



Universidad de Valladolid



'INTERVALOS DE REFERENCIA PARA LOS UMBRALES DE SENSIBILIDAD OBTENIDOS MEDIANTE ESTESIOMETRÍA CORNEAL DE NO CONTACTO'.

Trabajo de Fin de Máster

Alumno

Pablo Arlanzón Lope

Directoras

María Jesús González García, PhD, Óptico-Optometrista

Itziar Fernández Martínez, PhD, Estadística

Índice

Aceptación del Comité de ética	4
Aceptación de la comisión de investigación del IOBA	5
Autorización del tutor	7
Currículum Vitae.....	8
Resumen.....	9
Abstract	10
1. Introducción	11
1.1. Medida de la sensibilidad corneal.....	13
1.2. Intervalos de referencia	15
1.3. Justificación	16
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivos	17
3.1. Objetivo general.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. Metodología.....	18
4.1. Tipo de estudio.....	18
4.2. Muestra	18
4.3. Diseño del estudio.....	19
4.4. Pruebas clínicas	19
5. Análisis estadístico	23
6. Resultados	26
6.1. Descriptivos.....	26
6.2. Ajuste de los modelos	26
6.3. Análisis residual.....	27
6.4. Reajuste para el umbral calor	29
6.5. Intervalos de referencia	30
6.6. Muestra externa.....	32
7. Discusión	33
8. Conclusiones.....	36
9. Bibliografía	37
Anexos.....	39

Resumen

Objetivo: el objetivo de este trabajo fue determinar los intervalos de referencia de sensibilidad corneal en individuos sin patología ocular mediante el estesiómetro de no contacto de Belmonte.

Métodos: se incluyó una muestra de 50 sujetos sin patología ocular a los que se les midió la sensibilidad mecánica y térmica al calor y al frío mediante el estesiómetro corneal de no contacto de Belmonte. El estudio consistió en una única visita. Los pacientes analizados se unieron a una muestra previa de 77 sujetos, de diferentes estudios realizados previamente en el IOBA, y usando el mismo aparato y la misma metodología, por lo que finalmente se analizó una muestra de 127 individuos. Se escogió aleatoriamente un ojo por individuo. Para hallar los intervalos de referencia se utilizaron los modelos Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape. Estos modelos permiten estimar curvas de percentiles dependientes de otras variables como son el sexo y la edad. El modelo que menor criterio de información de Akaike proporcionaba fue elegido para la creación de los intervalos. La validez del modelo se comprobó utilizando los residuos cuantil aleatorizados. Para evaluar la capacidad de clasificación del modelo se utilizaron los otros ojos de la muestra de 50 sujetos.

Resultados: la muestra total presentó una edad de 38 ± 15.58 años con un 50.4% mujeres y un 49.6% hombres. El rango de normalidad de los intervalos ocupa casi todo el rango de medida del aparato. Se halló una dependencia de la edad y del sexo para el umbral mecánico y el térmico al calor mientras que el umbral térmico al frío solo dependía de la edad. La sensibilidad mecánica y térmica al frío parece aumentar según la población envejece mientras que el comportamiento de la sensibilidad al calor es más cambiante ya que parece disminuir hasta la tercera década para luego aumentar ligeramente hasta la sexta década y luego volver a disminuir. La capacidad de clasificación de todos los umbrales no fue estadísticamente distinta del 90%.

Conclusiones: se ha conseguido estimar los intervalos de referencia para los umbrales de sensibilidad mecánica y térmica al calor y al frío ajustados para la edad y el sexo. Como el rango de normalidad es muy amplio se propone que esta prueba sea utilizada para monitorizar la sensibilidad del paciente a lo largo del tiempo. Un aumento del tamaño muestral podría ayudar a reducir la variabilidad de los intervalos y mejorar la capacidad diagnóstica de la prueba.

Abstract

Purpose: The purpose of this work was to determine the reference intervals for corneal sensitivity in a healthy population using the Belmonte's non-contact aesthesiometer.

Methods: a sample of 50 healthy subjects was included. The mechanical and thermal sensitivity were evaluated using the Belmonte's non-contact aesthesiometer. The study consisted of a single visit. This sample was then added to a previous pool of 77 subjects from different studies performed previously at IOBA using the same device and same methodology, so the total sample was of 127 individuals. One eye per individual was randomly assigned to perform the statistical analysis. To create the reference intervals the Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape were used. These models allow to estimate percentile curves which are dependent of other variables such as age and sex. The model which provided the minor Akaike information criterion was chosen to create the intervals. The capacity of classification of the model was evaluated by using the other eyes of the 50 subjects' sample.

Results: the total sample was constituted by subjects with a mean age of 38 ± 15.58 years with 50.4% of them being female and 49.6% male. The normality range of the intervals spreads nearly the whole range of measure of the device. A dependence of age and sex for the mechanical and thermal heat threshold was found while the thermal cold threshold was only dependent of age. The mechanical and thermal cold sensitivity seems to increase as people get older while the behaviour of the sensitivity to heat is more changing being found that it seems to diminish until third decade and then to rise gently until the sixth decade diminishing again thereafter. The capacity of classification of the thresholds was not statistically different of 90%.

Conclusions: the reference intervals for mechanical, thermal heat and thermal cold sensitivity adjusted to age and sex have been estimated. As the normality range is very wide we propose this test to be used as a way of monitoring the patient's sensitivity through time. An increase in sample size could help to reduce the variability of the intervals and improve the diagnostic capacity of the test.

1. Introducción

La córnea es un tejido avascular perteneciente a la capa externa del ojo, y es la responsable de las dos terceras partes de la potencia de este debido a su transparencia y curvatura. Además es uno de los tejidos más densamente inervados del organismo.¹

El origen de los nervios corneales es diferente en función de si son sensitivos o autónomos. Los primeros provienen en su mayoría de la rama oftálmica del trigémino aunque la parte inferior de la córnea también recibe su inervación de la rama maxilar del trigémino.² La inervación simpática se recibe del ganglio cervical superior aunque la presencia de este tipo de inervación es bastante escasa si la comparamos con la sensitiva.²

Los nervios corneales presentan una estructura radial en el estroma y las fibras siguen unas direcciones concretas, siendo mayoritariamente la 6-12, 5-11 o 7-1. Además en el ápex corneal los paquetes de fibras del plexo subbasal se orientan siguiendo una dirección supero-inferior mientras que en la zona circundante se orientan en dirección naso-temporal como puede observarse en la figura 1.²

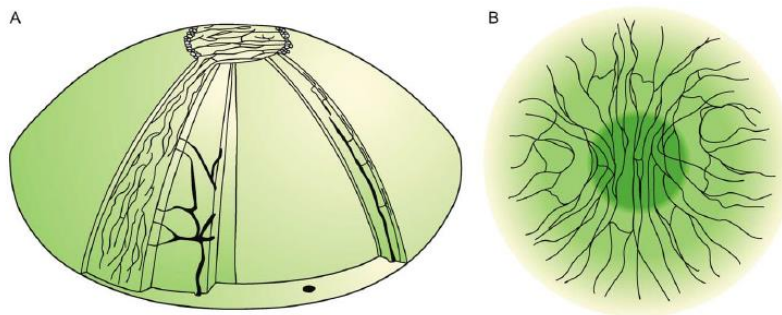


Figura 1. Distribución de los nervios corneales.²

Los nervios corneales provienen de la esclera o el cuerpo ciliar.³ Estos nervios se organizan en diferentes plexos siendo los principales el estromal, el subepitelial y el subbasal.^{2,4} Entran en la córnea por la periferia de manera radial, una vez que han perdido mayoritariamente sus cubiertas de mielina un milímetro (mm) después de haber traspasado el limbo^{2,5} para no impedir la transparencia corneal. Una vez en córnea solo están rodeados de células de Schwann. Los nervios avanzan hasta el centro de la córnea por la mitad del estroma en la periferia y por el tercio anterior en el centro formando el plexo nervioso estromal.⁴ Este plexo es más denso y anatómicamente complejo en la periferia corneal y decrece según se acerca al centro.⁴ A continuación estas fibras ascienden para terminar su recorrido como terminaciones libres en el estroma aunque la mayoría se colocan en la estrecha banda de estroma anterior que se localiza justo debajo de la capa de Bowman para dar lugar al plexo nervioso subepitelial.

