

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Medikuntza Gradua / Grado en Medicina

# Cuantificación de la concentración de opiorfina en lágrima de sujeto sano.

Egilea / Autor:

**Ramón Calviño López-Villalta**

Zuzendaria / Director/a:

**Juan Antonio Durán de la Colina**

Zuzendarikidea / Codirectora:

**Arantxa Acera Osa**

© 2022, Ramón Calviño López-Villalta

Leioan, 2022eko apirilaren 28a / Leioa, 28 de abril de 2022



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a los profesores de la Universidad del País Vasco que han contribuido en la realización de este trabajo: a Juan Durán por sus ideas y asesoramiento; a Arantxa Acera por su ayuda en el laboratorio y su perspectiva investigadora; a Elena Vecino y su equipo de investigación por su colaboración y facilitar los medios para la realización del proyecto.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. SUPERFICIE OCULAR.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Párpados.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2. Conjuntiva.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3. Córnea.....</b>	<b>4</b>
1.1.3.1. Inervación corneal.....	6
<b>1.1.4. Película lagrimal.....</b>	<b>8</b>
1.1.4.1. Fase lipídica.....	9
1.1.4.2. Fase muco-acuosa.....	9
<b>1.2. DOLOR.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1. Enfermedad ojo seco.....</b>	<b>13</b>
1.2.1.1. Asintomático.....	14
1.2.1.2. Sintomático.....	14
<b>1.2.2. Queratitis neurotrófica.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. TÉCNICAS DE MEDIDA DE LA SENSIBILIDAD CORNEAL (ESTESIOMETRÍA CORNEAL) .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4. BIOMARCADORES.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5. OPIORFINA.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS: ENZYME – LINKED INMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....</b>	<b>20</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Muestras de lágrima.....</b>	<b>21</b>

<b>4.2 Técnica ELISA</b> .....	22
4.2.1. Preparación de los reactivos.....	23
4.2.1.1. Anticuerpo Biotin.....	23
4.2.1.2. HRP-avidina.....	23
4.2.1.3. Tampón de lavado .....	23
4.2.1.4 Estándar.....	23
4.2.2 Preparación muestras.....	24
4.2.3. Procedimiento.....	25
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>

## ABREVIACIONES

ABS: Absorbancia.

CBA: Estesiómetro de contacto de Cochet-Bonnet.

END: Endotelio.

EOS: Enfermedad Ojo Seco.

EVA: Escala Visual Analógica.

ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”.

FDA: “Food and Drug Administration” Administración de Medicación y Alimentos de Estados Unidos.

FD: Factor de Dilución.

GABA: Ácido Gamma-Aminobutírico.

hAP-N: ecto-aminopeptidasa humana.

hNEP: ecto-endopeptidasa humana neutral.

HRP avidin: “horseRadish Peroxidase avidina.

ICQO: Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología.

MMP-9: MetaloProteinasa de Matriz - 9.

MUC 1: Mucina 1.

MUC 4: Mucina 4.

MUC 5AC: Mucina 5AC.

MUC 16: Mucina 16.

NCCA: Estesiómetro sin contacto de Belmonte.

NEP: Ecto-endoPeptidasa Neutral.

NGF: “Neural Growth Factor” , Factor de Crecimiento Nervioso.

NIH: “National Institute of Health” Instituto nacional de Salud de Estados Unidos.

OPAS: “Ocular Pain Assessment Survey”.

OSDA: Ojo Seco por Deficiencia Acuosa.

OSE: Ojo Seco Evaporativo.

PAS: "Periodic Acid-Schiff" Ácido Periódico de Schiff.

PL265: inhibidor dual de encefalinasa 265.

PROL 1: gen Precursor de la Opiorfina 1

SNC: Sistema Nervioso Central.

SN: Sistema Nervioso.

TFOS DEWS II: Tear Film and Ocular Society Dry Eye Workhop 2

TMB: TetraMetilBenzidina.

## RESUMEN

Una cantidad importante de las personas que acuden a consulta oftalmológica por dolor de superficie ocular no presentan signos clínicos que justifiquen su sintomatología. Este tipo de paciente recibe un tratamiento inespecífico, resultando en una peor respuesta terapéutica respecto a aquellos con manifestaciones clínicas específicas. Para mejorar el diagnóstico y tratamiento en este perfil de pacientes es necesario ampliar los conocimientos neurofisiológicos.

Recientemente un grupo de investigación turco ha comparado la concentración de opiorfina en lágrima en personas con cuerpos extraños en córnea que producen dolor frente a un grupo control. El grupo de pacientes presentó mayor concentración de opiorfina en lágrima. La opiorfina es un pentapéptido endógeno que se encuentra en fluidos corporales como la lágrima. La opiorfina aumenta la vida media de las encefalinas (opioide endógeno), y con ello su efecto analgésico, gracias a la inhibición que ejerce sobre las enzimas que se encargan de degradar a dicho opioide.

El equipo de investigación que ha tutorizado este trabajo tiene aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Cruces una línea de trabajo para considerar a la opiorfina como un posible biomarcador en pacientes con dolor de superficie ocular sin signos clínicos. Antes de comenzar dicha investigación es necesario obtener una técnica analítica capaz de cuantificar este péptido en lágrima. En este trabajo se demuestra que mediante la técnica ELISA es posible cuantificar la opiorfina con un volumen de 20  $\mu$ l de lágrima.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El dolor de superficie ocular es una causa común por la que se acude a consulta oftalmológica (1). En general, se detectan signos clínicos compatibles con la sintomatología. El problema surge cuando no se detecta signos clínicos mediante tinciones o inspección de la superficie ocular. En este tipo de pacientes se suelen aplicar terapias basadas en el control de origen neuropático, aunque responden de forma subóptima, ya que no se ha obtenido un diagnóstico de certeza (2).

### **1.1. SUPERFICIE OCULAR**

La superficie ocular comprende la parte del globo ocular que se encuentra en contacto directo con el exterior. Está considerada como una unidad anatómico-funcional compuesta por: córnea, conjuntiva y película lagrimal (3).

#### **1.1.1 Párpado**

Están considerados como la primera barrera de protección del globo ocular frente a sustancias externas. La estructura del párpado superior es similar a la del inferior, exceptuando la ausencia del músculo elevador del párpado en este último. En los márgenes se disponen 3 o 4 filas de pelos que no presentan músculos erectores. Se divide en las siguientes capas (4) (5):

- Piel: epitelio estratificado queratinizado que le otorga impermeabilidad. La dermis es más fina que en otras regiones del cuerpo, sin grasa y con más fibras elásticas, aumentando su plasticidad.
- Capa muscular:
  - Músculo orbicular: encargado de la expresión fácil al cerrar el espacio interpalpebral. Al contraerse colabora en el drenaje de la lágrima.
  - Músculo elevador del párpado: las fibras se encuentran dispuestas en perpendicular por lo que provoca la apertura del ojo antagonizando al músculo orbicular.

- Placas tarsales: compuesto por tejido conjuntivo fibroso denso que tiene como función principal sostener el párpado gracias a las fibras de colágeno dispuestas en todas direcciones.

- Conjuntiva palpebral: se comenta en el siguiente apartado (1.1.2.)

Entre las diferentes capas palpebrales se distribuyen varios tipos de glándulas (**Figura 1**) que participan en la formación y mantenimiento de la película lagrimal:

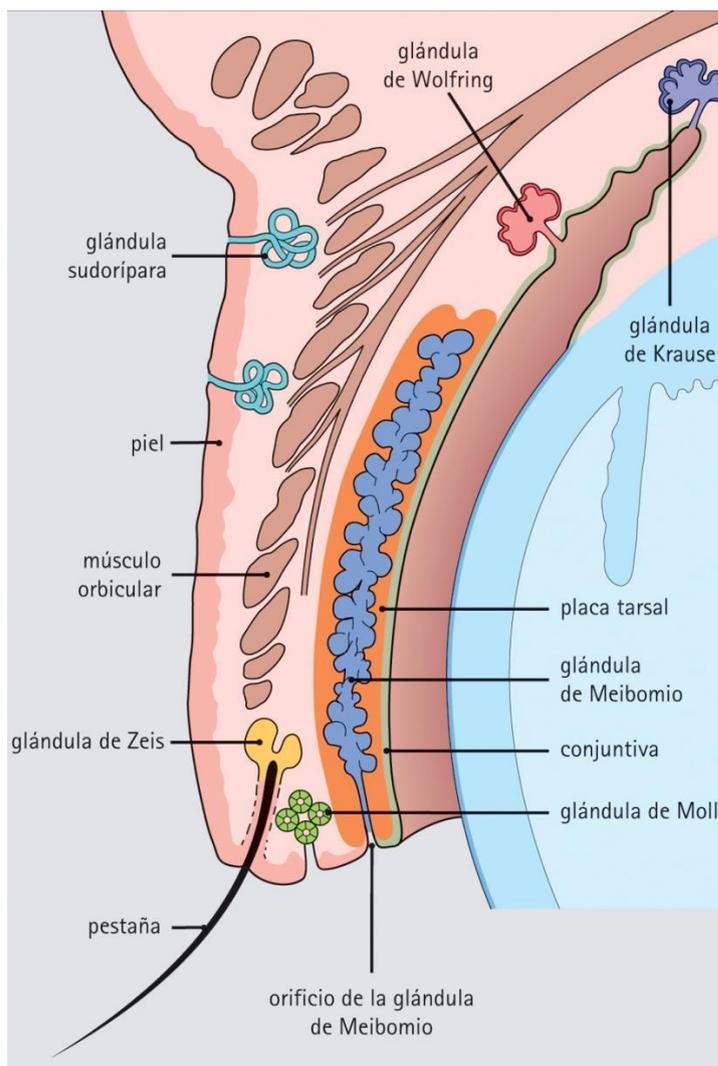
- Glándulas de Meibomio: secretan lípidos que retrasan la evaporación de la lágrima y protegen a la córnea.

- Glándulas de Zeis: se asocian con las pestañas y provocan secreción sebácea.

- Glándulas de Moll: glándulas sudoríparas apocrinas que se localizan en los bordes palpebrales.

- Glándulas de Krause: glándulas lagrimales accesorias en fórnix palpebral.

- Glándulas de Wolfring: glándulas lagrimales accesorias localizadas encima del tarso.

