



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

PAPEL DE LA OSMOLARIDAD EN EL DESARROLLO DE PATOLOGÍA INFLAMATORIA DE LA SUPERFICIE OCULAR

Presentado por Noemí Salgado Arrabal

Tutelado por: Dra. Yolanda Diebold Luque

Tipo de TFG: X Revisión Investigación

En Valladolid a, 20/05/2016

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. JUSTIFICACIÓN	5
3. OBJETIVOS	5
4. METODOLOGÍA	5
5. RESULTADOS	6
5.1. TÉCNICAS DE MEDIDA DE LA OSMOLARIDAD.....	6
5.2 PAPEL DE LA OSMOLARIDAD EN OJO SECO	7
5.2.1. Definición Ojo Seco	7
5.2.2 Etiología y Patología del Ojo Seco	9
5.2.3 Impacto de la Osmolaridad en Ojo Seco	10
5.2.4 Estudios sobre el Papel de la Osmolaridad en Ojo Seco	10
5.2.5 Estudios sobre el Papel de la Osmolaridad en Otras Condiciones de la Superficie Ocular	11
6. DISCUSIÓN	12
7. CONCLUSIONES	13
8. BIBLIOGRAFÍA	14

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi familia y amigos el apoyarme en los momentos más difíciles, y especialmente a mi tutora del TFG, la Dra. Yolanda Diebold Luque, por la paciencia tenida durante la realización de este trabajo y los buenos consejos para poder realizarlo lo mejor posible.

1. INTRODUCCIÓN

La unidad funcional lagrimal está constituida por la película lagrimal, las glándulas lacrimales, los epitelios corneal y conjuntival, las glándulas de Meibomio y todo un sistema de control neuro-hormonal. Todas estas estructuras trabajan juntas de forma coordinada para preservar la integridad de la superficie ocular. Si alguno de estos componentes no funcionara correctamente o se produjera alguna alteración en ellos podría dar lugar a la condición de ojo seco¹.

La superficie ocular está cubierta por la película lagrimal, que es una capa fluida y transparente cuya función principal es la protección de la córnea. Se divide en dos subcapas: la capa lipídica, que hace que la evaporación de la lágrima se produzca más lentamente, y la capa muco-acuosa, que se encarga de la protección de los epitelios corneal y conjuntival mediante la captura y el arrastre de partículas de todo tipo. En conjunto, la lágrima ayuda a que llegue la cantidad de oxígeno adecuada para el metabolismo corneal.

La capa lipídica representa el 0'02% de la película lagrimal, aunque su espesor varía con el cierre de los párpados, produciéndose una compresión de esta. Está formada principalmente por lípidos secretados por las glándulas de Meibomio.

La capa mucoacuosa representa el 99'98% restante de la lágrima, y se encuentra en contacto con el epitelio corneo- conjuntival. La mayor parte de esta capa es acuosa. En la parte más interna de la capa se encuentran mucinas y células caliciformes.

El volumen normal de lágrima en un adulto está entre 6-9µl. Su producción normal es de 1-2µl/min, aunque tras una estimulación refleja puede aumentarse hasta cien veces. Igualmente, se ve disminuida la producción tras el sueño o la anestesia. De un modo normal la eliminación de la lágrima se produce de varias formas: se reabsorbe a través de la superficie conjuntival, se evapora de la zona superficial o se drena a través del sistema de drenaje lagrimal. La lágrima contiene una importante cantidad de péptidos proteínas y moléculas diversas, cuyas concentraciones son muy relevantes para la fisiopatología de la superficie ocular y de la unidad funcional lagrimal en su conjunto (figura 1).

