una base de datos en la que no podrá asociarse la información recogida con una persona identificada. Además del investigador responsable, sólo tendrán acceso a los datos los cinco miembros del equipo investigador.

Se le garantiza el estricto cumplimiento de la Ley 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos Personales. Cuando el investigador procese y trate sus datos tomará las medidas oportunas para protegerlos y evitar el acceso a los mismos de terceros no autorizados. Usted puede revocar el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales dirigiéndose al investigador responsable. Además, se le permitirá acceder a sus resultados en el estudio cuando éste haya finalizado.

Su consentimiento para participar en el estudio implica que los resultados finales obtenidos del estudio pueden ser publicados y presentados en reuniones científicas, si bien siempre de manera global, de manera que su nombre o identidad no aparecerán en ningún informe, resultado o publicación relacionada con el estudio.

Si no otorga su consentimiento firmando el documento que se le proporcionará a continuación, o si lo revoca en cualquier momento, no será elegible para participar en este estudio, sin que se vea afectado por tal motivo su derecho a la asistencia sanitaria.



ANEXO 2

CUESTIONARIO DE MCMONNIES

TEST DE MCMONNIES: UNA HERRAMIENTA DE APOYO EN LA DETECCIÓN DE LA SEQUEDAD OCULAR

APÉNDICE

Cuestionario de ojo seco (McMonnies)

Nombre: Fecha:

Por favor, marque con una cruz la opción correcta:

Hombre: Mujer:

Edad: Menos de 25 años 25- 45 años Más de 45 años

¿Actualmente usuario de lentes de contacto?

no sí, lentes de contacto rígidas sí, lentes de contacto blandas

1) ¿Padece alguno de los siguientes síntomas oculares?

Picor: Sequedad: Sensación de arenilla: Quemazón: Molestia/ dolor:

¿Con qué frecuencia?:

Siempre: Casi siempre: Algunas veces: Nunca:

2) ¿Le han prescrito alguna vez algún tratamiento para ojo seco?

Sí: No: No lo se: ¿Cuál?

3) ¿Padece artritis?

Sí: No: No lo se:

4) ¿Tiene problemas de tiroides?

Sí: No: No lo se:

5) ¿Tiene problemas de sequedad de las mucosas (nariz, boca, garganta, pecho o vagina)?

Nunca: A veces: A menudo: Constantemente:

6) ¿Cree que sus ojos son especialmente sensibles al humo, aire acondicionado o calefacción?

Sí: No: A veces:

7) ¿Se le ponen los ojos muy rojos e irritados al nadar en piscinas?

Sí: No: A veces: No aplicable:

8) ¿Está tomando algún medicamento?

Antihistamínicos (gotas o pastillas):

Diuréticos:

Tranquilizantes:

Pastillas para dormir:

Anticonceptivos orales:

Pastillas para la presión de la sangre:

Pastillas para problemas digestivos o intestinales:

Otro: ¿Cuál?

9) ¿Están sus ojos secos e irritados el día después de beber alcohol?

Sí: No: A veces: No aplicable:

10) ¿Sabe si duerme con los ojos abiertos?

Sí: No: A veces: No lo se:

11) ¿Le molestan los ojos al levantarse por la mañana?

Sí: No: A veces:



Don Francisco Poyales Galán, como Secretario General de la Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva

CERTIFICO:

Que le ha sido otorgado el Premio a la Mejor Comunicación Libre del Congreso de la Sección Córnea titulada:

“Síndrome de ojo seco: características termográficas”

a los Dres. María Luisa Merino Suárez, Javier Belmonte Martín, Carlos Belmonte Martínez y, Juana Gallar Martínez

durante el 32 Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Ocular Implanto-Refractiva, celebrado en Oviedo del 24 al 27 de mayo de 2017.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado en Oviedo, a veintisiete de mayo de dos mil diecisiete.

Dr. Francisco Poyales Galán
Secretario General de la SECOIR



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral, iniciada en el año 2012, no hubiese sido posible sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré, muchas de las cuales han supuesto un férreo y sólido apoyo en los momentos de mayor dificultad.

A mis padres: M^a Luisa y Javier, cuyo modelo ejemplarizante atesoro en mi memoria y conciencia todos los días y cuyo agradecimiento por su entrega, cariño, consejo y ayuda incondicional se manifiesta exiguo a través de estas palabras.

A mi marido, Javier, fuente inagotable de inspiración y sentido crítico, sin él este camino habría sido, sin lugar a dudas, más extenuante y tedioso. Principalmente quiero expresarle mi gratitud por formar día a día junto a mí el hermoso proyecto de vida que tenemos con nuestros hijos Pepe y Carmen.

Mi sincero agradecimiento a mis directores de tesis: Juana y Carlos. Es un privilegio haber tenido la oportunidad de trabajar bajo sus directrices en este proyecto; desde un principio depositaron su confianza en mí y, a medida que han pasado los años, no puedo agradecer, tanto como se merecen, la dedicación estoica y el entusiasmo que me han transmitido constantemente, a pesar de los momentos de turbación burocrática. Así mismo, expresar mi gratitud a todos los compañeros del laboratorio de neurociencias y fundamentalmente a M^a Carmen, Susana y Carolina, por su amabilidad y disponibilidad constantes.

Muchas gracias al Dr José Rosas, por proporcionarme toda la ayuda necesaria e incondicional con sus pacientes síndrome de Sjögren, invirtiendo parte de su tiempo en explicarles pormenorizadamente todo el estudio.

Un agradecimiento especial le debo a Pepe Belmonte, por su cariño sincero y ofrecimiento a todo lo que le he requerido. Merced a su conocimiento y destreza con las palabras me ha sugerido numerosas correcciones en esta tesis.

Muchas gracias a mi sobrina Teresa Camacho, por diseñar el óleo de la portada “ la mirada abstracta”, prestándose a ello con entusiasmo y convicción.

A mis compañeros y amigos del Hospital Marina Baixa, que se han prestado como sujetos de estudio en este proyecto: Carlos, Carmen, Maria José, Luisa, Fermin, Juan Luís, Clara, personal de enfermería y en especial a la Dra Alicia Rezola, por brindarme el apoyo científico y emocional en mis primeros pasos como adjunta especialista. Encarni, por cuidarme como una madre en el hospital ofreciéndome, además, su ayuda desinteresada en este proyecto y Coro por sus consejos y paciencia.

Por último, en estas páginas quiero nombrar a Pilar Gómez de Liaño, mi “maestra de la estrabología” y figura inspiradora desde que empecé la residencia, por enseñarme con prudencia, honestidad, dedicación y rigor esta ciencia.

Alicante, 22 de Abril de 2019.

M^a Luisa Merino Suárez.