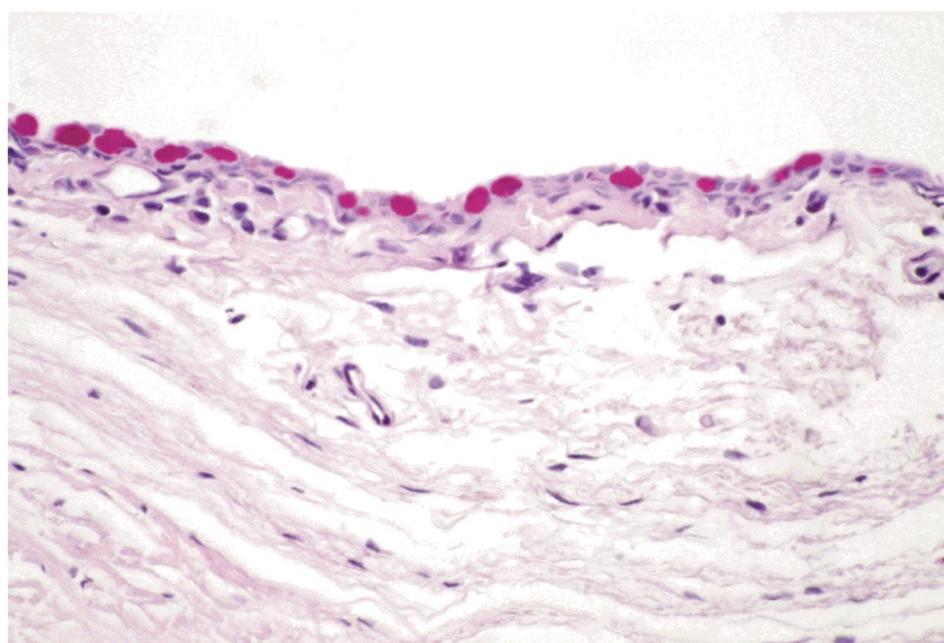


**Figura 1.** Distribución de glándulas palpebrales a lo largo de sus 4 capas (4).

### 1.1.2. Conjuntiva

Es una membrana mucosa transparente que reviste la parte interna de los párpados (conjuntiva palpebral), fórnix o fondo de saco de los ojos y la parte de la esclerótica expuesta al exterior (conjuntiva bulbar). Está compuesta por un epitelio estratificado cilíndrico, contiene células caliciformes (**Figura 2**) que, mediante sus secreciones, colaboran en la formación de la película lagrimal. Además, la primera capa epitelial presenta microvellosidades para aumentar la superficie de absorción y facilitar el anclaje de la película lagrimal. La mucina, secretada por células caliciformes también

es esencial para el mantenimiento de la humedad de la superficie ocular. La conjuntiva realiza función protectora de diferentes formas: mediante la barrera física que supone; protección inmunológica, gracias a los numerosos linfocitos acumulados en el estroma conjuntival; y protección antibacteriana, gracias a la secreción de enzimas bacteriolíticas como la lisozima y la lactoferrina. La conjuntiva del fórnix presenta repliegues para permitir el desplazamiento de ojos y párpados (4) (6) (5).



**Figura 2.** Sección histológica teñida con PAS de epitelio conjuntival con células caliciformes teñidas de color magenta. (7)

### 1.1.3. Córnea

La córnea es una estructura con forma de lente convexa que ocupa la porción anterior del globo ocular, junto con la esclerótica forma la túnica externa del ojo. Pese a que está compuesta por un tejido de gran celularidad, es transparente y avascular. La zona central posee un grosor de (0.5 mm) y mayor curvatura que la periferia (0.7 mm). En su cara anterior se encuentra la película lagrimal, mientras que en la cara posterior

contacta con el humor acuoso. La periferia de la córnea se denomina el limbo, es una región ampliamente vascularizada que contiene células madre pluripotenciales del epitelio corneal encargadas del recambio celular corneal. Dicha región marca la transición de la córnea con la esclerótica y la conjuntiva. La córnea es la parte del ojo con mayor poder refractivo, entre 40-44 dioptrías. Esto se debe, principalmente, a la transición aire-córnea (película lagrimal) con diferentes índices de refracción. Desde un punto de vista histológico la córnea se divide en las siguientes 6 capas ordenadas de exterior a interior del globo ocular (**Figura 3**) (4) (6):

- Epitelio: escamoso estratificado no queratinizado, ordenado de forma homogénea. En la zona central hay entre 5-7 capas celulares, mientras que en la periferia habrá entre 8-10 capas. Las células epiteliales poseen uniones intercelulares potentes y sus membranas se interdigitan entre sí. Las células basales se mantienen unidas a la membrana basal gracias a desmosomas, interdigitaciones de las membranas celulares y uniones estrechas (tight junctions) formando una barrera estanca frente al paso de moléculas y microorganismos. Las células superficiales son hidrófobas, para poder unirse a la lágrima presentan microvellosidades que se unen al glicocálix de la capa muco-acuosa de la lágrima.

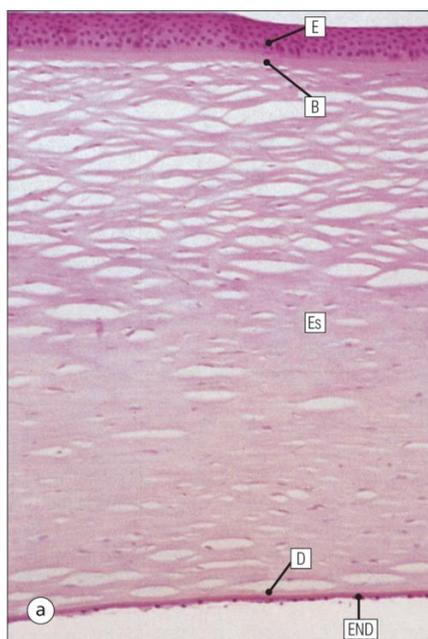
- Membrana de Bowman: lámina fibrilar dura, resistente y fina. Está compuesta por fibras de colágeno tipo I sintetizadas por las células del epitelio corneal y del estroma subyacente.

- Estroma: supone el 90 % del grosor de la córnea. Está formado por fibras de colágeno tipo I y V, forman una estructura ordenada compuesta por láminas, si la disposición no es la correcta se pierde transparencia. Los fibroblastos son el componente celular, sintetizan las fibras de colágeno y proteoglicanos, estos últimos son los responsables en regular la hidratación corneal, aspecto esencial para que se mantenga la transparencia.

- Capa de Dua: dura y delgada (15µm) compuesta de tejido colágeno sintetizado también por los fibroblastos del estroma. Útil como plano de escisión en la cirugía corneal.

- Membrana de Descemet: membrana basal gruesa que aumenta su tamaño con la edad. Está compuesta por colágeno tipo VII sintetizado por las células del endotelio corneal.

- Endotelio corneal: monocapa de células cuboides que forman un patrón hexagonal. Su principal función es permitir el paso de sustancias desde el humor acuoso al estroma y deshidratar la córnea para mantener la transparencia. Estas células no se renuevan, por eso, con los años no se consigue eliminar el exceso de líquido del estroma provocando un empeoramiento de la calidad refractiva de la córnea.

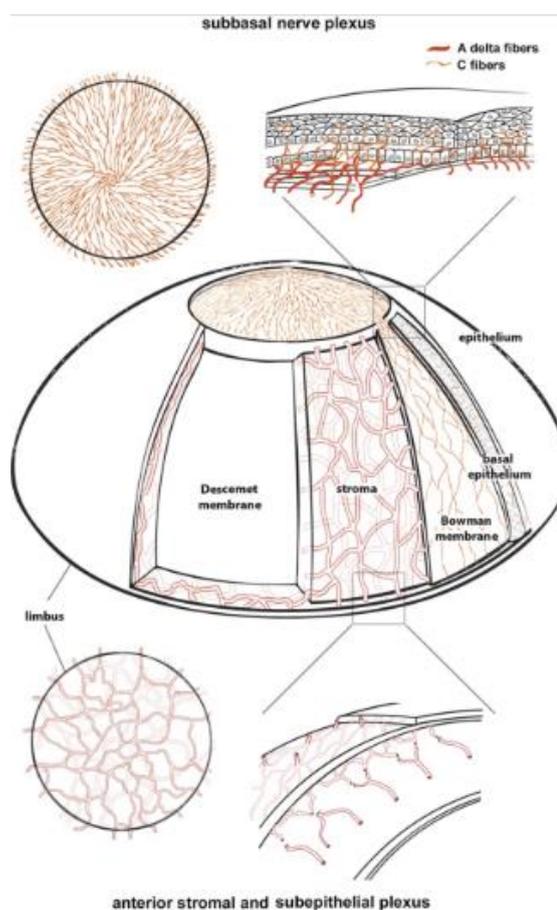


**Figura 3.** Sección histológica de córnea teñida con hematoxilina-eosina vista con microscopio óptico. E: epitelio corneal. B: capa de Bowman. Es: estroma. D: membrana Descemet. END: endotelio corneal. La capa de Dua es tan fina que es indistinguible al microscopio óptico. (8)

#### 1.1.3.1. Inervación corneal

La córnea es el órgano con mayor número de terminaciones nerviosas sensitivas (7000 por milímetro cuadrado), la concentración es 20-40 veces mayor que en la pulpa dental y entre 300-600 veces mayor que en la piel. Está inervada por los nervios ciliares largos, que forman parte de la rama oftálmica (V1) del nervio trigémino (V par craneal). Las ramas sensitivas de estos nervios entran por la zona posterior del globo

ocular, recorren el espacio supracoroideo hasta llegar, de forma radial, al limbo. Al pasar al estroma anterior, los nervios pierden gran parte de la vaina de mielina si son fibras A-Delta o la totalidad de la vaina de mielina si son fibras C. De esta forma, se mantiene la transparencia corneal. A continuación, las fibras se internan en el tercio interior del estroma para luego avanzar ramificándose de forma oblicua hacia el centro y hacia la membrana de Bowman. Las fibras nerviosas llegan hasta la membrana de Bowman en toda la córnea por igual, la atraviesan perpendicularmente y, más adelante, justo antes de llegar a la capa basal del epitelio corneal, se disponen en paralelo a la superficie corneal formando el plexo sub-basal que recorre toda la córnea entre la membrana de Bowman y la capa basal del epitelio. El plexo sub-basal manda fibras perpendiculares para inervar el epitelio corneal (**Figura 4**) (8) (9).



**Figura 4.** Distribución fibras sensitivas de la córnea. (10)

En el plexo sub-basal el 80% de las fibras son del tipo C, mientras que el 20% restante son fibras A-delta. Estas fibras nerviosas se activan según el estímulo recibido gracias a los siguientes tipos de receptores:

- Mecano-nociceptores, el 15% de las fibras responden a estímulos mecánicos, la mayoría son fibras A-delta. Tienen una gran capacidad de adaptación. Además, los umbrales de activación son más bajos que los mecanoreceptores de la piel. Su activación produce sensación de dolor punzante.

- Nociceptores polimodales, el 70% de las fibras responde a estímulos dolorosos, la mayoría son de tipo C. Se activan ante numerosos tipos de estímulos dañinos: químicos, térmicos, sustancias endógenas y exógenas que producen inflamación. Dicha despolarización evoca sensación de quemazón y dolor punzante.