El plexo nervioso subepitelial está formado por dos tipos de fibras; unas de trayectoria recta o curvilínea,⁴ que son las que girarán 90° y ascenderán atravesando la capa de Bowman,^{2,4} y otras de trayectoria tortuosa que debido a las frecuentes anastomosis entre ellas⁴ forman un patrón de rejilla que es más denso en la periferia y menos denso en córnea central. Cierta número de fibras de este plexo también acaba como terminaciones libres justo debajo del epitelio.⁴ La mayoría de los sitios de perforación en la capa de Bowman se encuentran en la periferia y medio periferia mientras que relativamente pocos se pueden encontrar en córnea central de la misma como se puede observar en la figura 2.⁴ Una vez atravesada la capa de Bowman los nervios se dividen en ramas más finas y vuelven a girar 90° para avanzar

paralelamente a la superficie de la córnea entre la membrana basal y las células basales del epitelio formando el plexo subbasal.

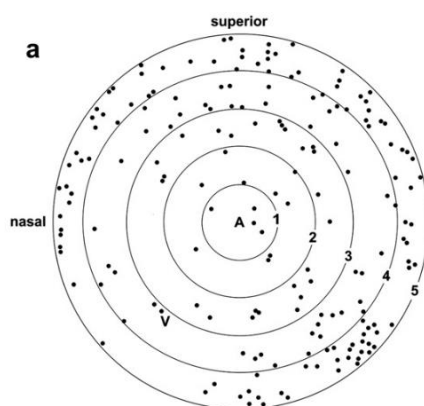


Figura 2. Sitios de perforación en la capa de Bowman⁴. Los números de 1 al 5 indican la distancia en mm al ápex corneal.

Las fibras del plexo subbasal presentan anastomosis frecuentes en todo su recorrido siendo este el motivo de la densidad y homogeneidad del plexo. Además, estas uniones hacen que sea muy difícil distinguir los límites entre unas fibras y otras. Al contrario que en los otros plexos, el plexo subbasal es más denso y anatómicamente complejo en el centro de la córnea mientras que en la periferia es menos compacto, con menos anastomosis y más separado entre sí.⁴ Así mismo, este plexo forma un patrón tipo de espiral y su centro se coloca 2,5 mm inferonasal del ápex de la córnea aproximadamente.⁴ Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se forma este patrón no se conoce aún con exactitud.⁴ Algunas de estas finas ramas acaban por ascender de forma oblicua hasta el epitelio de la córnea donde finalmente terminan. Un epitelio de córnea humano presenta aproximadamente 7000 nociceptores por mm^2 .² No obstante, otros autores proponen una densidad de nociceptores bastante más reducida, situándose en torno a los 550 nociceptores por mm^2 .^{4,5}

Los nervios corneales pueden clasificarse de dos maneras diferentes en función de los patrones de mielinización y del tipo de estímulo que conducen.⁵

En función de los patrones de mielinización podemos distinguir dos tipos:

1. Las fibras A-delta son fibras finamente mielinizadas y que conducen los estímulos de manera rápida a una velocidad media de 4 m/s.⁵
2. Las fibras C son fibras no mielinizadas y que conducen los estímulos de manera lenta a una velocidad media menor de 2 m/s.⁵

Además, si tenemos en cuenta los estímulos que activan las terminaciones de estos nervios podemos distinguir tres tipos de fibras:

1. Fibras mecanonociceptoras: representan el 20% del total de fibras de la córnea y se encargan de convertir en dolor agudo la respuesta mecánica que se aplica a la córnea. La mayoría son del tipo A-delta.⁵
2. Fibras nociceptoras polimodales: representan el 70% de las fibras totales de la córnea y su función es convertir en dolor agudo y mantenido la respuesta a estímulos de calor, mecánicos, químicos exógenos y de inflamación endógena. La mayoría son de tipo C.⁵
3. Fibras frías: representan el 10% de las fibras totales de la córnea y se estimulan como respuesta a la evaporación corneal, aplicación de aire o soluciones frías a la córnea o

cuando la temperatura corneal baja de 33 °C. Consisten en una mezcla entre fibras C y A-delta.⁵

La función de esta inervación es compleja siendo esencial para la protección y el mantenimiento de una córnea sana.⁶ Además una denervación de este tejido resulta en la aparición de diversas patologías, siendo una de ellas la queratitis neurotrófica.^{2,5} Las fibras nerviosas interactúan con las células epiteliales liberando factores tróficos que ayudan en la reepitelización y, a su vez, las células epiteliales liberan sustancias que ayudan a la supervivencia neural.² Además recientemente se ha descubierto que las fibras frías son responsables de la secreción basal de la lágrima ya que detectan leves fluctuaciones de temperatura mediante los canales iónicos receptores de potencial transitorio 8 (TRPM8).⁵ Esta función es muy importante a la hora de mantener la integridad de la superficie ocular. Numerosas enfermedades pueden afectar a la sensibilidad corneal como son el ojo seco, la conjuntivitis, queratitis, uveítis o la cirugía refractiva. Es por esto que la medida de la sensibilidad corneal nos puede ayudar a la hora de observar alteraciones en estas patologías.⁷

1.1. Medida de la sensibilidad corneal

Von Frey, en 1894, fue el primero en medir la sensibilidad corneal utilizando pelos de caballo de diversas longitudes.⁸ En 1955 se fue perfeccionado esta técnica y se diseñó un instrumento que utilizaba un hilo de nylon para medir la sensibilidad. Cochet y Bonnet⁸⁻¹⁰ en 1960 modificaron el aparato hasta diseñar el estesiómetro de contacto que es ampliamente utilizado hoy en día. Este instrumento consiste en un filamento de nylon de longitud variable. De esta manera, modificando la longitud del filamento se puede modificar la intensidad del estímulo aplicado. Este instrumento es capaz de medir la sensibilidad mecánica de la córnea,⁹ sin embargo, presenta una serie de limitaciones, entre las que destacan la baja repetibilidad de los estímulos, la posibilidad de dañar el epitelio corneal, las variaciones producidas por la humedad del ambiente, el envejecimiento del propio filamento de nylon o la imposibilidad de realizar un enmascaramiento de la prueba. Además en muchos de los sujetos hasta el estímulo más leve puede ser supraumbral.¹⁰ En la figura 3 se muestra este estesiómetro.

Figura 3. Estesiómetro de Cochet-Bonnet.¹⁰



A partir de este momento se empezaron a desarrollar diferentes estesiómetros que se muestran en la tabla 1 utilizando distintos sistemas de medida, tanto de contacto como de no contacto.⁸

Tabla 1. Métodos de medida de la sensibilidad corneal.⁸

Año	Creadores	Método de medida	Tipo de sensibilidad medida
1894	Von Frey	Pelo de caballo	Mecánica
1900	Toulouse and Vachide	Filamentos de aluminio	Mecánica
1937	Nafe and Wagoner	Barras metálicas	Mecánica
1943	Goldberg	Aire a presión	Mecánica
1951	Jalavisto et al.	Aire a presión	Mecánica
1955	Boberg-Ans	Filamento de nylon	Mecánica
1960	Cochet-Bonnet	Filamento de nylon	Mecánica
1970	Larson	Dispositivo electromecánico con alambre de platino	Mecánica
1980	Draeger	Estesiómetro óptico con estímulos controlados eléctricamente	Mecánica
1989	Brennan and Maurice	Láser de dióxido de carbono	Mecánica, Calor
1989	Zaidman et al.	Micro-estesiómetro de aire	Mecánica
1996	Murphy et al.	Estesiómetro de aire	Mecánica
1999	Belmonte et al.	Estesiómetro de gas	Mecánica, Química
2001	Acosta et al.	Ampliación del estesiómetro de gas	Mecánica, Química, Frío, Calor