La integridad de la unidad funcional lagrimal es necesaria para un normal funcionamiento del ojo y del sistema visual. Las conexiones nerviosas y las hormonas sistémicas también ayudan a mantener un equilibrio homeostático de la superficie ocular.²

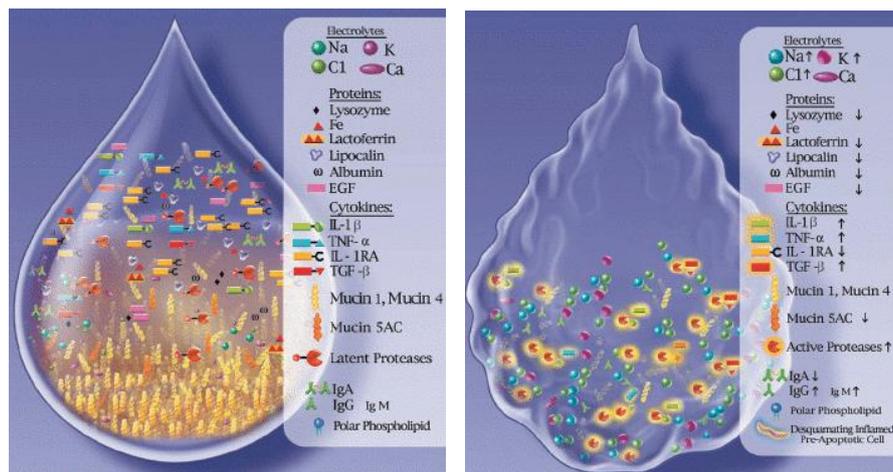


Figura 1. Esquema de la composición de una lágrima normal (izquierda) y otra de composición alterada (derecha). Tomado de Pflugfelder SC, Beuerman R, Stern ME. Dry Eye and Ocular Surface Disorders. New York, 2004.

La osmolaridad es la concentración de partículas osmóticamente activas que hay una disolución medidas en miliosmoles por litro de disolución. El proceso por el cual dos disoluciones de diferente concentración separadas por una membrana permeable igualan las concentraciones gracias al paso del disolvente a través de la membrana es conocido como ósmosis.

La regulación osmótica de la superficie ocular está afectada directamente por los cambios producidos en la película lagrimal. La osmolaridad de la película lagrimal en un ojo sano oscila entre 290-310 mOsm/L. Cuando estos valores aumentan, produciéndose una hiperosmolaridad (a partir de 310 mOsm/L), se acepta que es un signo de patología ocular. Además, cuando hay hiperosmolaridad se produce una descamación de las células del epitelio corneal y conjuntival. Esto provoca también una disminución de la densidad celular inducida por la salida de líquido de las células hacia la película lagrimal.³

En los años anteriores a 1975 las técnicas que había para recoger y estudiar el fluido lagrimal necesitaban muestras demasiado grandes, por lo que el estudio de cómo afectaba la osmolaridad en ciertas patologías no avanzó demasiado. Cuando avanzaron las técnicas para medir las osmolaridad de la lágrima, pudiendo obtenerse muestras más pequeñas y sin forzar al ojo a una secreción lagrimal mayor, se realizaron varios estudios para determinar si la osmolaridad afectaba en las patologías inflamatorias de la superficie ocular.

2. JUSTIFICACIÓN

La principal enfermedad en la que hay una alteración en la osmolaridad es el ojo seco. Podría afectar a otras patologías inflamatorias pero actualmente el principal debate existente se centra en esta patología. Hay cierta controversia en las publicaciones científicas y entre algunos profesionales en torno al papel real que juega la osmolaridad en desarrollo del ojo seco.

Por ello, se planteó la realización de este trabajo de investigación bibliográfica sobre el papel que la osmolaridad tiene en la patología de ojo seco, y poder determinar si afecta como causa o como efecto de esta.

3. OBJETIVOS

Este trabajo tiene dos objetivos:

- 1) Obtener una visión objetiva de un tema sobre el que hay que actualmente una cierta controversia dentro de la comunidad científica como es el papel de la osmolaridad en el desarrollo de la patología inflamatoria de la superficie ocular.
- 2) A partir de esa visión de conjunto, poder llegar a una conclusión en la que determinar si afecta o no, y en caso de afectar si lo hace como causa de la patología o en su defecto como efecto de esta.

4. METODOLOGÍA

Se ha realizado una búsqueda de artículos en PubMed y Google Scholar entre los años 1978 y 2016.