- Receptores sensitivos de frío, el 10%, se encuentran tanto en fibras C como fibras A-delta. Tienen un umbral alto de activación, cuando el estímulo consigue superarlo se produce sensación de sequedad (11).

Durante el envejecimiento hay una pérdida de función de fibras A-delta y C. Sin embargo, los estudios actuales son contradictorios y no arrojan resultados claros sobre si también existe una pérdida de densidad nerviosa (9).

#### **1.1.4. Película lagrimal**

Estímulos en la córnea, como el frío y el aire, provocan que el aparato lagrimal (glándulas lagrimales y accesorias) secrete lágrima sobre el epitelio de la córnea y de la conjuntiva. La lágrima tiene multitud de funciones: aporta oxígeno y nutrientes a la córnea, humidifica, lubrica mejora la óptica de la córnea, elimina residuos y actúa como sistema defensivo ante microorganismos. La lágrima forma una película no homogénea que clásicamente se dividía en tres capas (5): lipídica, acuosa y mucosa. Recientemente Shoji et al (12) han propuesto la existencia de dos capas: una lipídica superficial y una acuosa glicoproteica que aumenta su viscosidad hasta ser considerada

un sólido sumamente hidratado en la porción próxima al epitelio corneal y conjuntival (**Figura 5**).

Las capas de la película lagrimal son las siguientes (13) (14):

#### 1.1.4.1 Fase lipídica

Las glándulas de Meibomio aportan la mayoría de los lípidos que la componen. Se subdivide en dos capas con diferentes funciones:

- subcapa superficial: formada por lípidos no polares en contacto con el aire. Son lípidos hidrófobos que evitan la evaporación de la lágrima.
- subcapa profunda: más fina, compuesta por lípidos polares (hidrofílicos) que actúan como tensioactivos evitando que la lágrima se derrame. Compuesta por fosfatidilcolinas, esfingomielina, ceramida, cerobrósidios y ácidos grasos, entre otros.

#### 1.1.4.2 Fase muco-acuosa

Es una capa seromucosa constituida por las secreciones de la glándula lagrimal principal y accesorias de Krause y Wolfring. Compone el 98% del total de la lágrima y contiene más de 3000 proteínas distintas con multitud de funciones diferentes. Además, en esta capa se encuentran las mucinas, proteínas glicosiladas, que tienen como función adherirse al epitelio corneal que es hidrófobo. Por ello, la mayor concentración de estas se da en la parte basal de la lágrima mientras que es menor cerca de la fase lipídica. Las funciones más relevantes de la capa mucosa son las siguientes:

- Función óptica: el epitelio corneal es hidrófobo, pero presenta microvellosidades para que el glicocálix de la fase muco-acuosa se una bien y se consiga una buena capacidad refractaria. Si esto fallase aparecería astigmatismo irregular.
- Función metabólica: capta oxígeno del exterior y aporta glucosa para las necesidades metabólicas de la córnea. Elimina el anhídrico carbónico y otros restos metabólicos corneales.
- Función limpiadora: ayudada por el parpadeo, elimina restos celulares y cuerpos extraños.

- Función antimicrobiana: directamente mediante la secreción de péptidos antimicrobianos (transferrina, lactoferrina, lisozima y factores del complemento) e inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM y IgE). Indirectamente mediante el pH (7.45), que evita el crecimiento de ciertos microorganismos.
- Función inmunológica: defensa mediada por leucocitos ante factores externos que producen daño tisular.

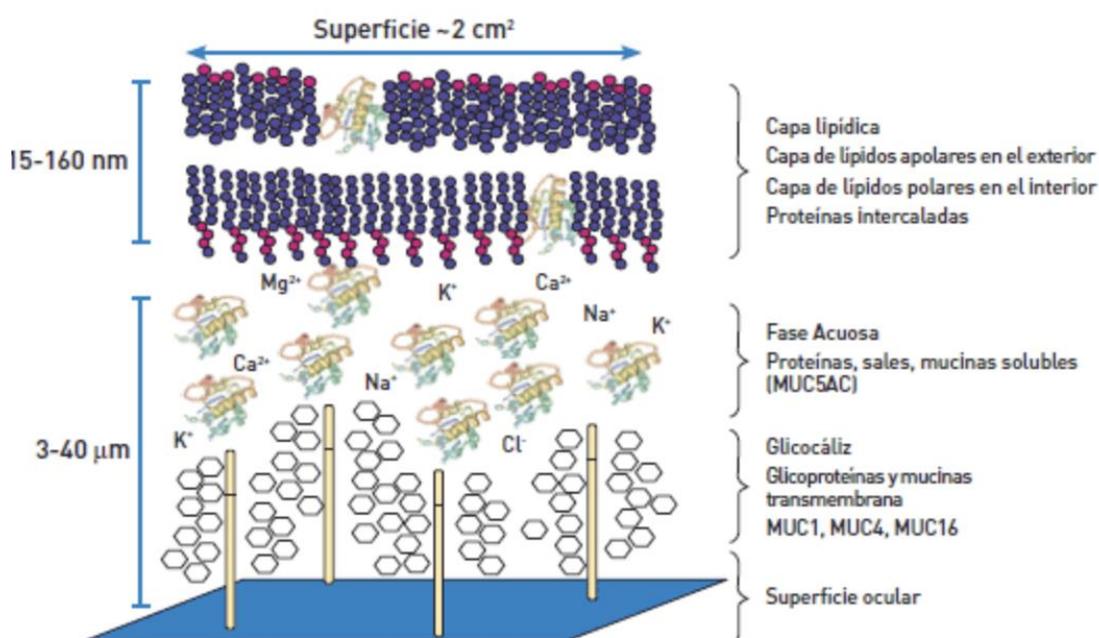


Figura 5. Capas y contenido de la película lagrimal (no se encuentra a escala) (15)

## 1.2. DOLOR

El dolor, según la International Association for the Study of Pain, se define como una “experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada con una lesión tisular real o potencial, o descrito en términos de dicha lesión”. Se puede clasificar según (16) (17):

- **Duración**, agudo o crónico, no hay un punto de corte específico, sino que se tiene en cuenta el tiempo normal que se necesite para la curación de la lesión que produce dicho dolor, suele ser entre 3-6 meses.

- **Patogenia**

- Neuropático, debido a lesión directa del Sistema Nervioso Central (SNC) o vías periféricas.

- Nociceptivo, es el más común. Se basa en la despolarización de los receptores del dolor, nociceptores. Se subdivide en:

- Somático: dolor localizable y punzante. Se suele dar en huesos, piel, músculo y vasos.
- Visceral: dolor mal localizado que se acompaña de síndromes neurovegetativos. Se suele dar en el resto de órganos.

- Nociplástico, anteriormente conocido como psicógeno. No se debe a trastornos fisiológicos ni físicos ya que no hay lesión tisular clara ni lesión del sistema somatosensitivo. Se debe a una nocicepción alterada de origen psíquico.

- **Curso**, continuo o irruptivo.

- **Farmacología**, se valora si responde de forma total, parcial o nula a los opiáceos.

- **Intensidad:**

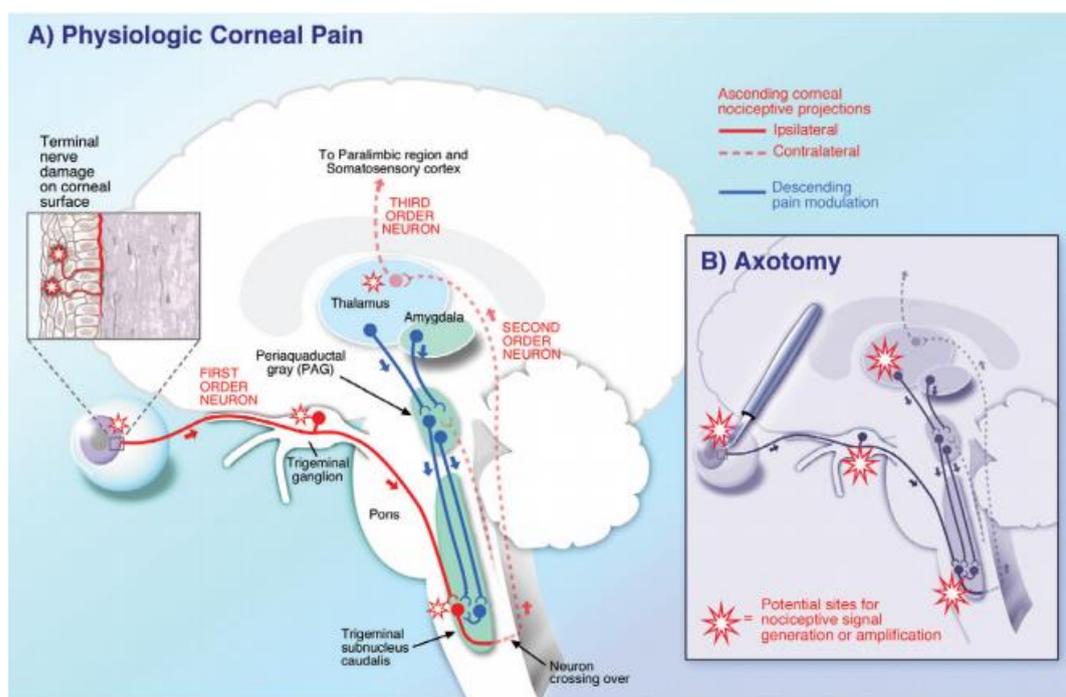
- Leve, puede realizar actividades normales.

- Moderada, interfiere con actividades menores, requiere opiáceos.

- Grave, interfiere con el descanso y precisa opiáceos mayores.

El dolor corneal se desencadena con la activación de los nociceptores, principalmente ante un estímulo mecánico, aunque también puede ser químico o térmico. A continuación, los nociceptores traducen el estímulo externo en impulso eléctrico a través de neuronas de primer orden del nervio trigémino hasta que sinaptan con neuronas de segundo orden localizadas en el núcleo subcaudal del trigémino. Estas

últimas se decusan y sinaptan con células de tercer orden del núcleo paraventricular, tálamo posterior y corteza insular. Las neuronas de tercer orden se encargan de que el cuerpo interprete la sensación de dolor al mandar impulsos a la región paralímbica y al córtex somatosensorial correspondiente con la córnea (**Figura 6**) (2). Al mismo tiempo, las neuronas de segundo orden estimulan el núcleo salival superior y el núcleo motor facial para conseguir lagrimeo y parpadeo a modo defensivo (18). La percepción del dolor está sujeta a la modulación a través de la actividad inhibitoria intrínseca que el SN periférico y central pueden ejercer en la transmisión dolorosa antes de percibirla como dolorosa, en algunos casos en vez de ser inhibida puede amplificarse. Por tanto, la nocicepción es la activación de los nociceptores. Si el SN no es capaz de inhibir la nocicepción se producirá el dolor patológico (16).