Finalmente en 1999, Belmonte et al.¹¹ desarrollaron un estesiómetro de no contacto que se basa en la emisión de un pulso de aire que impacta sobre la córnea.^{10,11} Este aparato consiste de una unidad central (Fig. 4 A) conectada a dos bombonas que contienen aire medicinal y CO₂ (99.8% de pureza). La mezcla de gases se realiza en esta unidad central a través de una serie de reguladores, que también permite calentar o enfriar los gases. Los gases salen por un cabezal que se coloca en la lámpara de hendidura y que se sitúa a una distancia de 5 mm de la córnea (Fig. 4 B).¹¹ Este estesiómetro tiene una serie de ventajas sobre el estesiómetro de Cochet-Bonnet ya que al ser de no contacto no produce ningún daño en la córnea. Además permite medir diferentes tipos de sensibilidad debido a que estimula diferentes tipos de receptores sensoriales como los mecanorreceptores, los nociceptores polimodales o las fibras frías.¹¹ Manteniendo la temperatura de la córnea constante y variando la presión del pulso de aire se consigue medir el umbral mecánico. A la hora de medir el umbral térmico se varía la temperatura calentando o enfriando el aire. Por último, para medir el umbral químico se mezcla el aire con concentraciones variables de CO₂. Estos dos últimos umbrales se miden reduciendo la presión de umbral mecánico para evitar la posible estimulación de los receptores mecanosensoriales.¹¹ Por esto, mediante el uso de este aparato se pueden medir los umbrales de sensibilidad mecánica, química y térmica al calor y al frío de una forma reproducible.^{11,12}

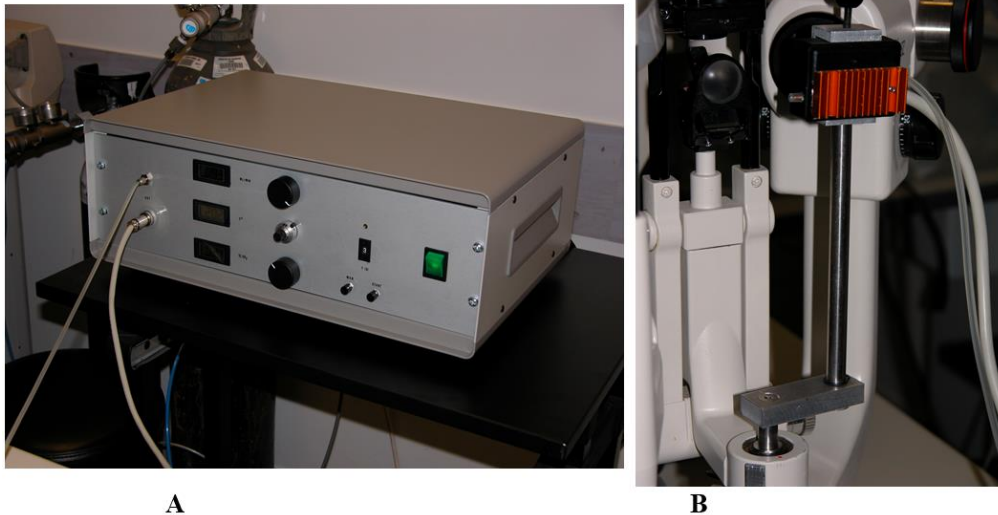


Figura 4. Estesiómetro diseñado por Belmonte (Figura A); Cabezal que lanza los estímulos (Figura B). Cámara ambiental del IOBA.

1.2. Intervalos de referencia

Un intervalo de referencia es el conjunto de valores que se encuentran entre dos percentiles de una distribución.¹³ Por ejemplo, entre el percentil 2,5 y el 97,5 se define el intervalo de referencia del 95% y dentro de éste aproximadamente se encuentran el 95% de los valores de una muestra de una población sana. Este concepto fue introducido en 1969 por Grasbeck y Saris¹⁴ y se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas en medicina, tanto clínica como de laboratorio, a la hora de determinar si los valores de un parámetro en un individuo se encuentra o no dentro de los rangos de dicho parámetro correspondientes a población sana. Su uso es muy simple, si los resultados obtenidos de un individuo en una prueba no están dentro del intervalo de referencia correspondiente, ese sujeto es considerado sospechoso de presentar una patología determinada.

A la hora de determinar estos intervalos es muy importante definir los criterios de salud necesarios para escoger a la población de referencia de la cual obtendremos nuestra muestra para calcular los límites y el intervalo.¹⁵ Otro criterio a tener en cuenta a la hora de calcular estos intervalos, es la influencia que pueden tener variables como la edad, el sexo o la raza en la variable principal.¹³ Si está demostrada la influencia de alguna variable secundaria, ésta deberá ser tomada en cuenta en el propio cálculo del intervalo de referencia proporcionando unos intervalos que tengan en cuenta estas variables. Además, puede que la influencia de las mismas no se limite solo a los valores medios de nuestra variable de interés, sino que afecte a otros parámetros que caracterizan a la distribución.

La forma más simple de estimar los percentiles es calcularlos directamente a partir de la distribución de los datos. Sin embargo, este método va a producir estimaciones sesgadas, sobre todo en muestras que no sean muy grandes. Además, también se suele suponer una distribución normal para los datos. Sin embargo, en la práctica, no suele ser adecuado utilizar este modelo, ya que la mayoría de parámetros biológicos suelen alejarse de él presentando asimetría o apuntamiento. Una herramienta que permite tener en cuenta estos aspectos son los modelos GAMLSS (Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape).¹⁶ Estos modelos son una extensión de los modelos lineales generalizados y de los modelos aditivos generalizados. Son modelos semi paramétricos muy flexibles que permiten modelizar todos los parámetros distribucionales: localización, escala y forma (asimetría y curtosis o apuntamiento). Además, a diferencia de métodos más clásicos, la dependencia de variables

adicionales puede tenerse en cuenta, no sólo en los valores medios, sino también en los otros parámetros que caracterizan a la distribución, como son la variabilidad, la simetría y/o el apuntamiento.

1.3. Justificación

Se ha comprobado que los intervalos de referencia pueden ser muy útiles a la hora de establecer criterios diagnósticos en diferentes pruebas médicas. No obstante, en cuanto a la sensibilidad corneal no hay una caracterización clara de estos umbrales ni en individuos sanos ni tampoco en pacientes con otras patologías. La ausencia de intervalos de referencia para la estesiometría de no contacto puede deberse a la relativa novedad de la técnica, sin embargo, tampoco encontramos en la literatura estudios que hayan calculado los intervalos de referencia utilizando el estesiómetro de Cochet-Bonet. Además los valores de estesiometría corneal de no contacto varían en *Acosta et al*¹² obtuvieron unos valores de 82.8 ± 13.8 ml/min mientras que *Stapleton et al*¹⁷ obtuvieron unos valores de 64.4 ± 28.6 ml/min. Así se puede observar que excepto en el umbral térmico al calor en el que los valores son similares los demás valores presentan una gran variabilidad.

De esta forma no se conoce si los valores de sensibilidad tomados a los pacientes son normales o no, ni la significación clínica que se puede extraer de estos valores. Además es necesario evaluar la influencia que pueden tener variables como el sexo^{7,18,19} o la edad^{7,18,20} en los umbrales de sensibilidad de la córnea ya que si se encuentra una dependencia es necesario tenerlo en cuenta a la hora de emitir un diagnóstico. Es por esto por lo que el principal propósito de este trabajo es la determinación de los intervalos de referencia para los umbrales mecánicos y de temperatura (calor y frío) de sensibilidad corneal mediante el uso de estesiometría corneal de no contacto en paciente sin patología ocular en función de la edad y el sexo mediante el uso de modelos GAMLSS.

2. Hipótesis

Es posible hallar los intervalos de referencia de sensibilidad corneal en individuos sin patología ocular a partir de mediciones obtenidas mediante estesiometría de no contacto.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es la determinación de los intervalos de referencia de sensibilidad corneal en individuos sin patología ocular mediante estesiometría de no contacto.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar los intervalos de referencia de sensibilidad mecánica, térmica al calor y térmica al frío.
2. Evaluar la influencia de la edad y del sexo en los umbrales de sensibilidad.

4. Metodología

4.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio prospectivo y observacional en el cuál no se testó ninguna intervención o producto novedoso. Este trabajo se incluyó en el proyecto PI 18-1084 aprobado por el Comité Ético del Área de Salud Valladolid Este y por la Comisión de Investigación del IOBA. Además, cumplió los acuerdos de la Declaración de Helsinki.