Inicialmente se consultaron artículos con fechas anteriores al año 1980 pero se decidió no incluirlos dado los avances que se produjeron en torno a esa fecha en la obtención de muestras de lágrima para poder medir la osmolaridad lagrimal.

Se clasificaron los artículos encontrados en grupos sobre los diferentes apartados de esta revisión y, dentro de ellos, se seleccionaron los más relevantes.

Principalmente se han encontrado 25 artículos, de los que relevantes para la realización de esta revisión fueron 18.

También se han consultado algunas revistas científicas como Superficie Ocular y Córnea, de la que se obtuvo información relevante para la introducción de esta revisión.

Los términos utilizados para realizar esta búsqueda de publicaciones han sido *tear film, osmolarity, dry eye, ocular surface, inflammation, review* en inglés. En español se han utilizado los términos película lagrimal, osmolaridad, superficie ocular, inflamación, revisión, unidad funcional lagrimal.

5. RESULTADOS

Inicialmente se realizó la búsqueda sobre varias patologías inflamatorias que pudieran estar afectadas por la osmolaridad, pero no se encontró información. Estas patologías fueron la conjuntivitis, pinguécula, pterigion y blefaritis. Se tomó la decisión de no incluirlas en esta revisión y centrarse exclusivamente en el papel de la osmolaridad en el ojo seco.

5.1 TÉCNICAS DE MEDIDA DE LA OSMOLARIDAD

En la actualidad existen dos técnicas principales para medir la osmolaridad. La primera de ellas consiste en tomar una pequeña muestra con un capilar apoyando un microchip sobre un menisco lagrimal, que da una medida directamente de la osmolaridad sin tener que enviar las muestras al laboratorio. La otra técnica consiste en tomar también una pequeña muestra de lágrima con capilares o papel de filtro que, utilizando un osmómetro, dan los valores de la osmolaridad. Ambas técnicas permiten obtener valores partiendo de pequeñas muestras, sin forzar al ojo a una secreción lagrimal mayor.⁴

La medida de la osmolaridad⁵ se mide a partir de la determinación de una de las principales propiedades de la disolución: punto de congelación, punto de ebullición, presión de vapor y presión osmótica. Dado que la medición del punto de ebullición y la presión osmótica son limitaciones a la hora de medir la osmolaridad, se utiliza la disminución del punto de congelación y de presión de vapor.

Para realizarlo a través del punto de congelación, la muestra se enfría por debajo de este punto para cristalizarla y que el calor de fusión sea liberado. En este momento la muestra alcanza una temperatura estable que se traduce en la osmolaridad. Este tipo de osmómetros no son adecuados para soluciones muy viscosas, ya que puede dar errores al medir el punto de congelación y traducirlo a osmolaridad matemáticamente. Añadir un mol de soluto a un kilogramo de disolución hace que el punto de congelación se reduzca 1'86 °C.

La medición de la osmolaridad a partir del punto de presión de vapor se basa en la correlación que existe entre la osmolaridad y la disminución de la presión de vapor al añadir soluto al disolvente. Añadir un mol de soluto a un kilogramo de disolución hará que la presión de vapor disminuya 0'3 mmHg. Para medir la osmolaridad por este método se equilibra la temperatura de la

disolución y se introduce en ella un higrómetro térmico de alambre fino. Posteriormente se enfría el alambre hasta que se forman gotitas de agua producidas por condensación. La condensación finaliza cuando el alambre alcanza la temperatura del punto de rocío.

La diferencia entre el valor tomado de la temperatura en el punto de rocío y el valor obtenido previamente de la temperatura de la disolución nos permite calcular el valor de la osmolaridad de esa disolución.

Anteriormente las técnicas existentes generaban una secreción excesiva de lágrima, por lo que era más difícil poder obtener unos valores significativos de la osmolaridad en la película lagrimal. Con las técnicas actuales se obtienen valores más exactos, que permiten determinar si existe alguna patología en la superficie ocular y, principalmente, comprobar si existe ojo seco.