**Figura 6:** A) vía del dolor corneal. B) Sitios potenciales de aparición o amplificación del dolor nociceptivo corneal tras LASIK. (2)

En la córnea se encuentran todos los elementos del sistema opioide endógeno, receptores y encefalinas (19). Las encefalinas son neuropéptidos opioideos naturales de suma importancia en la transmisión nociceptiva y en la modulación del dolor. El funcionamiento de las encefalinas no se conoce al completo, pero se encargan de unirse a receptores de opioides (mu y delta), que activan el sistema de analgesia mandando señales nerviosas a las regiones grises periacueductal y periventricular (20). El efecto analgésico es efímero ya que las encefalinas son rápidamente inactivadas por las enzimas Zinc-ectopeptidasa, ecto-endopeptidasa humana neutral (hNEP) y la ecto-aminopeptidasa humana (hAP-N) (21). Ante una reacción inflamatoria tanto las fibras nerviosas corneales como las células inmunitarias responden secretando las encefalinas endógenas Met- y Leu-.

Multitud de etiologías pueden causar dolor ocular. Entre ellas se encuentran (18):

- Lesiones agudas locales físicas, térmicas o químicas que producen la estimulación de los receptores nociceptivos. Además, este tipo de agresiones ocasionan la liberación de moléculas inflamatorias (ATP, leucotrienos, encefalinas, prostaglandinas, citoquinas...) que disminuyen el umbral del dolor.
- Dolor neuropático, se produce por lesiones directas en el SN por traumatismos de estructuras nerviosas, enfermedades metabólicas, tóxicos o infecciones víricas.

### **1.2.1. Enfermedad ojo seco**

El comité TFOS DEWS II define la enfermedad de ojo seco (EOS) como “una enfermedad multifactorial de la superficie ocular, que se caracteriza por una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal acompañada de síntomas oculares, en la que la inestabilidad e hiperosmolaridad de la superficie ocular, la inflamación y daño de la superficie ocular, y las anomalías neurosensoriales desempeñan papeles etiológicos.” (22)

Según su etiología la EOS se clasifica en dos grupos no excluyentes: ojo seco por deficiencia acuosa (OSDA) y ojo seco evaporativo (OSE), siendo este último el más frecuente. El OSDA se suele deber a afectación de la glándula lacrimal, mientras que el OSE se debe a anomalías del párpado (disfunción de glándula de Meibomio o

parpadeo). En ambas etiologías se produce una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y la superficie ocular (22).

Los pacientes sospechosos de EOS son clasificados según si presentan síntomas y/o signos oculares para orientar el posible diagnóstico (22). Las molestias oculares y alteración visual son los dos síntomas principales, aunque también se consideran otros como sensación arenosa y picor.

#### 1.2.1.1. Asintomático

- Sin signos: normal, no se precisa tratamiento
- Signos oculares de enfermedad:
  - Predisposición a ojo seco: cambios en la superficie ocular que pueden alertar de un comienzo de EOS. La disfunción de glándulas de Meibomio es la causa más frecuente de EOS, pero suele ser asintomática. Se recomienda educación junto con manejo preventivo.
  - Condiciones neurotróficas (sensación disfuncional): la pérdida de sensibilidad corneal puede enmascarar los síntomas o ser la consecuencia de una EOS de larga evolución. Esta situación requiere tratamiento de las lesiones (22) (23).

#### 1.2.1.2. Sintomático

- Sin signos
  - Dolor neuropático: no se observan anomalías en la superficie ocular, pero hay dolor. Se cree que se debe a lesión o enfermedad del sistema somatosensorial.
  - Estado preclínico: síntomas coherentes con EOS pero sin signos clínicos, normalmente los síntomas suelen ser intermitentes. Se recomienda observación junto con educación y terapias preventivas.
- Signos oculares de enfermedad: en este caso se realiza un diagnóstico diferencial con otras patologías de la superficie ocular como lagoftalmos.

- Si se diagnostica EOS el tratamiento se dirige a restaurar la homeostasis lagrimal.

La hiperosmolaridad inducida por la evaporación de la lágrima es la clave de la fisiopatología del EOS, produce daño directo e inflamación de la superficie ocular (ojo y anejos, incluida la córnea, la conjuntiva, los párpados, las pestañas, la película lagrimal, las glándulas lagrimales principal y accesorias, y las glándulas de Meibomio).

Tsubota et al opinan que el control de la inflamación inicial es esencial para evitar que se desarrolle dolor neuropático (24). El dolor corneal neuropático produce manifestaciones clínicas diferentes como hiperalgesia (aumento de la sensibilidad al dolor, fotoalodinia (sensibilidad dolorosa a la luz) u otras sensaciones desagradables como sequedad, ardor y sensación de cuerpo extraño. La evolución de estos síntomas puede variar, amplificarse la intensidad o persistir en el tiempo. El tejido nervioso responde alterando la sensibilización tanto central como periférica. Dicho cambio produce un aumento de la actividad eléctrica neuronal, desregulación excitatoria y activación de células gliales. La neuroplasticidad convierte el dolor de origen periférico en central. Además, las vías descendentes se desinhiben, resultando en la pérdida de mecanismos que reducen el dolor (25). Pacientes en esta situación no suelen responder bien a los tratamientos para EOS como: el uso gotas derivadas de sangre o suero, el control de la inflamación con corticoides o ciclosporina A, la utilización de GABA miméticos para controlar el dolor a nivel central, gotas con ácido hialurónico para proteger el epitelio, gotas con factor de crecimiento neural (NGF) o gotas con derivados de omega-3 (26). El uso de anestésicos tópicos tampoco sirve para el control ya que dañan tanto el metabolismo como la estructura de las células corneales (27) (28).

### **1.2.2. Queratitis neurotrófica**

La queratitis neurotrófica es una enfermedad corneal degenerativa causada por el deterioro de la inervación sensorial corneal. La pérdida de sensibilidad provoca daño a nivel del epitelio corneal junto con una cicatrización subóptima. El daño epitelial se ve acrecentado por la reducción del reflejo de lagrimeo y pestañeo. Finalmente se desarrollan úlceras que pueden llegar a la perforación corneal (29).

La enfermedad se origina al producirse lesión de los nervios corneales sensitivos y/o sus vías hasta el núcleo del trigémino. Las causas más comunes suelen ser la queratitis herpética, quemaduras por productos químicos y uso crónico de lentillas. También se puede dar por lesiones del nervio trigémino por fracturas óseas o por enfermedades sistémicas como la diabetes.

En las fases iniciales de la enfermedad pueden presentar síntomas sensitivos como dolor, pero con el avance de la enfermedad el paciente pierde la sensibilidad. La agudeza visual también se pierde progresivamente debido a los defectos corneales, los intentos de cicatrización epitelial y la pérdida de lagrimeo (29).

### **1.3. TÉCNICAS DE MEDIDA DE LA SENSIBILIDAD CORNEAL (ESTESIOMETRÍA CORNEAL)**

La valoración del dolor y molestias de la superficie ocular se puede realizar mediante cuestionarios como el “Ocular Pain Assessment Survey” (OPAS) que, además, evalúa la calidad de vida del paciente (18). El problema de los cuestionarios se debe a que resultan un tanto subjetivos.

La sensibilidad del nervio corneal se puede evaluar objetivamente de forma directa, mediante estesiómetro, o con pruebas indirectas que se basan en tintes fluorescentes y lagrimeo.

El estesiómetro de contacto de Cochet-Bonnet (CBA) produce un estímulo que activa los mecano-nociceptores, valorando la función de fibras A-delta, pero no fibras C. El estesiómetro corneal sin contacto de Belmonte (NCCA) estimula los nervios de manera no invasiva mediante un flujo de aire con variaciones en la fuerza, composición y temperatura permitiendo realizar pruebas multimodales más complejas (30). El NCCA es más preciso y sensible que el CBA ya que es capaz de valorar la función fibras A-delta y fibras C al estimular receptores nociceptores polimodales y térmicos (9) (30).

Las tinciones (fluoresceína, verde de lisamina...) se utilizan para detectar epitelios corneales dañados. (9) (30).

#### 1.4. BIOMARCADORES

El Instituto Nacional de Salud Estados Unidos (NIH) define biomarcador de la siguiente forma “característica que se mide como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas a una exposición o intervención, incluidas las intervenciones terapéuticas” (31). Es un concepto que se basa en la utilización de moléculas o parámetros que sean medibles y objetivos. Se suelen utilizar para el diagnóstico, prognosis, evolución de un tratamiento o seguimiento de una patología (32).

El desarrollo de nuevas técnicas de genómica y proteómica más sensibles han favorecido la aparición de gran cantidad de nuevos biomarcadores (33). En los últimos años se han descrito múltiples biomarcadores de superficie ocular, pero bastantes no son lo suficientemente específicos como para discriminar entre diferentes afecciones oculares. Es importante caracterizar biomarcadores con buena especificidad para que los pacientes reciban un diagnóstico y tratamiento más específico. Por todo ello, se debe realizar una validación analítica y clínica de cada biomarcador que se proponga (31) (34).

Así pues, el desarrollo de biomarcadores favorece el avance de la investigación clínica y la atención del paciente. El problema radica en que los biomarcadores estudiados no son marcadores de daño ocular puro, sino biomarcadores tanto relacionados con la inflamación como con el daño ocular, ya que, en general, no suelen estar presentes el uno sin el otro.

El Neural Growth Factor (NGF) está considerado como un mediador endógeno en la regeneración neuronal, hiperalgesia y la respuesta al dolor (35). El NGF es un biomarcador que se encuentra elevado en lágrima en pacientes con lesiones oculares, signos de inflamación o dolor ocular crónico asociado a EOS o cirugía refractiva corneal (36). Lágrimas artificiales enriquecidas con NGF se han utilizado para mejorar la integridad y sensibilidad corneal en EOS (37). Experimentalmente se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-NGF consiguiendo respuesta analgésica en patologías tan diferentes como la osteoartritis o la cistitis intersticial (38).

Los biomarcadores más estudiados en lágrima son aquellos relacionados con la EOS, ya que es la enfermedad que produce daño de superficie ocular más documentada. El

origen multifactorial de la EOS favorece la probabilidad de que existan diferentes biomarcadores por descubrir. La detección de estas moléculas puede que ayude en la categorización y aparición de tratamientos específicos de dicha enfermedad (30). Según el estudio publicado por Blanco-Vázquez et al (36) la Il-9 es el único biomarcador elevado en lágrima por dolor ocular crónico sin signos de inflamación, mientras que otros muchos biomarcadores como Il-8, Il-2 o TNF-gamma, los cuales se comentan a continuación, asocian dolor con inflamación ocular.