4.2. Muestra

Se eligió una muestra representativa de individuos sin patología ocular entre 10 y 80 años y de ambos sexos. Se tomó una muestra entre enero y mayo de 2019 de 50 ojos referida en adelante como submuestra 1. Esta submuestra fue tomada por dos operadores Arlanzón P y Blanco M. El ojo de estudio en la submuestra 1 se eligió aleatoriamente. Los criterios de inclusión y exclusión para la submuestra 1 se reproducen a continuación.

Criterios de inclusión:

- ✓ Sujetos menores de 18 años cuyos progenitores y/o tutores legales sean capaces de entender y firmar el consentimiento informado.
- ✓ Sujetos mayores de 18 años que sean capaces de entender y firmar el consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- ✗ Alteraciones y/o enfermedades oculares activas tales como: conjuntivitis infecciosa, alergia ocular, inflamación de cámara anterior, enfermedad de segmento anterior.
- ✗ Alteraciones y/o enfermedades oculares crónicas como: alteración del sistema de drenaje lagrimal, historia de glaucoma, disfunción de las glándulas de meibomio.
- ✗ Síndrome de ojo seco:
 - OSDI > 12
 - Tener alterados al menos 2 de los siguientes tests:
 - Tinción corneal con fluoresceína ≥ 1 en escala Oxford.
 - Tiempo de ruptura lagrimal ≤ 7 .
 - Tinción conjuntival con verde de lisamina ≥ 1 en escala Oxford.
 - Test de Schirmer ≤ 5 mm a los 5 minutos sin anestesia tópica.
- ✗ Enfermedades autoinmunes que requieran tratamiento.
- ✗ Enfermedades sistémicas, neurológicas y/o dermatológicas con afectación ocular.
- ✗ Historia de uso de lentes de contacto.
- ✗ Historia de cirugía ocular y/o palpebral.
- ✗ Uso de medicación tópica ocular en los últimos 3 meses.
- ✗ Uso de medicación sistémica que afecte a la producción lagrimal en los últimos 3 meses.

Además, se consideraron datos de una muestra previa compuesta por 77 ojos. A partir de aquí esta muestra será referida como submuestra 2. Esta submuestra fue recogida por tres operadores Tesón M en 2008, Murillo G en 2010 y López A en 2013; todos estos estudios fueron llevados a cabo en el IOBA, con el mismo aparato y siguiendo la misma metodología. En este caso, el ojo de estudio también se eligió de manera aleatoria. Los criterios de inclusión y exclusión se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de la submuestra 2.

Operador	Criterios de inclusión		Criterios de exclusión			
	Edad	Refracción	Enfermedades de la superficie ocular	Cirugías oculares	Medicación tópica y sistémica con afectación ocular	Alteraciones binoculares
Tesón M	≥40 años	NO	SI	SI	SI	NO
Murillo G	20≤edad≤45 años	-0.75 D≤ Equivalente esférico≤ - 5.00 D	SI	SI	SI	NO
López A	18≤edad≤45 años	Miopes hasta - 10 D Hipermetropes hasta +5 D Astigmatas hasta 5 D	SI	SI	SI	SI

D = Dioptrías.

4.3. Diseño del estudio

Las pruebas de este estudio para la submuestra 1 se realizaron a lo largo de una única visita. Primeramente, tras la lectura del protocolo y la firma de consentimiento informado (Anexo B) se realizó la historia clínica para comprobar que el sujeto cumplía con los criterios de inclusión y exclusión del estudio. A continuación, se realizaron una serie de pruebas para evaluar que el sujeto cumpliera con los criterios de inclusión y exclusión y seguidamente se exploró la sensibilidad corneal de ambos ojos.

4.4. Pruebas clínicas

CUESTIONARIO DE SALUD GENERAL Y OCULAR

El objetivo fue recoger información sobre la historia médica relevante, medicación habitual, procedimientos quirúrgicos de relevancia e historia oftalmológica de cada candidato al estudio para determinar si cumplían o no los requisitos de inclusión al estudio.

CUESTIONARIO OCULAR SURFACE DISEASE INDEX (OSDI)

Es el cuestionario más frecuentemente utilizado para valorar la severidad de los síntomas en alteraciones de la superficie ocular. Está formado por 12 preguntas sobre los síntomas del ojo seco y su efecto en la visión, así como las limitaciones que estos producen y los factores ambientales relacionados con el ojo seco. Cada pregunta se valora de 0 a 4, de menor a mayor frecuencia respectivamente, incluyendo la opción 'no procede' si fuera necesario. A continuación, se suma el valor de todas las respuestas y re-escalando la suma, se obtiene una

puntuación de 0 a 100, siendo 0 la mínima severidad y 100 la máxima. La definición de sujeto sintomático viene dada por una puntuación mayor o igual a 13.

EVALUCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR

Biomicroscopía de polo anterior

Se exploró la superficie ocular para detectar cualquier signo de alteración de la misma con el propósito de descartar cualquier patología de la superficie ocular que fuera motivo de exclusión del estudio:

- La presencia de edema corneal (epitelial y estromal), infiltrados, y/o papilas en la conjuntiva tarsal se valoraron con luz blanca y aumentos medios (16-25X) según la norma ISO 11980:2010.
- La hiperemia conjuntival se valoró con luz blanca y 16X aumentos según la escala Efron (0-4) para la conjuntiva bulbar y CCLRU (0-4) para la conjuntiva tarsal en valor global para todo el tarso.
- La evaluación de tinción corneal con fluoresceína se realizó instilando fluoresceína sódica (Entod Research Cell UK Ltd, New Southgate, Londres, Reino Unido) en tira oftálmica, previamente humedecida con suero salino (Braun Ecolav 0,9%, B. Braun Medical S.A., Barcelona, España) en la conjuntiva nasal inferior. Se examinó la superficie ocular a 16X aumentos y el filtro azul cobalto de la lámpara de hendidura y a través de un filtro amarillo. Se dividió la córnea en 5 sectores (central, temporal, nasal, superior e inferior). La extensión de la tinción corneal con fluoresceína se calificó en una escala de 0 a 4 grados según la escala CCLRU para cada una de las zonas y se sumaron las 5 zonas para dar un valor global. Se evaluó primero el ojo derecho y después el izquierdo.

Tiempo de ruptura lagrimal (TBUT)

El objetivo de esta prueba fue evaluar la estabilidad de la película lagrimal. Se instiló fluoresceína sódica en tira oftálmica, previamente humedecida con suero salino en la conjuntiva bulbar inferior. Se observó el patrón de la película lagrimal a través de la lámpara de hendidura con luz azul cobalto y a través del filtro amarillo. Se pidió al paciente que parpadeara tres veces y, a continuación, que mantuviera los ojos abiertos. Se tomó como medida en segundos el tiempo transcurrido entre el último parpadeo y la aparición del primer punto negro o la pérdida de tinción con fluoresceína en la película lagrimal. Se realizaron tres medidas, siendo el valor final la media de las tres.

Tinción conjuntival con verde de lisamina

Se instiló verde de lisamina (I-DEW green, Entod Research Cell UK Ltd. Tottenham Lane, Londres, Reino Unido) en tira oftálmica, previamente humedecida con suero salino, en la conjuntiva bulbar inferior. Se evaluó la tinción conjuntival con lámpara de hendidura a 16X aumentos, en nasal y temporal en ambos ojos según la escala Oxford.

TEST DE SCHIRMER I

El objetivo de esta prueba fue cuantificar la producción lagrimal del paciente. Se colocaron dos tiras de papel (I-DEW tearstrips, Entod Research Cell UK Ltd. Tottenham Lane, Londres, Reino Unido) graduadas de 0 a 36 mm, cada una en el canto temporal de cada ojo, y se pidió

al paciente que cerrase los ojos durante 5 minutos. Pasado este periodo de tiempo, se solicitó al sujeto que abriese los ojos y se retiraron las tiras de papel. Se anotó por separado la medida del ojo derecho de la del izquierdo, tomando como medida válida la última división de la tira empapada por lágrima

Los criterios de corte de las diferentes pruebas fueron iguales para todas las submuestras. Las únicas diferencias fueron que Murillo G utilizó Schirmer con anestésico y que López A sólo consideró un OSDI menor que 13.