5.2 PAPEL DE LA OSMOLARIDAD EN OJO SECO

5.2.1 DEFINICIÓN OJO SECO

El síndrome de ojo seco es una enfermedad inflamatoria de la superficie ocular. A lo largo del tiempo ha habido muchas definiciones, por lo que no es fácil encontrar una definición que englobe todos los aspectos necesarios para que ésta sea completa.

La mejor definición a nivel global, a la que llegaron en el Informe del Subcomité para Metodología de Diagnóstico del Taller Internacional sobre Ojo Seco en 2007 ⁶ y que se podría considerar más completa es la siguiente:

“El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la superficie ocular que provoca síntomas de incomodidad, perturbación visual e inestabilidad de la película lagrimal, con daño potencial a la superficie ocular. Está acompañada por un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular.”

En esta definición ya se consideran los dos factores más importantes de los que se va a tratar en este trabajo, que son el aumento de la osmolaridad de la película lagrimal y la inflamación de la superficie ocular.

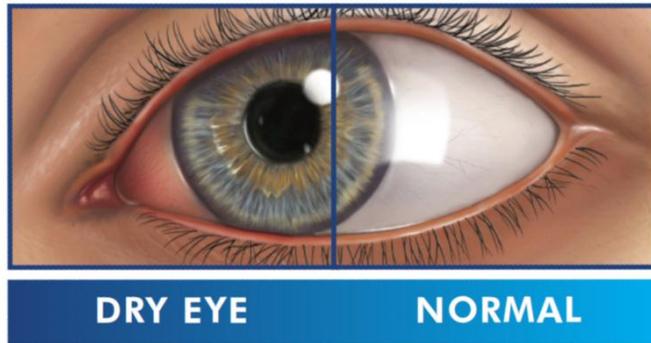


Figura 2. Superficie ocular afectada por ojo seco (izquierda) y normal (derecha). Scope Ophthalmics, 2014

CLASIFICACIÓN DEL OJO SECO

Existen varias clasificaciones de ojo seco pero se hará referencia a dos de ellas. La primera sería si el paciente presenta o no síntomas, y la segunda, dentro de un ojo seco sintomático, sería ojo seco evaporativo u ojo seco por falta de secreción acuosa.

Si es asintomático pueden presentarse varios factores para determinarlo, como son la hiperosmolaridad lagrimal, la inestabilidad lagrimal, la presencia de manchas en la superficie ocular interpalpebral o la reducción de la producción lagrimal.

Muchas veces no es fácil poder detectar síntomas de ojo seco en algunos pacientes sin hacer un cuestionario apropiado porque los pacientes los consideran síntomas propios del envejecimiento.

El síndrome de ojo seco sintomático puede diferenciarse en ojo seco evaporativo y ojo seco por falta de secreción acuosa.

Estos pueden coexistir e interactuar, pero también pueden aparecer de forma aislada, lo que sería más grave. Además de la posibilidad de que aparezcan simultáneamente el síndrome de ojo seco sintomático y evaporativo pueden darse otras patologías de la superficie ocular que afecten gravemente al ojo, como una enfermedad sintomática del párpado, dentro de la que se incluye la blefaritis anterior y la disfunción de las glándulas de Meibomio, o una conjuntivitis o queratitis sintomática.

El ojo seco por falta de secreción acuosa se produce por una disminución o un fallo en el transporte de la lágrima. Se clasifica a su vez en síndrome de Sjögren, que puede ser primario o secundario, y en ausencia de síndrome de Sjögren, en el que se produce una obstrucción o deficiencia de la glándula lagrimal.

El ojo seco evaporativo se subdivide a su vez en función de los factores por los que se produce en intrínsecos, como son la blefaritis, una alteración del parpadeo, de la apertura palpebral, de la superficie ocular, y en extrínsecos, como son una deficiencia de vitamina A, conservantes, medicación tópica, lentes de contacto o una enfermedad de la superficie ocular o alergia.