Roy et al (39) consideran biomarcadores de inflamación en EOS a componentes del metabolismo de lípidos. Uno de ellos es la fosfolipasa A (40), una enzima que cataliza la hidrólisis de glicerofosfolípidos produciendo otros biomarcadores como el ácido araquidónico, precursor de la prostaglandina E2 (41). Estas dos últimas moléculas también pueden considerarse biomarcadores válidos de inflamación ocular (39).

Los péptidos S100A8/calgranulina A y S100A9/calgranulina B aumentados en lágrimas se relacionan con la gravedad de EOS por enfermedad de glándulas de Meibomio (42). Previamente se ha comentado que en la EOS hay una reacción inflamatoria, por ello las citocinas, los factores de crecimiento y sus receptores son posibles biomarcadores, aunque no muy específicos ya que se elevan ante una amplia variedad de patologías oculares. Las siguientes moléculas (IL-6, TNF-alfa, IL-8 e IL-17) han mostrado constantemente estar elevadas en pacientes con EOS (39) (43) (44). La metaloproteinasa de matriz – 9 (MMP-9) es un biomarcador, aprobado por la FDA (45), que se encuentra elevado en lágrima de pacientes con EOS (46).

## **1.5. OPIORFINA**

En 2006 Wisner et al (47) detectaron un pentapéptido endógeno capaz de inhibir el catabolismo de las encefalinas en mamíferos, lo nombraron opiorfina. La caracterización de la opiorfina se debe al previo descubrimiento de la sialorfina en ratas, un péptido con capacidad antinoceptiva gracias a la inhibición competitiva de la ecto-endopeptidasa neutral (NEP) (48). La opiorfina es capaz de aumentar la vida media de las encefalinas y, con ello, la analgesia de este análogo opioideo al inhibir a las tres enzimas (Zinc-ectopeptidasa, hNEP y hAP-N) responsables de su degradación (48). El efecto analgésico se inhibe ante la presencia de un antagonista de los receptores opioides, esto indica que su acción antinociceptiva se consigue a través de

vías opioidérgicas endógenas dependientes de receptores de opioides tipo  $\mu$  (49). En condiciones de laboratorio, utilizando ratones, se concluyó que dosis sistémicas de 1-2 mg/kg de opiorfina conseguían una potencia analgésica sin producir los efectos indeseables de la morfina, opioide exógeno agonista de receptores  $\mu$ . La opiorfina administrada de forma crónica no produce tolerancia, tiene un menor potencial de abuso que la morfina y no produce estreñimiento (49). Tian et al (50) observaron en ratones con dolor agudo que, el efecto analgésico con una dosis de 5  $\mu$ g/kg i.c.v era tan potente como una dosis de 10  $\mu$ g/kg i.c.v de morfina.

El gen Prol-1 codifica al precursor de la opiorfina, se encuentra principalmente en las glándulas lacrimales y salivales, por eso las mayores concentraciones de opiorfina se han detectado en los fluidos secretados por dichas glándulas, aunque también ha sido cuantificada en otros líquidos corporales como la orina, leche materna y líquido seminal (21) (48) (49).

En 2019 Ozdogan et al (51) estudiaron la concentración de opiorfina en saliva en pacientes con pulpitis irreversible sintomática y periodontitis apical sintomática. Los niveles de opiorfina en saliva se correlacionaban con el dolor referido y, además, mostraron un descenso en los 6 y 30 días posteriores al tratamiento. Previamente solo se habían estudiado los niveles de opiorfina en saliva en pacientes con síndrome de boca ardiente. Los resultados eran dispares, Salaric et al (52) concluyeron que el grupo de casos tenía niveles de opiorfina significativamente más altos respecto a un grupo control, mientras que, Boucher et al (53), no observaron diferencias entre pacientes y grupo control. En 2018, Parida et al (54), detectaron un descenso significativo de los niveles de opiorfina en saliva tras la administración de anestesia local para la extracción de piezas dentales.

En oftalmología apenas existen estudios sobre la opiorfina. Ozdogan et al (55) midieron la concentración de opiorfina en lágrima en un grupo control frente a personas con cuerpos extraños en la córnea que les producían dolor, categorizado del 1 al 10 según la escala visual analógica (EVA). El grupo de pacientes obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) de mayor concentración de opiorfina frente al grupo control. Sin embargo, no se concluyó correlación entre los niveles de concentración de opiorfina y el grado del dolor medido por EVA.

## **1.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

La técnica ELISA se basa en el reconocimiento de proteínas, anticuerpos, antígenos y glucoproteínas mediante anticuerpos monoclonales marcados con enzimas que convierten un sustrato cromóforo que posteriormente podrán ser cuantificadas por la absorbancia a una determinada longitud de onda. Dicha técnica fue desarrollada en 1971 por Peter Perlmann y Eva Engvall (56) basándose en la técnica Radio Immunoassay (RIA) diseñada en 1960 por Berlow y Yalow, merecedora del Premio Nobel de Medicina de 1977. Esta última técnica tenía un grave problema, en vez de usar enzimas y partículas cromóforas se usaban radioisótopos, nocivos para el cuerpo humano a diferencia de la técnica ELISA, que es completamente inocua (57).

Existen varios tipos de ELISA: directo, indirecto, competitivo y “sándwich”. En el caso del ELISA tipo sándwich, la técnica se basa en un anticuerpo de reconocimiento, que suelen ser anticuerpos monoclonales específicos contra el antígeno que se quiere analizar. Los anticuerpos monoclonales se anclan en el fondo de los pocillos de una placa que suele contener 96 pocillos. A continuación, se incorpora la muestra que contiene la proteína (antígeno) a medir, que se unirá mediante enlaces débiles no covalentes al anticuerpo de reconocimiento. Se van añadiendo diferentes tampones según el protocolo de la ELISA hasta añadir el anticuerpo de detección con epítipo diferente al anterior que, como peculiaridad, está unido a un enzima que vira de color. Finalmente, se añade un sustrato que cambia de color al entrar en contacto con la enzima y permite que mediante un espectrofotómetro se pueda conocer la absorbancia a una determinada longitud de onda. La absorbancia es transformada en concentración a partir de una recta patrón conocida (58).

## **2. HIPÓTESIS**

Niveles óptimos de opiorfina en lágrima son necesarios para mantener activo el funcionamiento de las encefalinas y controlar la modulación del dolor ocular. Pacientes con dolor producido por cuerpos extraños en la córnea, presentan niveles más altos de opiorfina en lágrima frente a un grupo control de sujetos sanos (55) .

Posibles variaciones en su concentración en lágrima pueden relacionarse con síntomas oculares dolorosos. Si esto se confirma, la opiorfina se podría emplear como biomarcador que ayude al diagnóstico etiológico de ese grupo de enfermedades oculares.

### **3. OBJETIVOS:**

- Poner a punto la técnica de ELISA para cuantificar Oporfina en lágrima y abrir una vía de investigación.
- Medir concentración de Oporfina en lágrima de sujetos sin síntomas ni signos de alteración de la superficie ocular (grupo control para la línea de investigación en curso).

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 Muestras de lágrima**

Esta investigación fue llevada a cabo por personal médico cualificado siguiendo estrictamente los principios de la Declaración de Helsinki sobre la Investigación Biomédica con seres humanos. El comité de ética de la investigación del Hospital Universitario Cruces aprobó la realización de la investigación el 14 de diciembre de 2021 (código CEI E21/55). Antes de la toma de muestras, se obtuvo el consentimiento informado firmado de todos los sujetos voluntarios sanos después de haberles explicado la naturaleza y las posibles consecuencias del estudio. Los pacientes fueron reclutados en base a los criterios de inclusión y exclusión acordados.

Las muestras de lágrima fueron tomadas a sujetos voluntarios sanos, sin signos ni síntomas de alteración de la superficie ocular, mayores de 18 años en la unidad de córnea del Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología (ICQO), Bilbao.

Los individuos con antecedentes de cualquier trastorno/condición sistémica u ocular fueron excluidos del estudio. Los criterios de exclusión consistían en una intervención quirúrgica ocular en los tres meses anteriores, medicación ocular crónica (por ejemplo, para el glaucoma), antecedentes de alergias, uso de cualquier medicamento tópico, que no sean lágrimas artificiales, o medicamentos orales que contengan corticoesteroides,

atopia y pacientes con síndrome de Sjögren. También se excluyeron los usuarios de lentes de contacto para evitar cualquier posible interferencia en la interpretación de resultados y con molestias oculares con o sin signos clínicos.

Todas las muestras de lágrimas se recogieron utilizando microcapilares de vidrio calibrados de 10 microlitros (BLAUBRAND intraMark, Wertheim, Alemania). Las muestras de lágrima se obtuvieron del menisco lagrimal temporal inferior (**Figura 7**), minimizando la irritación de la superficie ocular o del margen del párpado, y sin instalación de anestesia. Las muestras de lágrima se recogieron de ambos ojos de cada participante y se colocaron inmediatamente en tubos Eppendorf. Tras la recogida de lágrima, las muestras se almacenaron a - 80° C hasta su análisis.



**Figura 7.** Obtención de lágrima

#### **4.2 Técnica ELISA**

El presente trabajo se centró en la puesta a punto de la técnica ELISA tipo “sandwich” para la cuantificación de la opiorfina en lágrima, para ello se utilizó el kit de CUSABIO “Human Opiorphin ELISA Kit” que tiene un rango de detección entre 0.625 ng/ml - 40 ng/ml. Se siguió el protocolo propuesto en el kit que se desarrolló de la siguiente manera:

En el fondo de los pocillos vienen fijados anticuerpos específicos contra la opiorfina. Las muestras y los estándares se pipetea dentro de los pocillos, cualquier opiorfina presente se fijará a los anticuerpos de captura. Después se retira el líquido sobrante,

sin lavar, y se añade en los pocillos un anticuerpo conjugado con biotina específico (anticuerpo de detección) para opiorfina. Se vuelve a lavar y se añade la enzima, peroxidasa de rábano picante, en inglés Horseradish Peroxidase (HRP) conjugada con avidina. Se repite el lavado para eliminar la enzima no unida al anticuerpo. A continuación, se añade el sustrato, tetrametilbenzidina (TMB) que provocará un cambio de color directamente relacionado con la cantidad de opiorfina. Finalmente se mide la intensidad del color con un espectrofotómetro a 450 nm.

#### 4.2.1. Preparación de los reactivos

##### 4.2.1.1. Anticuerpo Biotin

Se diluyó 100 veces el anticuerpo Biotin. En este caso se mezclaron 80  $\mu$ l de anticuerpo Biotin + 7920  $\mu$ l diluyente de anticuerpo de Biotin.