MEDIDA DE LA SENSIBILIDAD CORNEAL

Se utilizó un estesiómetro de no contacto para medir los umbrales de sensibilidad mecánica y térmica (calor y frío) de la córnea. Para ello se situó el cabezal del estesiómetro a una distancia de 5 mm del ojo del sujeto con lo que el área a estimular fue de 4 mm². Los sujetos pudieron parpadear con normalidad durante toda la prueba salvo en el momento en el que se les enviaba el estímulo. Antes de mandar el estímulo se les pidió que parpadearan una vez y que mantuvieran los ojos abiertos durante los 3 segundos que duró el estímulo. Una vez finalizados los 3 segundos se les pidió que confirmaran si habían notado o no el estímulo enviado. Los umbrales fueron medidos primero en el ojo derecho y a continuación en el ojo izquierdo.

La sensibilidad mecánica se midió enviando flujos de aire medicinal de manera controlada en un rango de 15 a 200 mililitros/minuto (ml/min). Con el objetivo de no estimular los receptores térmicos y debido a que la temperatura media de la córnea es de 34 °C, se fijó una temperatura de 50 °C del estesiómetro para conseguir una temperatura de 34 °C una vez alcanzada la córnea. Esto se calculó con la tabla IA (Anexo A). A continuación el umbral se calculó con el método de límites. Se aumentó el flujo en pasos de 20 ml/min hasta que el paciente refirió notar el estímulo. Seguidamente se disminuyó el flujo en pasos de 10 ml/min hasta que lo dejó de notar. Por último, se aumentó de nuevo en pasos de 5 ml/min hasta que refirió notarlo de nuevo. Este último valor fue anotado como umbral mecánico del sujeto.

Los umbrales de sensibilidad térmica, tanto al frío como al calor, se determinaron variando la temperatura del flujo de aire en el estesiómetro (rango 0 - 95,5 °C). Esto supone que el flujo de incidencia cuando llega a la superficie ocular presenta una temperatura entre 30 y 37,6°C. En este caso al igual que para el anterior se evitó la estimulación de los receptores mecanosensoriales manteniendo el flujo de aire mínimo 10 ml/min por debajo del valor obtenido para el umbral mecánico. El orden de medida de estos dos umbrales fue elegido mediante una tabla de aleatorización.

El umbral térmico al calor se definió aumentando la temperatura del estesiómetro en pasos de 10 °C (0.8 °C sobre la córnea). Una vez el paciente notó el estímulo se redujo el valor de la temperatura en pasos de 5 °C (0.4 °C sobre la córnea) hasta que el paciente dejó de notarlo. Por último, se aumentó una vez más la temperatura, esta vez en pasos de 1 °C (0.08 °C sobre la córnea) hasta que el sujeto refirió volver a notarlo. Este último valor de temperatura sobre la temperatura basal de la córnea y corregido mediante la tabla 1A (Anexo A) fue anotado como umbral térmico al calor del paciente.

El umbral térmico al frío se midió de la siguiente manera. Primeramente, se disminuyó la temperatura en pasos de 10 °C (0.8 °C sobre la córnea) hasta que el sujeto afirmó sentir el estímulo. A continuación, se procedió a aumentar la temperatura en pasos de 5 °C (0.4 °C sobre la córnea) hasta que el sujeto refirió dejar de notarlo. Por último, se bajó de nuevo la temperatura en pasos de 1 °C (0.08 °C sobre la córnea) hasta que el sujeto fue capaz de sentir

el estímulo de nuevo. Este último valor de temperatura sobre la temperatura basal de la córnea y corregido mediante la tabla 1A (Anexo A) fue anotado como umbral térmico al frío del paciente.

Este protocolo de medida de la sensibilidad fue consistente entre los diferentes operadores de las muestras que forman parte de los resultados de este estudio.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en la unidad de bioestadística del IOBA y se llevó a cabo utilizando el software R.²¹ Se estableció el nivel de significación en 0.05.

En un modelo GAMLSS se asume que las observaciones de nuestra variable de interés y_i , $i = 1, \dots, n$ son independientes y su función de densidad, $f(y_i|\theta^i)$, depende de un vector de 4 parámetros $\theta^i = (\mu_i, \sigma_i, \nu_i, \tau_i)$. Los dos primeros son los parámetros de localización y escala y los dos últimos se relacionan con la forma que presenta la distribución: simetría y apuntamiento. Cada uno de estos parámetros puede modelizarse como una función aditiva de las variables explicativas x_k .

$$\begin{aligned}g_1(\mu) &= X_1\beta_1 + \sum_{j=1}^{J_1} h_{j1}(x_{j1}) \\g_2(\sigma) &= X_2\beta_2 + \sum_{j=1}^{J_2} h_{j2}(x_{j2}) \\g_3(\nu) &= X_3\beta_3 + \sum_{j=1}^{J_3} h_{j3}(x_{j3}) \\g_4(\tau) &= X_4\beta_4 + \sum_{j=1}^{J_4} h_{j4}(x_{j4})\end{aligned}$$

donde la función h_{jk} es una función aditiva no-paramétrica de la variable explicativa X_{jk} evaluada en x_{jk} .

Se utilizó el *package gamlss*^{16,22} de R para ajustar uno de estos modelos a cada uno de los umbrales evaluados en función de las variables edad y sexo.

Se ajustaron los modelos considerando diferentes tipos de distribuciones, caracterizadas por distintos parámetros. En cada uno de los parámetros de nuestros modelos, se puede considerar la influencia de la edad y del sexo. En este caso se incluyeron las variables sexo como variable cualitativa y la variable edad que se consideró como una constante, como una función lineal o como un spline cúbico.

La estrategia para seleccionar el modelo que mejor se ajustaba a nuestros datos en cada caso se basó en el criterio de información de Akaike (AIC), siendo mejor el modelo con menor AIC. Dada una distribución, los pasos a seguir para modelizar cada uno de sus parámetros se describe en la figura 5.

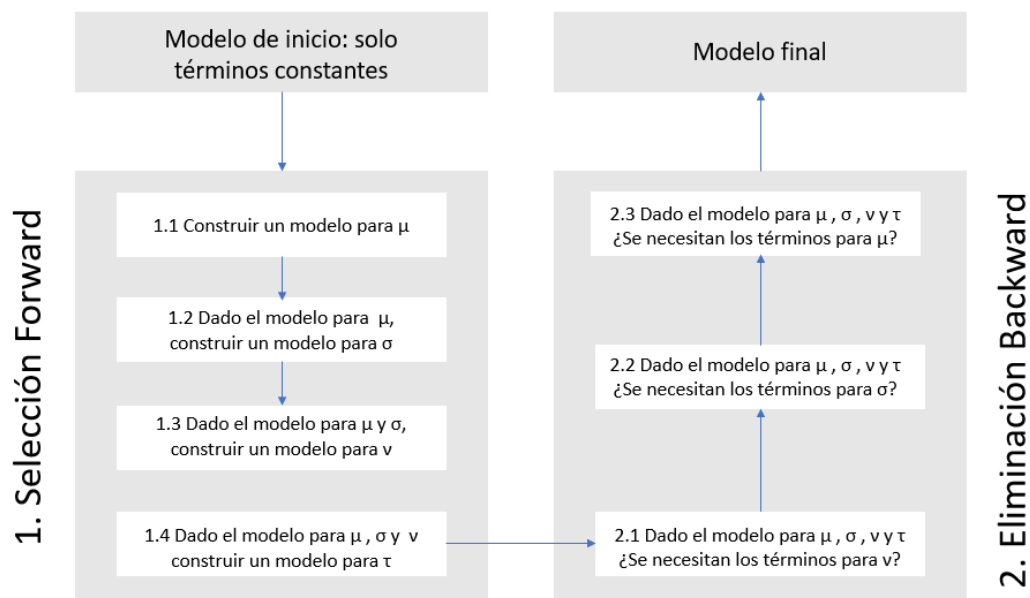


Figura 5. Pasos a seguir para crear el modelo. μ = media; σ = desviación típica; v = simetría; τ = curtosis.

Entre las distribuciones posibles se evalúan las distribuciones continuas implementadas en el *package gamlss*.²²

Validación y diagnóstico del modelo

A la hora de realizar la validación y diagnóstico del modelo se utilizaron los residuos cuantil aleatorizados (randomized / normalised quantile residuals).²³ Cuando el modelo ajustado es el correcto, la distribución de los residuos es normal estándar con lo que para evaluar la validez de los modelos ajustados se valoró la discrepancia entre los residuos observados y la distribución teórica.