Los principales síntomas que refiere un paciente que padece ojo seco son irritación, sensación de cuerpo extraño, quemazón, visión borrosa transitoria, cierta fotofobia y síntomas de sequedad en otras mucosas.

Estos síntomas empeoran cuando se trabaja con pantallas, en ambientes secos y contaminados, conduciendo largas distancias día/noche, usuarios de lentes de contacto o trabajos que requieren atención prolongada con un microscopio, leer, dibujar, etc.

5.2.2 ETIOLOGÍA Y PATOLOGÍA DEL OJO SECO

En el ojo seco se produce una pérdida del mecanismo homeostático de la unidad funcional lagrimal. Esta pérdida puede producirse por factores externos, como los factores ambientales, infecciones o traumatismos, o por factores internos, como enfermedades inflamatorias, reacciones adversas a fármacos, etc.

En un ojo sano la homeostasis se recupera mediante la activación de mediadores de defensa y tróficos, mientras que en un ojo seco no se produce esta recuperación porque el sistema se descompensa y se ven alterados los electrolitos, la osmolaridad y los mediadores inflamatorios.

Se han encontrado estudios de laboratorio que afirman que un aumento del 1% la osmolaridad de la película lagrimal puede provocar lesiones epiteliales y alterar el flujo normal de líquidos hacia el estroma.⁷

La hiperosmolaridad produce lesiones en el epitelio de la superficie ocular, ya que activa la cascada de reacciones inflamatorias y produce la liberación de una serie de citoquinas proinflamatorias.⁸ Las lesiones epiteliales son principalmente la muerte de las células epiteliales, la pérdida de células calciformes y una alteración de la expresión de las mucinas presentes en la superficie ocular. Todo esto provoca una inestabilidad de la película lagrimal, produciéndose así un círculo vicioso.

Etiológicamente hablando la hiperosmolaridad se produce principalmente cuando la película lagrimal se reduce por una insuficiencia de la glándula lagrimal o un aumento de la evaporación lagrimal. Cuando la evaporación lagrimal se ve aumentada se debe normalmente a que las condiciones ambientales no son favorables para la superficie ocular, por

ejemplo, cuando hay poca humedad ambiental, humo, aire acondicionado, etc., o a una disfunción de las glándulas de Meibomio.

El uso crónico de las lentes de contacto, el haberse sometido a cirugía refractiva corneal, abusar de anestésicos o la queratopatía neurotrófica pueden desencadenar una hiposecreción lagrimal relacionada con la disminución de la sensibilidad corneal y una disminución de la secreción lagrimal.

5.2.3 IMPACTO DE LA OSMOLARIDAD EN OJO SECO

Cuando se altera la secreción de la lágrima hace que la concentración de esta sea hiperosmolar y los niveles de electrolitos estén también alterados.⁹ Esta hiperosmolaridad daña las células del epitelio y hace que se produzca la cascada inflamatoria.¹⁰

El aumento de la osmolaridad induce una inflamación de la superficie ocular que conduce a la interrupción de la calidad y la cantidad de lágrima. Una función patológica de la película lagrimal y la inflamación de la superficie ocular afecta a la arcada neural y aumenta la apoptosis de las células de la superficie ocular, creando así un ciclo de alteraciones para la superficie ocular al provocar lágrimas inestables e hiperosmolares.

5.2.4 ESTUDIOS SOBRE EL PAPEL DE LA OSMOLARIDAD EN OJO SECO

5.2.4.1 INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

Se han obtenido resultados sobre el papel que juega la osmolaridad en la superficie ocular en diferentes estudios realizados en ojo de conejo. Un primer estudio realizado por Gilbard y colaboradores en 1982 concluye que en ojo seco aumenta la osmolaridad de la película lagrimal debido al aumento de la velocidad de flujo de la lágrima y la evaporación que se produce en la superficie ocular.¹¹

Los demás estudios considerados relevantes para esta revisión a partir de esta fecha fueron realizados en humanos. Los demás estudios se centraban principalmente en los valores de corte a establecer para determinar si un paciente presentaba o no ojo seco.