##### 4.2.1.2. HRP-avidina

El HRP-avidina también se diluyó 100 veces y se utilizaron las mismas cantidades, 80  $\mu$ l de HRP-avidina + 7920  $\mu$ l diluyente de HRP-avidina.

##### 4.2.1.3. Tampón de lavado

En la preparación del tampón de lavado se diluyeron 20 ml de tampón de lavado concentrado (25 x) en agua destilada para preparar 500 ml de tampón de lavado (1 x).

##### 4.2.1.4 Estándar

El estándar consiste en opiorfina liofilizada. Para la preparación del estándar se centrifugó a 6000 rpm durante 30 segundos y se reconstituyó con 1 ml de diluyente de muestras. Esta reconstitución consiguió una solución stock de 40 ng / ml. Se mezcló el estándar para asegurar una reconstitución completa y se esperó, 15 minutos, a que se asentase mientras se agitaba suavemente.

Se pipetearon 250  $\mu$ l de diluyente de muestra en tubos numerados de (S0-S6). Se usó el estándar para producir una serie de dilución doble. El estándar sin diluir sirve como

estándar alto (40 ng / ml) (s7). El diluyente de muestra sirve como blanco o estándar cero (0 ng / ml) (S0).

**Tabla 1.** Tubos con diferente concentración de opiorfina que servirán para realizar la recta patrón.

Tubo	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	S0
Concentración (ng/ml)	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0

#### 4.2.2 Preparación muestras

Se prepararon 3 pools de lágrima de muestras de diferentes individuos: Pool 1 con 10  $\mu$ l, Pool 2 con 15  $\mu$ l y Pool 3 20  $\mu$ l. Cada pool se diluyó con buffer para obtener un volumen de total de 100  $\mu$ l. Al pool 1 se le añadió 90  $\mu$ l; al pool 2; 85  $\mu$ l; y al pool 3, 80  $\mu$ l.

**Tabla 2.** Composición de las muestras de cada pool con su respectivo factor de dilución.

	Volumen lágrima	Volumen Buffer	Volumen total	Dilución (Factor dilución)
Pool 1	10 $\mu$ l	90 $\mu$ l	100 $\mu$ l	1:10(x10)
Pool 2	15 $\mu$ l	85 $\mu$ l	100 $\mu$ l	1:6.6(x6.6)
Pool 3	20 $\mu$ l	80 $\mu$ l	100 $\mu$ l	1:5(x5)

#### 4.2.3. Procedimiento

- a) En 8 pocillos diferentes se agregaron 100  $\mu$ l de estándar a diferentes concentraciones (S1-S7) y el blanco (S0). En 3 pocillos se añadieron los 3 pool diferentes de lágrima. La placa de pocillos se cubrió con una tira adhesiva y se incubó durante 2 horas a 37°C.
- b) Se retiró el líquido de cada pocillo, sin lavarlo.
- c) Se agregaron 100  $\mu$ l de anticuerpo Biotin a cada pocillo. Se cubrió de nuevo con una tira adhesiva y se incubó durante 1 hora a 37 ° C.
- d) Se aspiró la solución y se lavó cada pocillo 3 veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado utilizando una pipeta multicanal. Después del último lavado se invirtió la placa y se dieron pequeños golpes contra papel absorbente para secarla.
- e) Se agregaron 100  $\mu$ l de HRP-avidina a cada pocillo. Se cubrió la placa con una nueva tira adhesiva y se dejó incubar 1 hora a 37°C.
- f) Se volvió a lavar y aspirar con 200  $\mu$ l de tampón de lavado cada pocillo un total de 5 veces.
- g) Se añadieron 90  $\mu$ l de sustrato TMB a cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a 37°C, envuelto en papel de aluminio para protegerlo de la luz.
- h) Se agregaron 50  $\mu$ l de solución de parada a cada pocillo, el líquido se volvió amarillo (**figura 8**)
- i) Se determinó la densidad óptica de cada pocillo en 5 minutos, utilizando un lector de microplacas ajustado a 450 nm.



**Figura 8.** Pocillos teñidos de amarillo después de añadir la solución de parada

## 5. RESULTADOS

Para calcular la concentración de opiorfina en lágrima de sujetos sanos utilizados como control, se puso a punto el volumen de muestra de lágrima necesario para el análisis mediante ELISA tipo sándwich explicado en el apartado de material y métodos en la **Tabla 2**.

Al analizar la concentración de opiorfina en lágrima, se obtuvo la recta patrón (**Gráfica 1**) en la que analizamos la absorbancia a partir de una concentración de opiorfina conocida. Se analizaron réplicas de las muestras y se calculó su promedio. A la media de ambas medidas se le restó el valor del blanco,  $S_0 = 0.0627$ , y el resultado obtenido (**Tabla 3**) es el que se utilizó para la elaboración de la recta patrón en una gráfica en la que el eje de abscisas o eje “x” corresponde a la concentración y el eje de ordenadas o eje “y” corresponde a la absorbancia.

**Tabla 3.** Cálculo absorbancia muestras estándar.

<b>Recta patrón</b>	<b>Abs</b>	<b>Abs'</b>	<b>Promedio</b>	<b>Promedio –S0</b>
<b>S7 (40ng/ml)</b>	1,2545	1,4909	1,3727	1,31
<b>S6 (20ng/ml)</b>	0,6584	1,104	0,8812	0,8185
<b>S5 (10ng/ml)</b>	0,4304	0,5744	0,5024	0,4397
<b>S4 (5ng/ml)</b>	0,1837	0,3102	0,24695	0,18425
<b>S3 (2.5ng/ml)</b>	0,1347	0,2093	0,172	0,1093
<b>S2 (1.25ng/ml)</b>	0,1539	0,1222	0,13805	0,07535
<b>S1 (0.625ng/ml)</b>	0,0764	0,0731	0,07475	0,01205
<b>S0 (0ng/ml)</b>	0,0656	0,0598	0,0627	0

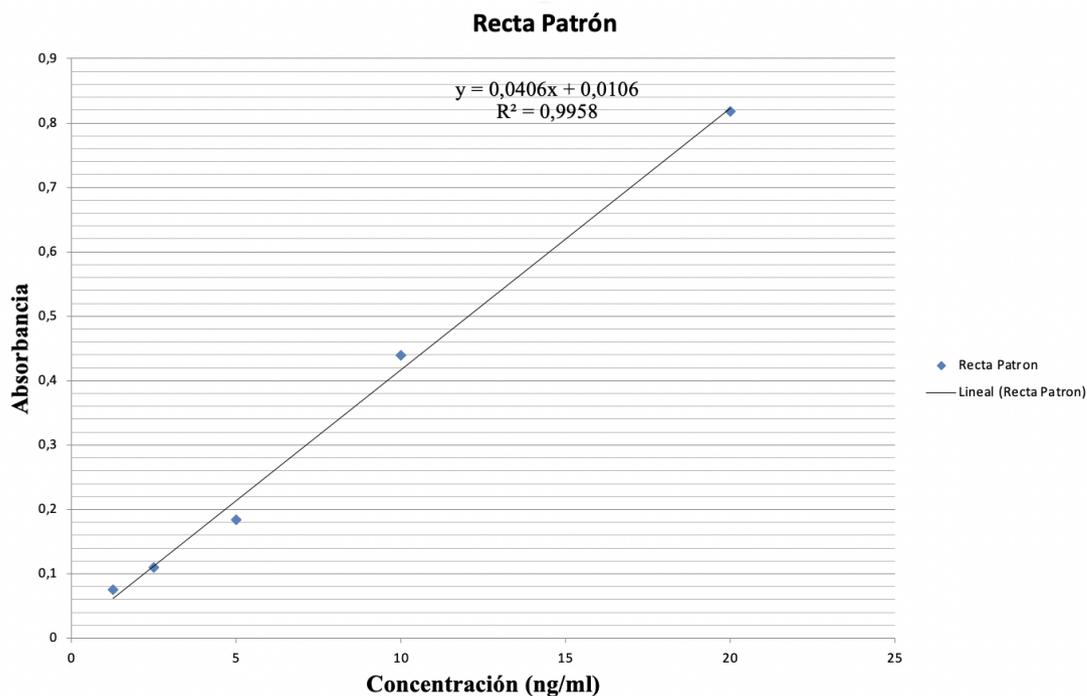
ABS: absorbancia. ABS-S0: absorbancia menos la absorbancia del blanco (S0)

La relación entre la absorbancia y la concentración es lineal, se puede expresar como  $y = a + bx$  donde “y” es la absorbancia, “a” la ordenada en el origen, “b” la pendiente de la recta y “x” la concentración.

La fórmula de la recta patrón obtenida en nuestro caso es la siguiente:

$$y = 0'0406x + 0'0106 \text{ (Gráfica 1)}$$

Una vez obtenida la recta patrón hay que comprobar que la diferencia de los valores observados y los valores de predicción del modelo son pequeñas.  $R^2$  es un coeficiente que mide la cercanía de los datos a la línea de regresión ajustada. Los valores de  $R^2$  se encuentran entre 0 y 1, donde 0 no explica ninguna proporción de la variabilidad de los datos mientras que 1 explica toda la variabilidad de los datos en torno a su media. En nuestro caso  $R^2 = 0.9958$  (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Recta patrón a partir de las muestras estándar.

Para calcular la concentración de opiorfina de cada muestra de lágrima tendremos que sustituir la absorbancia medida de cada pool por la “y”, despejar la “x” y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución (FD) de cada muestra que aparece en la **Tabla 3**. En la **Tabla 4** aparecen los resultados, los Pool 1 y 2 no tienen la suficiente Opiorfina para ser detectada por el kit utilizado. Sin embargo, en Pool 3 la concentración de opiorfina es de 8.09 ng/mL.

**Tabla 4.** Concentración de Opiorfina obtenida a partir de la absorbancia registrada.

	<b>Abs</b>	<b>Lágrima(ng/ml)</b>	<b>Lágrima x FD (ng/ml)</b>
<b>Pool 1</b>	0.0053	- 0.1305	-1.31
<b>Pool 2</b>	0.0103	- 0.33	-0.05

<b>Pool 3</b>	0.0763	1.62	8.09
---------------	--------	------	------

FD: Factor de dilución

El volumen de lágrima necesario para analizar la opiorfina en mediante la técnica ELISA será en sujetos controles de 20 microl. La concentración promedio de opiorfina obtenida en este proyecto, de un sujeto sano, es de 8.09 ng/ml. En los pacientes con dolor se podrá utilizar un volumen igual a 20 microl o inferior, teniendo en cuenta que según la poca bibliografía que hay en el tema, la concentración del biomarcador será más elevado que en sujetos sanos. Este kit es poco sensible para utilizarlo en volúmenes tan limitantes como son las muestras de lágrima. Sin embargo, teniendo en cuenta el valor de  $R^2$  obtenido, es un kit muy específico para la opiorfina.