Para cada modelo ajustado se utilizaron las siguientes herramientas diagnósticas:

- Dependiendo del número de variables explicativas incluidas se utilizaron 4 o 5 plots de residuales:
 - Histograma de los residuos junto con la densidad de la normal estándar y una curva suavizada,
 - Plot de normalidad de los residuos,
 - El plot de residuos contra los valores predichos por el modelo ajustado para el parámetro μ ,
 - El plot de residuos contra cada una de las variables explicativas incluidas en el modelo.

Si los residuos se comportan bien, y por tanto el modelo es válido, su distribución será aproximadamente normal, el plot de normalidad será aproximadamente lineal con intercept 0 y pendiente 1, y en los plot de residuos la nube de puntos tendrá un patrón aleatorio alrededor del 0. Cuando se representen los residuos frente al sexo, la distribución en ambos sexos debe ser similar. Estas son las características a tener en cuenta a la hora de evaluar los plots de residuales.

Además, también se utilizaron los descriptivos de los residuos cuantil aleatorizados y para ello se calculó la media, varianza y los coeficientes de asimetría y curtosis, cuyos valores de referencia (normal estándar) deber ser 0, 1, 0 y 3 respectivamente.

Además de los gráficos antes mencionados también se utilizó el **worm plot** para comprobar si los modelos eran correctos.²⁴ Estos plots permiten identificar en que rangos de las variables explicativas nuestro modelo no se ajusta de manera correcta. La interpretación de los distintos elementos de este gráfico es la siguiente:

- Los puntos muestran como de lejos están los residuos de sus valores esperados representados por una línea horizontal (línea punteada).
- Las curvas elípticas representan regiones del 95% para la deviance. Si el modelo es correcto aproximadamente el 95% de los puntos deberían estar entre las dos curvas en la parte central del gráfico.
- El modelo cúbico ajustado a los datos (línea curva sólida central). La forma de esta curva nos da información de diferentes desajustes del modelo.

La forma de estos gráficos nos permite ver los pequeños desajustes en el modelo y por tanto corregirlos. En el anexo C se muestra la tabla 1C con las correcciones que se pueden hacer al modelo dependiendo del tipo de desajuste observado.

Este plot se construyó para el modelo global y también teniendo en cuenta las variables explicativas sexo y edad para identificar los fallos del modelo en diferentes rangos. En el caso de la edad se consideraron 4 intervalos no solapados con un número similar de observaciones en cada uno de ellos.

Una vez que los modelos están ajustados, corregidos y validados se utilizan para estimar los percentiles 2.5, 5, 50, 95 y 97.5 en función de las variables que intervienen en el modelo.

Muestra externa

Se evaluó el comportamiento de los intervalos estimados en una muestra externa sin patología ocular. Se consideró el otro ojo de los 50 individuos recogidos en la submuestra 1 que no se utilizaron para la creación del modelo. No se consideraron los individuos que tuvieron un umbral fuera del rango del aparato, por lo que el número de ojos en cada umbral es variable. Más del 90% de estos ojos deberían ser clasificados como “normales” por nuestros intervalos de referencia.

6. Resultados

En total la suma de la submuestra 1 con 50 ojos y la submuestra 2 de 77 ojos dio lugar a una muestra de 127 ojos.

6.1. Descriptivos

La edad media de la muestra total fue de 37 ± 15.58 años y estuvo compuesta por un 50.4% de hombres y un 49.6% de mujeres. Por sexos, la edad media en el grupo de los hombres fue de 38.72 ± 17.46 años mientras que en el grupo de las mujeres la media de edad fue de 38.60 ± 18.63 años. La edad no mostró diferencias significativas entre sexos (p -valor=0.980).

Por muestras, la submuestra 1 estuvo compuesta por 50 sujetos con un 56% de hombres y un 44% de mujeres con una media de edad de 38.54 ± 17.82 . La submuestra 2 estuvo compuesta por 77 sujetos con un 48.1% de hombres y un 51.9% de mujeres con una media de edad de 37.65 ± 13.91 .

6.2. Ajuste de los modelos

Los datos descriptivos obtenidos para los diferentes umbrales se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Descriptivos para los tres umbrales.

		N	Media	DT	IC95% para la media	
					Inferior	Superior
Umbral mecánico	H	64	104.09	52.25	91.04	117.14
	M	63	105.04	49.14	92.66	117.41
	Total	127	104.56	50.53	95.69	113.43
Umbral térmico al calor	H	64	1.31	0.96	1.07	1.55
	M	63	1.46	1.06	1.19	1.72
	Total	127	1.38	1.01	1.21	1.56
Umbral térmico al frío	H	64	-1.84	1.14	1.55	2.12
	M	63	-1.96	1.22	1.66	2.27
	Total	127	-1.90	1.18	1.69	2.11

DT = Desviación Típica; IC = Intervalo de Confianza; H = Hombre; M = Mujer.

Las estimaciones de los parámetros de los modelos ajustados para cada uno de los umbrales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Estimación de los parámetros de los modelos ajustados.

Umbral	Distribución	Parámetros	Estimación	ES	t-valor	p-valor	
Umbral mecánico	Gamma Generalizada	μ	(Intercept) Sexo: M	5.2051 0.0455	0.0203 0.0164	256.307 2.769	<0.0001 0.0065
		σ	(Intercept) Edad	-2.712 0.0064	0.333 0.003	-8.144 2.15	<0.0001 0.0335
		ν	(Intercept)	112.07	70.76	1.584	0.116
Umbral térmico al calor	Seno Arcoseno	μ	(Intercept) cs(edad)	1.3545 -0.0082	0.1319 0.0027	10.27 -3.058	<0.0001 0.0028
		σ	(Intercept)	1.728	0.739	2.338	0.0211
		ν	(Intercept)	2.225	0.7428	2.996	0.0033
		τ	(Intercept)	1.1296	0.7078	1.596	0.113
Umbral térmico al frío	Gamma Generalizada	μ	(Intercept) cs(edad)	1.1663 0.0038	0.0781 0.001	14.935 3.783	<0.0001 0.0002
		σ	(Intercept) edad	-2.1389 0.0087	0.4213 0.0029	-5.077 2.963	<0.0001 0.0037
		ν	(Intercept)	41.31	35.09	1.177	0.241

ES = Error estándar del estimador; μ = media; σ = desviación típica; ν = simetría; cs = cubic spline; τ = curtosis.

En el caso del modelo para el umbral mecánico la media depende del sexo, siendo mayor el valor de este umbral en las mujeres. La varianza depende de la edad de forma lineal, aumentando la variabilidad cuando aumentamos la edad. El parámetro de simetría es constante. Si consideramos el umbral térmico al calor la media depende de la edad de forma no lineal, mientras que el resto de parámetros no dependen de ninguna de las variables explicativas. Por último, si nos fijamos en el umbral térmico al frío podemos observar que la media y la varianza dependen de la edad de forma no lineal en el primer caso y lineal en el segundo. El parámetro de simetría no depende de ninguna de las variables explicativas consideradas.

6.3. Análisis residual

El análisis de los residuos no presentó problemas en los umbrales mecánico ni térmico al frío anexo D (tablas 1D y 2D, figuras 1D, 2D, 3D y 4D).

Sin embargo, en el análisis de los residuos para el umbral térmico al calor se observaron problemas relevantes. En la tabla 5 se muestran los parámetros de los residuos asociados a este modelo observándose que los valores del coeficiente de asimetría y del de curtosis se alejan significativamente de los valores esperados compatibles con el modelo normal, 0 y 3 respectivamente.

Tabla 5. Parámetros de los residuos del modelo de umbral térmico al calor.

Media (IC95%)	Varianza (IC95%)	Coefficiente de Asimetría (IC95%)	Coefficiente de Curtosis (IC95%)
-0.01 (-0.187,0.168)	1.02 (0.811,1.331)	-0.11 (-0.422,0.237)	2.72 (2.163,3.394)"

IC = Intervalo de Confianza.

A su vez si nos fijamos en los gráficos de los residuos que se muestran en la figura 6, podemos observar en el histograma (Fig. 6A) la presencia clara de dos modas. Además, en la figura 6B se puede observar que algunos de los puntos se sitúan fuera de las curvas.