5.2.4.2 INVESTIGACIÓN CON SERES HUMANOS

Uno de los estudios de Gilbard y colaboradores, realizado en humanos, tanto con ojos normales como afectados de ojo seco, determinó que la hiperosmolaridad de la película lagrimal en el ojo seco desempeña un papel importante induciendo patologías inflamatorias en la conjuntiva y en la córnea.¹²

Otros autores¹³ indican que la hiperosmolaridad puede contribuir a procesos inflamatorios de la superficie ocular, causando daño epitelial al inducir la liberación de citoquinas de las células epiteliales. La consideran uno de los desencadenantes de la patología inflamatoria ocular junto a la disminución de la producción de la película lagrimal.

En otro de los estudios encontrados¹⁴ se determinó que la hiperosmolaridad lagrimal puede dar un diagnóstico fiable de la patología del ojo seco.

Otros de los estudios consultados¹⁵ señalan al aumento de la osmolaridad en los pacientes de ojo seco como precursor del inicio de la inflamación de la superficie ocular y del comienzo de las quejas de los pacientes afectados por esta patología.

Se ha observado también que la osmolaridad en la película lagrimal se ve reducida después de un periodo en el que permanecemos dormidos y va aumentando a lo largo del día.¹⁶

En cuanto al género de las personas se ha observado que no influye en los valores de osmolaridad sino que son similares tanto en hombres como en mujeres. Si que se ha visto que, principalmente en las mujeres, la osmolaridad disminuye con la edad.¹⁷

5.2.5 ESTUDIOS SOBRE EL PAPEL DE LA OSMOLARIDAD EN OTRAS CONDICIONES DE LA SUPERFICIE OCULAR

Actualmente hay estudios que indican que un uso prolongado de lentes de contacto produce un aumento de la osmolaridad en la superficie ocular, y que esto puede desencadenar un ojo seco.¹⁸ Este aumento hace que la movilidad de la lente se vea reducida y la adherencia de ésta a la superficie ocular se vea aumentada. Al insertar las lentes de contacto en el ojo se ocasiona una reducción inicial de la osmolaridad al producirse una hipersecreción lagrimal por la irritación ocasionada en el ojo. Una vez que se estabiliza la superficie ocular la osmolaridad aumenta.

Se ha observado también un aumento de la osmolaridad en pacientes que se han sometido a cirugía de cataratas, mientras que ésta no se ha visto tan aumentada en pacientes más jóvenes que se han sometido a cirugía láser.

6. DISCUSIÓN

En la actualidad existe una diversidad de opiniones sobre el papel de la osmolaridad en las patologías inflamatorias de la superficie ocular. En la gran mayoría de los artículos y publicaciones revisados están de acuerdo en la importancia de la osmolaridad tanto para diagnosticar ciertas patologías como para desencadenar ~~de su gran influencia en las~~ patología inflamatoria en la superficie ocular.

Uno de los grandes avances en el diagnóstico de la patología de ojo seco ha sido el utilizar los valores de la osmolaridad para determinar si el paciente tenía o no esta afección.

La mayor parte de los investigadores piensan que si que afecta una hiperosmolaridad en la superficie ocular y que al producirse desencadena una serie de factores que facilitan la inflamación. El mayor debate existente es si el papel que juega es como causa o como efecto de la inflamación.

La teoría más aceptada y con más investigadores que la secundan es que el papel que juega la osmolaridad es el de causa de que se produzca la inflamación y no el efecto de ésta.

En el ojo seco al producirse un aumento de la osmolaridad en la película lagrimal empiezan a producirse los síntomas relacionados con esta patología y se desencadena así la cadena inflamatoria al verse alterados los electrolitos presentes en la película lagrimal.

La teoría de que el aumento de la osmolaridad es el efecto que se produce al manifestarse la patología de ojo seco está menos respaldada, ya que una patología inflamatoria no desencadena un aumento de la osmolaridad lagrimal, sino que sucede inversamente.

Con respecto a que la osmolaridad no juegue ningún papel en las patologías inflamatorias de la superficie ocular no se han encontrado autores que la secunden en las fechas en las que se incluyen los artículos de esta revisión.