## 6. DISCUSIÓN

Las molestias oculares, incluido el dolor de superficie ocular, conforman una de las principales causas de consulta en oftalmología (1) (59). El primer paso, en este tipo de paciente, consiste en una evaluación integral en busca de la etiología del dolor, que como ya se ha comentado previamente puede ser nociceptiva o neuropática. En general, los individuos en los que se sospecha componente neuropático responden peor al tratamiento, resultando en una cronificación de sus dolencias. Por ello, previo a la decisión terapéutica, es imprescindible un enfoque interdisciplinario teniendo en cuenta aspectos psicológicos, conductuales y contribuyentes neurológicos. Sin embargo, una cantidad importante de pacientes presentan ligeras o ninguna manifestación clínica que, a priori, justifique su sintomatología (2). Por tanto, para mejorar el control del dolor crónico se requiere una mayor exploración de las técnicas diagnósticas, opciones terapéuticas y conocimientos de la neurofisiología ocular (60).

Rosenthal et al (2) opinan que los pacientes con dolor ocular sin signos clínicos puede que hayan sufrido una sensibilización de los receptores corneales nociceptivos. Además, añaden que si no se trata a tiempo o no se resuelve la sintomatología,

seguramente se produzca una sensibilización neuropática. Por ello, proponen que el tratamiento ha de ser temprano y agresivo.

Debido a que la opiorfina consigue analgesia tras activación nociceptiva puede que tenga un papel protagonista en la modulación del dolor en pacientes sin signos clínicos. La relación de sus niveles en lágrima y dolor ocular es algo relativamente moderno y poco estudiado. Nuevos proyectos en torno a esta proteína podrían ayudar en la toma de decisiones clínicas. El equipo de investigación que ha tutorizado el presente trabajo de fin de grado tiene aprobada, por el comité ética de la investigación del Hospital Universitario Cruces, una línea de investigación sobre este péptido. El proyecto pretende analizar la posibilidad de que la opiorfina se pueda considerar como un biomarcador en lágrima en aquellos pacientes con dolor de superficie ocular sin signos clínicos. Antes de poner en marcha dicho proyecto era necesario obtener una técnica capaz de medir los niveles de opiorfina en lágrima.

Los resultados del experimento demuestran que mediante la técnica ELISA se puede cuantificar la opiorfina en lágrima de sujeto sano. El volumen de muestra necesaria, 20  $\mu$ l, es excesivo como para obtenerla en una sola toma. Teniendo en cuenta que, por cada toma se pueden obtener entre 5-10  $\mu$ l por ojo, habría que realizar entre 2-4 tomas, esperando 30 minutos entre cada una. Tantas extracciones resultan molestas para el individuo y poco práctico en la clínica. Como solución, se podrían obtener muestras de ambos ojos y juntarlas para reducir los tiempos de toma. Por otro lado, en personas con alteraciones corneales potencialmente dolorosas los niveles de opiorfina son mayores (55). Esto puede que se deba a las reacciones de inflamación y la necesidad de una respuesta antiálgica. Por lo tanto, sería interesante intentar cuantificar opiorfina utilizando volúmenes de lágrima menores de 20  $\mu$ l en pacientes con patología corneal ya que, la concentración en lágrima puede que sea mayor respecto a la concentración en sujetos sanos.

Desde otro punto de vista, es interesante la línea de investigación de este nuevo proyecto puesto que, si los sujetos con dolor ocular que no exhiben ningún signo clínico presentan niveles reducidos de dicha proteína, se podría plantear la utilización de lágrima artificial enriquecida con opiorfina u otra molécula que alargue el tiempo de acción de las encefalinas en la respuesta antiálgica. De hecho, Reaux-Le Goazigo

et al (61) ya han propuesto algo similar al haber estudiado las propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas de la PL265, un profármaco inhibidor de las encefalinasas (hNEP y hAP-N) (62). Concluyeron que, en ratones murinos, PL265 no altera la integridad de la córnea sana, mientras que en córneas con dolor reduce la hipersensibilidad corneal química y mecánica.

La EOS es la patología más relacionada con dolor de superficie ocular (60). La prevalencia está en aumento debido a los cambios medioambientales, envejecimiento de la población, privación del sueño, estilos de vida sedentarios y el aumento del uso de dispositivos electrónicos (24) (63) (64). La EOS está ligada a factores genéticos, causando dolor neuropático que, en un gran número de pacientes, no se obtiene un tratamiento satisfactorio. Pese a que según la clasificación del EOS realizada por el TFOS DEWS II (22) incluye a un tipo de pacientes con síntomas, pero sin signos clínicos, el rigor del escrutinio científico descarta que el dolor ocular sin alteraciones epiteliales se deba al EOS (2). Sin embargo, eso no significa que las nuevas técnicas diagnósticas, mencionadas en el siguiente párrafo, no sirvan de inspiración para desarrollar sistemas similares que faciliten el diagnóstico en este tipo de pacientes tan complejos.

Previamente, se ha manifestado que la hiperosmolaridad en lágrima es clave en el desarrollo de EOS (22). La osmolaridad, se refiere al número de partículas disueltas en una solución. Se puede medir mediante técnicas a base de presión de vapor o basándose en el punto de congelación, como hace el osmómetro de Clifton (65). Este último método es considerado como el superior ya que tiene en cuenta tanto partículas con carga como aquellas sin carga. En la segunda década del siglo XXI salió al mercado el OcuSense TearLab, este nuevo instrumento calcula la osmolaridad mediante impedancia electrónica con muestras de lágrima de 20 nL empleando un menor tiempo que las otras técnicas. El problema radica en que mide las partículas con carga mientras que no tiene en cuenta aquellas sin carga. Sin embargo, existe una buena correlación entre las mediciones del OcuSense TearLab y las del osmómetro de Clifton (65). Hoy en día, el OcuSense TearLab es utilizado por oftalmólogos en consulta (66). En la actualidad existen otros sensores portátiles que se colocan en el ojo como si se tratase de una lentilla, son capaces de medir: niveles de glucosa, lactato, alcohol, vitaminas y detectar infecciones por virus Herpes simple tipo 1 (67). El interés

en desarrollar este tipo de dispositivos es tal que incluso Google junto con la farmacéutica Novartis están desarrollando su propia lentilla inteligente que mide los niveles de glucosa sin necesidad de pincharse (68) (69).

En caso de que en un futuro sea preciso medir la concentración de opiorfina en lágrima durante la consulta, la técnica ELISA podría ser utilizada. Aunque, resultaría incómodo ya que precisa de tiempo y un laboratorio para procesar la muestra. Basándose en la idea del OcuSense TearLab y los sensores portátiles, sería interesante el desarrollo de un dispositivo similar capaz de medir la concentración de opiorfina en lágrima de una manera rápida y sencilla en la propia consulta, ahorrando tiempo y dinero. Este supuesto nuevo aparato sería útil para enfocar el diagnóstico y tratamiento en pacientes con dolor de superficie ocular sin signos clínicos y/o mala respuesta a la terapia recibida.

## **7. CONCLUSIONES**

- La concentración media de opiorfina en lágrima de sujetos sanos es de 8.09 ng/ml.
- El volumen mínimo de lágrima requerido para cuantificar opiorfina, mediante ELISA, en sujetos sanos sin dolor ni molestias oculares es de 20  $\mu$ l.
- La presencia de opiorfina en lágrima sugiere que de alguna forma interviene en los mecanismos del dolor corneal. Este estudio permite iniciar una línea de investigación con el objetivo de conocer cuál es su posible función en la fisiopatología del dolor corneal.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Uchino M, Schaumberg DA. Dry Eye Disease: Impact on Quality of Life and Vision. *Current ophthalmology reports*. 2013; 1(2): 51-57.
2. Rosenthal P, Baran I, Jacobs D. Corneal pain without stain: is it real? *Ocul Surf*. 2009 Enero; 7(1): p. 28-40.
3. Soriano-Pina D, Cameo-Gracia B, Palacio-Sierra A, Cerdón-Ciordia B, Blasco-Martínez A. Superficie ocular. *Portales medicos.com*. 2020 Noviembre; 15(22): 1120.

4. Gartner LP. 22. Sentidos especiales. In Gartner LP. Texto de histología.: Elsevier España; 2021. 545-576.
5. García-Feijóo J, Pablo-Júlvez LE. Fisiología ocular. In García-Feijóo J, Pablo-Júlvez LE. Manual de oftalmología.: Elsevier España; 2012. p. 27-30.
6. Kierszenbaum A, Tres L, Laura L. 9. Órganos sensoriales: visión y audición. In Kierszenbaum A, Tres L, Laura L. Histología y biología celular.: Elsevier España; 2020. 299-342.
7. Fernández a, Moreno J, Prósper f, García M, Echeveste J. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. Anales Sis San Navarra. 2008; 31(1): 53-69.
8. Muller JS, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. Exp Eye Res. 2003 Mayo; 76(5): 521-42.
9. Simmons B, Bakir M, Jain S. Corneal nerves in health and disease. Survey of Ophthalmology. 2014 Mayo-Junio; 59(3): 263-285.
10. Lum E, Corbett M, Murphy P. Corneal Sensitivity After Ocular Surgery. Eye contact lens. 2019 Julio; 45(4): 226-237.
11. Aggarwal S, Bunya S, Tripathy K. Eyewiki.aao.org. [Online].; 2020 [cited 2021 Abril 18. Available from: [https://eyewiki.aao.org/Ocular\\_Neuropathic\\_Pain#Physiology\\_of\\_Corneal\\_Nerves](https://eyewiki.aao.org/Ocular_Neuropathic_Pain#Physiology_of_Corneal_Nerves).
12. Shoji M, Shoji J, Inada N. Clinical Severity and Tear Biomarkers, Eosinophil Cationic Protein and CCL23, in Chronic Allergic Conjunctival Diseases. Semin Ophthalmol. 2018; 33(3): 325-330.
13. Dwivedi M, Brinkkötter M, Harishchandra RK, Galla HJ. Biophysical investigations of the structure and function of the tear fluid lipid layers and the effect of ectoine. Part B: artificial lipid films. Biochim Biophys Acta. 2014 Octubre; 1838(10): 2716-27.
14. Ausejo M. Análisis de biomarcadores proteicos en patologías oculares: desarrollo de un modelo experimental en ojo seco. 2018 Junio.