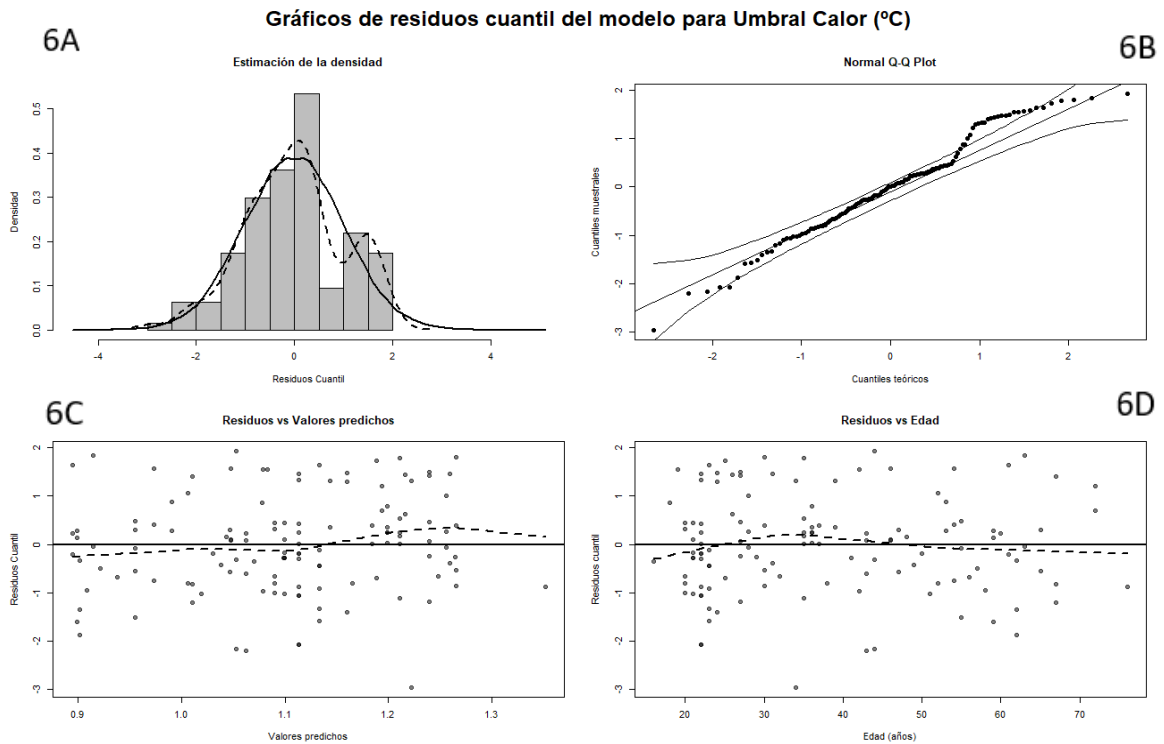


Figura 6. Gráficos de residuos para el modelo de umbral térmico al calor. En el histograma (figura 6 A) la densidad estimada es la línea punteada y la densidad de la normal estándar es la línea sólida. En los plots de residuos (figuras 6B, 6C y 6D.) se representa la línea $Y=0$ (sólida) y la curva suavizada (punteada).

Por último, en la figura 7 se pueden observar los worm plot para este modelo. Siguiendo con lo visto anteriormente el worm plot también revela problemas con el modelo ya que algunos de los puntos se sitúan fuera de las curvas.

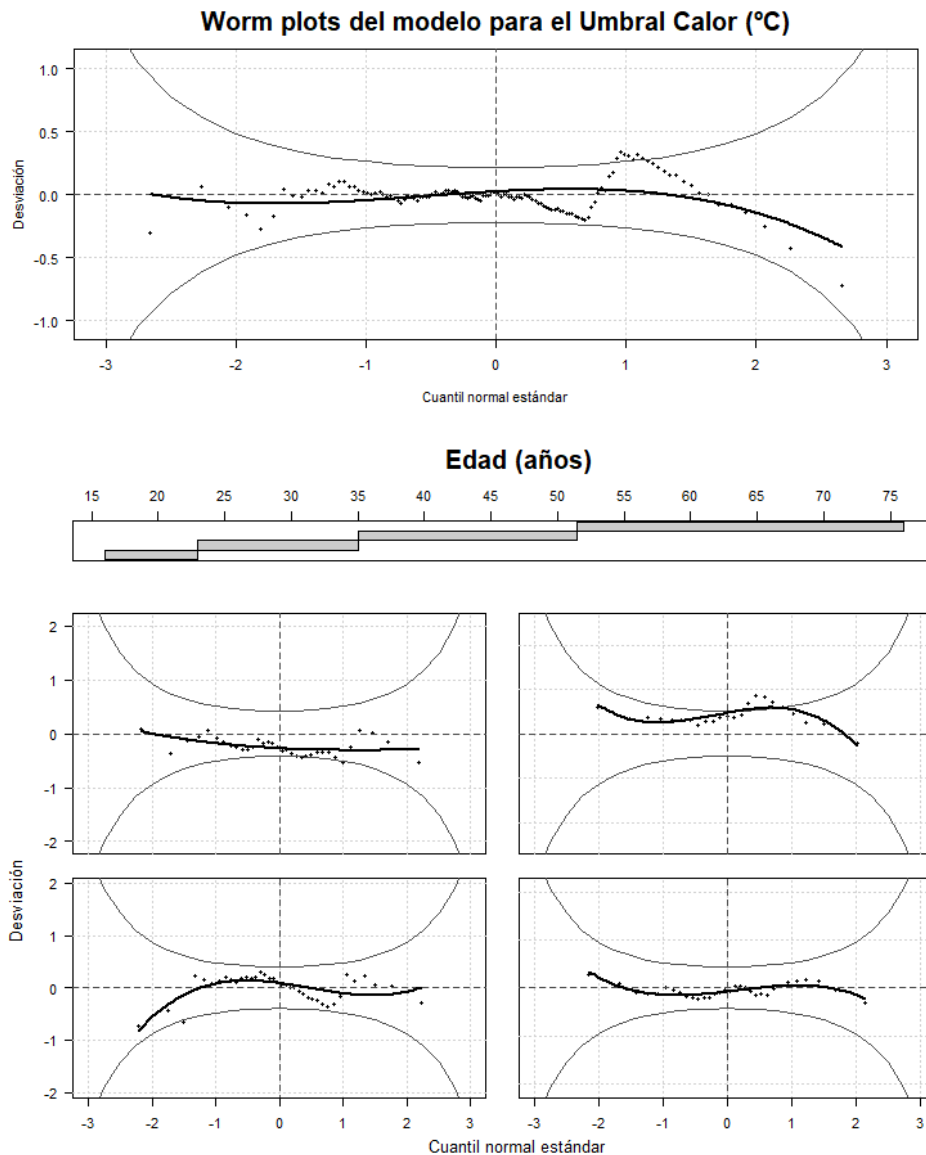


Figura 7. Worm plot para los residuos del modelo de umbral térmico al calor. Para la edad se consideran 4 rangos y los gráficos se colocan en orden por filas (Fila1 los dos primeros rangos y Fila2 los dos últimos).

6.4. Reajuste para el umbral calor

Debido a lo explicado en el apartado 6.3 fue necesario ajustar otro modelo para el umbral térmico al calor. Observando el histograma (Fig. 8) se aprecia de manera clara la mezcla de dos distribuciones. La primera de ellas es más numerosa y se centra en torno a 1 mientras que la segunda es menos frecuente y se centra en torno a 3.5. Por ello tratamos de ajustar una mezcla de dos componentes. Se utilizó la familia SN2 (normal asimétrica) truncada por la izquierda en el 0 para valores bajos, ya que este umbral sólo puede tener valores positivos, y una normal para los valores altos. La primera componente tiene 3 parámetros: media, desviación típica y simetría, y la segunda sólo los dos primeros. El histograma muestral junto con la función ajustada se muestra en la figura 8.