Esto hace pensar que los avances en la toma de muestras y en la medición de la osmolaridad han sido determinantes a la hora de definir el papel que en verdad juega la osmolaridad en la superficie ocular.

Este debate en la comunidad científica surge con los avances tecnológicos que permiten un estudio exhaustivo de la osmolaridad en diferentes momentos de la patología de la superficie ocular y el poder medirla tomando pequeñas cantidades de lágrima.

7. CONCLUSIONES

Se ha llegado a la conclusión tras realizar esta revisión de que la osmolaridad juega un papel muy importante en el ojo seco y que un aumento de esta favorece la inflamación de la superficie ocular. Actualmente se considera el valor de la osmolaridad como un método de diagnóstico del ojo seco.

Como se ha mencionado durante la discusión de esta revisión los pacientes afectados por la patología del ojo seco presentan una serie de síntomas que desencadenan una alteración de los electrolitos presentes en la lágrima y un aumento de la osmolaridad de la película lagrimal. Esto produce la activación de la cadena inflamatoria, haciendo que se active el proceso inflamatorio ocular como consecuencia del aumento de la osmolaridad en estos pacientes.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Stern ME, Gao J, Siemasko KF. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004; 78: 409-416
2. Rivas L, Murube J. Análisis bioquímico de la lágrima. <http://www.oftalmo.com/publicaciones/ojoseco/cap30.htm> (10 de Abril de 2016)
3. Fraile Maya J. Osmolaridad lagrimal, clave en el diagnóstico de ojo seco. *Superficie Ocular y Córnea* Junio 2010;5
4. Merayo-Llove J, Torres R, Berra A. Estudios de laboratorio en la superficie ocular. 2004;2
5. Stahl U, Willcox M, Stapleton F. Osmolality and tear film dynamics. *Clin Exp Optom* 2012; 95: 1: 3-11
6. DEWS. Informe del Subcomité para Metodologías de Diagnóstico del Taller Internacional sobre Ojo Seco. Metodologías de Diagnóstico. *The Ocular Surface* 2007; 5:2
7. Aguilar AJ. Tears osmolarity in dry eye. *Arq Bras Oftalmol* 2008; 69-71
8. Días Valle D, Benitez del Castillo JM. Fisiopatología del ojo seco. *Boletín de la Soc. Oftalmología de Madrid* 2007; 47
9. Berra A, Berra M. Hyperosmolarity Induce Nuclear Translocation of NF- κ B in Human Conjunctival Epithelial Cells. *Invest. Ophthalmol* 2005
10. Gilbard JP, Rossi SR. An electrolyte-based solution that increases corneal glycogen and conjunctival goblet-cell density in a rabbit model for keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology* 1992; 99: 600-604
11. Gilbard Jp, Dartt DA. Changes in rabbit lacrimal gland fluid osmolarity with flow rate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982;23: 804-806
12. Gilbard JP y Cols. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1978;96: 677-681
13. Born AJ, Tiffany JM, Yokoi N, Gouveia MS. Using osmolarity to diagnose dry eye: A compartmental hypothesis and Review of Our assumptions. *Lacrimal Gland. Tear film an Dry Eye Syndromes* 2002;3
14. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, MCFyden A. Tear Film Osmolarity: Determination of a Referent for Dry Eye Diagnosis. 2016
15. Potvin R, Makari S, Rapuano CJ. Tear Film osmolarity and dry eye disease: a review os the literatura. *Clinical Ophtalmology* 2015
16. Nelson JD, Wright JC. Tear film osmolarity determination: An evaluation of potential errors in measurement. *Curr Eye Res* 1986;5: 677-681
17. Benjamin WJ, Hill RM. Human tears: Osmotic characterists. *Invest Ophtalmol Vis Sci* 1983; 24: 1624-1626
18. Nichols JJ, Sinott LT. Tear film, contact lens and patient-related factors associated with contact lens- related dry eye. *Invest Ophtalmol Vis Sci* 2006; 47:1319-1328