15. Nichols KK, Foulks GN, Bron JA, Glasgow BJ, Dogru M, Tsubota K, et al. Tearfilm.org. [Online]. [cited 2022 Enero 28. Available from: [https://www.tearfilm.org/mgdreports spanish/mgdspanish\\_lipidosdelapeliculalagrimal](https://www.tearfilm.org/mgdreports spanish/mgdspanish_lipidosdelapeliculalagrimal).
16. Puebla F. tipos de dolor y escalas según la OMS. Dolor iatrogénico. Oncología (Barc.). 2005 Marzo; 28(3): 33-7.
17. Cohen S RS. Dolor. In Goldman L SA. I. Goldman-Cecil. Tratado de medicina interna. 26th ed. España: Elsevier; 2021. 128-32.
18. Belmonte C, Acosta MC, Merayo-Llodes J, Gallar J. What causes eye pain? Curr Ophthalmol Rep. 2015; 3(2): 111-21.
19. Selbach MJ, H Buschnack S, Steuhl KP, Kremmer , Muth-Selbach. Enkephalins exhibit an analgesic efficacy comparable with that of morphine without its adverse effects.<sup>47</sup> All the elements of the endogenous opioid system (opioid receptors and enkephalins) are expressed in ocular surface tissues.<sup>52,62</sup> The endogenous Met-. J Anat. 2005 Marzo; 206(3): 237-42.
20. J H. Sensibilidades somáticas: II. Dolor, cefalea y sensibilidad térmica. In J H. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica.: Elsevier; 2016. 621-32.
21. Dufour E, Villard-Saussine S, Mellon V, Leandri R, Jouannet P, Ungeheuer M, et al. Opiorphin Secretion Pattern in Healthy Volunteers: Gender Difference and. Biochem Anal Biochem. 2013; 2(135).
22. Craig JP, Nichols KK, Akpek Ek, Caffery B, Dua HS, Joo CK, et al. TFOS DEWS II. [Online]. [cited 2021 Abril 20. Available from: [https://www.tfosdewsreport.org/report-informe\\_de\\_definicion\\_y\\_clasificacion\\_de\\_tfos\\_dews\\_ii/48\\_36/es/](https://www.tfosdewsreport.org/report-informe_de_definicion_y_clasificacion_de_tfos_dews_ii/48_36/es/).
23. Belmonte C, Nichols JJ, Cox SM, Brock JA, Begley CG, Bereiter DA, et al. TFOS DEWS II pain and sensation report. Ocul Surf. 2017 Julio; 15(3): 404-437.
24. Tsubota K, Pflugfelder SC, Liu Z, Baudouin C, Hyo Myum K, Messmer EM. Defining Dry Eye from a Clinical Perspective. Int J Mol Sci. 2020 Diciembre; 21(23): 9271.

25. Dieckmann G, Borsook D, Moulton E. Neuropathic corneal pain and dry eye: a continuum of nociception. *Br J Ophthalmol*. 2021 Abril.
26. Aragona P, Giannaccare G, Mencucci R, Rubino P, Cantera E, Rolando M. Modern approach to the treatment of dry eye, a complex multifactorial disease: a P.I.C.A.S.S.O. board review. *Br J Ophthalmol*. 2021 Abril; 105(4): 446-453.
27. Harnisch JP, Hofmann F, Dumitrescu L. Side-effects of local anesthetics on the corneal epithelium of the rabbit eye. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 1975 Octubre; 197(1): 71-81.
28. Giannaccare G, Ghelardini C, Mancini A, Scordia V, Mannelli LdC. New Perspectives in the Pathophysiology and Treatment of Pain in Patients with Dry Eye Disease. *J Clin Med*. 2022 Enero; 11(1).
29. Feroze K PB. StatPearl. [Online].; 2021 [cited 2021 Abril 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK431106/>.
30. Murphy PJ, Patel S, Kong N, Ryder RE, Marshall J. Noninvasive assessment of corneal sensitivity in young and elderly diabetic and nondiabetic subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Junio; 45(6): 1737-42.
31. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource Administration FaD, editor.; 2016.
32. Enríquez-de-Salamanca A, Bonini S, Calonge M. Molecular and cellular biomarkers in dry eye disease and ocular allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012 octubre; 12(5): 523-33.
33. Acera A, Vecino E. Biomarcadores de la lágrima como fuente de información de la superficie ocular: ¿Las lágrimas como espejo del ojo? *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2012 Junio; 87(6): 171-172.
34. Binotti WW, Bayraktutar B, Ozmen MC, Cox SM, Hamrah P. A Review of Imaging Biomarkers of the Ocular Surface. *Eye Contact Lens*. 2020 Marzo; 46(2): p. 84-105.
35. Skaper SD. Neurotrophic Factors: AN Overview. *Methods Mol Biol*. 2018; 1727: 1-17.

36. Blanco-Vázquez M, Vázquez A, Fernández I, Novo-Diez A, Martínez-Plaza E, García-Vázquez C, et al. Inflammation-related molecules in tears of patients with chronic ocular pain and dry eye disease. *Exp Eye Res.* 2022 Mar.
37. Gong Q, Zhang S, Jiang L, Lin M, Xu Z, Yu Y, et al. The effect of growth factor on corneal nerve regeneration and dry eye after LASIK. *Exp Eye Res.* 2021 Feb; 203.
38. Lewin GR, Lechner SG, Smith EE. Nerve growth factor and nociception: from experimental embryology to new analgesic therapy. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 220: 251-82.
39. Roy NS, Wei Y, Kuklinski E, Asbell PA. The Growing Need for Validated Biomarkers and Endpoints for Dry Eye Clinical Research. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Mayo; 58(6): 1-19.
40. Wei Y, Epstein SP, Fukuoka S, Birmingham NP, Li XP, Asbell PA. sPLA2-IIa amplifies ocular surface inflammation in the experimental dry eye (DE) BALB/c mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Julio; 52(7): 4780-8.
41. Wei Y, Du Z, Cher D, Afreen J, Cher V, Asbell P. The Role of the Secretory Group IIa Phospholipase A2 (sPLA2-IIa) in Ocular Surface Inflammation. *JSM Ophthalmol.* 2013; 1: 1005.
42. Tong K, Zhou , Beuerman RW, Zhao SZ, Li XR. Association of tear proteins with Meibomian gland disease and dry eye symptoms. *Br J Ophthalmol.* 2011 Junio; 95(6): 848-52.
43. Zahir-Jouzani F, Atyabi F, Mojtavani N. Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiology.* 2017 Septiembre; 24(3): 123-31.
44. Yoon KC, Jeong IY, Park YG, Yang SY. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea.* 2007 Mayo; 26(4): 431-7.
45. Sambursky R, Davitt WF, Latkany R, Tauber S, Starr C, Friedberg M, et al. Sensitivity and specificity of a point-of-care matrix metalloproteinase 9 immunoassay for diagnosing inflammation related to dry eye. *JAMA.* 2013 Enero; 131(1): 24-8.

46. Acera A, Rocha G, Vecino E, Lema I, Durán J. Inflammatory markers in the tears of patients with ocular surface disease. *Ophthalmic Res.* 2008 Octubre; 40(6): 315-21.
47. Wisner A, Dufour E, Messaoudi M, Nejdi , Marcel A, Ungeheuer MN, et al. Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Noviembre; 103(47): 17979-84.
48. Rougeot C, Messaoudi M. Identification of human opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Med Sc.* 2007; 23: 33-35.
49. Rougeot C, Robert F, Menz L, Bisson JF, Messaoudi M. Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *J Physiol Pharmacol.* 2010 Agosto; 61(4): 483-90.
50. Tian XZ, Chen J, Xiong W, He T, Chen Q. Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. *Peptides.* 2009 Julio; 30(7): 1348-1354.
51. Ozdogan M, Gungormus M, Ince Yusufoglu S, Ertem S, Sonmez C, Orhan M. Salivary opiorphin in dental pain: A potential biomarker for dental disease. *Arch Oral Biol.* 2019 Marzo; 99: 15-21.
52. Salarić I SMAI. Opiorphin in burning mouth syndrome patients: a case-control study. *Clin Oral Investig.* 2017 Septiembre; 21(7): 2363-70.
53. Boucher Y, Braud A, Dufour E, Agbo-Godeau S, Baaroun V, Descroix V, et al. Opiorphin levels in fluids of burning mouth syndrome patients: a case-control study. *Clin Oral Investig.* 2017 Septiembre; 21(7): 2157-64.
54. Parida SK, Guruprasad T, Krishnakumar VB, Ravi RP. A study of salivary opiorphin levels using different anesthetic drugs and techniques - A randomized controlled clinical study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2018 Junio; 119(3): 169-71.
55. Ozdogan S, Sonmez C, Yolcu D, Gungormus M. Tear Opiorphin Levels in Ocular Pain Caused by Corneal Foreign Body. *Cornea.* 2020 Noviembre; 39(11): 1377-80.
56. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971; 8: 871-4.

57. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005 diciembre; 51(12): 2415-8.
58. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Técnicas de laboratorio usadas con frecuencia en inmunología. In Abbas A LAPS. *Inmunología celular y molecular*. Novena ed. España: Elsevier; 2018. 531.
59. Yu J, Asche CV, Fairchild C. The economic burden of dry eye disease in the United States: a decision tree analysis. *Cornea*. 2011; 30(4): 379-87.
60. Mehra D, Cohen NK, Galor A. Ocular surface Pain: A narrative review. *Ophthalmol Ther*. 2020; 9: 427-47.
61. Reaux-Le Goazigo A, Poras H, Ben-Dhaou C, Ouimet , Baudouin , Wurm , et al. Dual enkephalinase inhibitor PL265: a novel topical treatment to alleviate corneal pain and inflammation. *Pain*. 2019 Febrero; 160(2): 307-321.
62. Williams JT, Christie MJ, North RA, Roques BP. Potentiation of enkephalin action by peptidase inhibitors in rat locus ceruleus in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987 Octubre; 243(1): 397-401.
63. Kawashima M, Sano , Takechi , Tsubota. Impact of lifestyle intervention on dry eye disease in office workers: a randomized controlled trial. *J Occup Health*. 2018 Julio 25; 60(4): 281-288.
64. Ayaki , Kawashima M, Negishi , Tsubota K. High prevalence of sleep and mood disorders in dry eye patients: survey of 1,000 eye clinic visitors. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015 Marzo 31: 889-94.
65. Tomlinson A, McCann L, Pearce E. Comparison of human tear film osmolarity measured by electrical impedance and freezing point depression techniques. *Cornea*. 2010 Septiembre; 29(9): 1036-41.
66. Brissette A, Drinkwater OJ, Bohm K, Starr C. The utility of a normal tear osmolarity test in patients presenting with dry eye disease like symptoms: A prospective analysis. *Cont Lens Anterior Eye*. 2019 Abril; 42(2): 185-9.
67. Yu L, Yang Z, An M. Lab on the eye: A review of tear-based wearable devices for. *BioScience Trends*. 2019; 13(4): 308-313.

68. Senior M. Novartis signs up for Google smart lens. *Nature Biotechnology*. 2014; 32(9): 856.

69. Kim J, Campbell A, de Ávila B, Wang J. Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nat Biotechnol*. 2019 Abril; 37(4): 389-406.