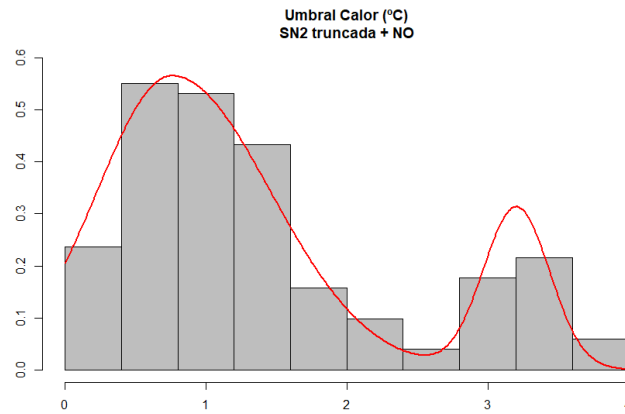


Figura 8. Distribución ajustada SN2 junto con normal y el histograma muestral para el umbral térmico al calor. SN2 = Normal asimétrica.

En la tabla 6 se muestran las estimaciones de los parámetros asociados al nuevo modelo.

Tabla 6. Estimaciones de los parámetros del modelo mixtura de dos componentes para el umbral calor.

			Estimación	ES	t-valor	p-valor
f ₁ : SN2 truncada π ₁ =0.8151	μ	(Intercept)	0.7199	0.1703	4.227	<0.0001
		cs(Edad)	0.0022	0.0041	0.531	0.597
	σ	(Intercept)	-0.6159	0.0723	-8.522	<0.0001
f ₂ : Normal π ₂ =0.1845	μ	(Intercept)	3.1235	0.0688	45.373	<0.0001
		Sexo: M	0.1459	0.0927	1.574	0.118
	σ	(Intercept)	-1.499	0.1459	-10.27	<0.0001

ES = Error Estándar del modelo; M = Mujer; μ = media; σ = desviación típica; ν = simetría.

En la primera componente, la media depende de la edad de forma no lineal, mientras que los parámetros de varianza y simetría no depende de ninguna de las variables explicativas. En la segunda componente, correspondiente a umbrales de calor altos, el parámetro de la media depende del sexo, siendo mayor en mujeres. El parámetro de varianza es constante. En el anexo D (tabla 3D, figura 5D y 6D) se muestra el análisis residual de este ajuste, en el que no se observan problemas relevantes.

6.5. Intervalos de referencia

Utilizando los modelos ajustados en las secciones anteriores se estiman los percentiles para cada umbral. En las figuras 9, 10 y 11 se muestran los gráficos de los intervalos de referencia para los umbrales mecánico, térmico al calor y térmico al frío respectivamente. En el anexo E (tablas E1, E2 y E3) se muestran las tablas completas de los percentiles para cada uno de los umbrales.

Umbral Mecánico (ml/min)

Intervalo de referencia del 90%

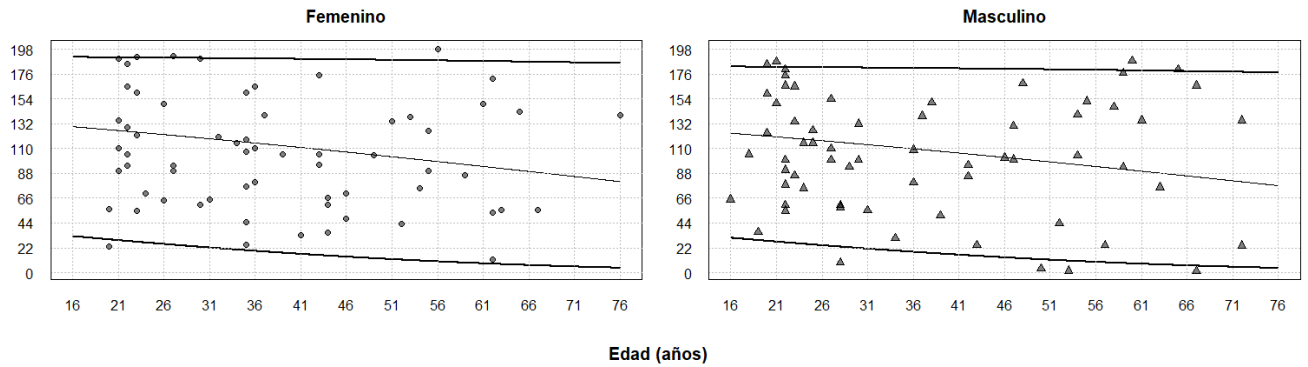


Figura 9. Gráfico para los intervalos de referencia del umbral mecánico. Los círculos corresponden a los datos de las mujeres mientras que los triángulos corresponden a los datos de los hombres. Las líneas continuas más gruesas superior e inferior corresponde con los límites de referencia del 90% y la que es más fina corresponde con la mediana.

Umbral Calor (°C)

Intervalo de referencia del 90%

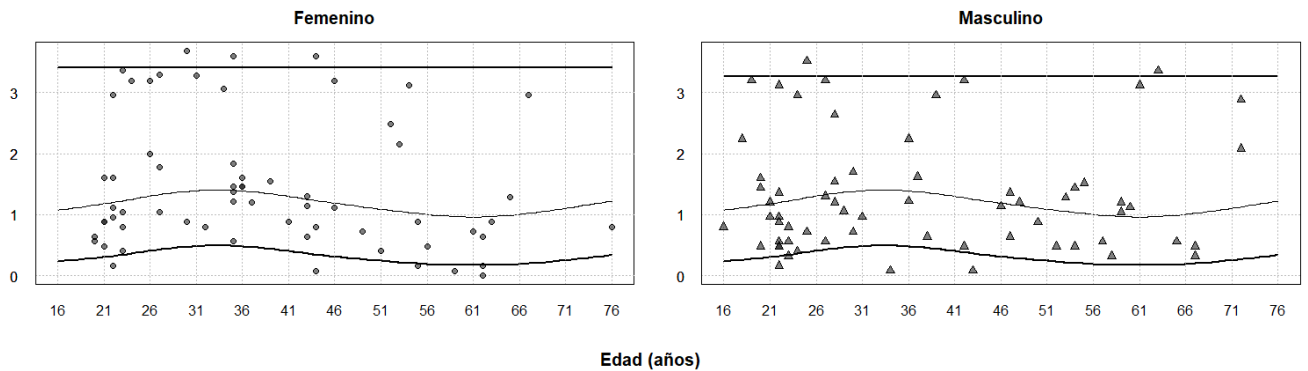


Figura 10. Gráfico para los intervalos de referencia del umbral térmico al calor. Los círculos corresponden a los datos de las mujeres mientras que los triángulos corresponden a los datos de los hombres. Las líneas continuas más gruesas superior e inferior corresponde con los límites de referencia del 90% y la que es más fina corresponde con la mediana.

Umbral Frío (°C)

Intervalo de referencia del 90%

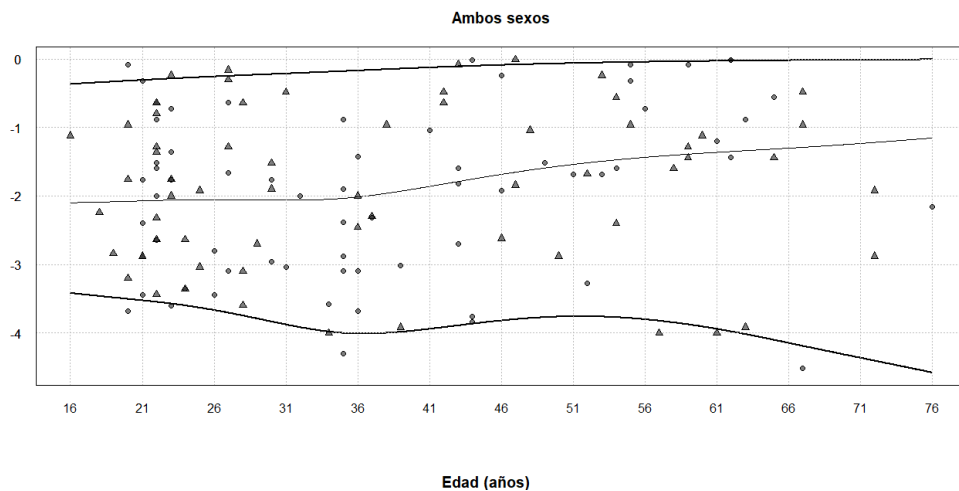


Figura 11. Gráfico para los intervalos de referencia del umbral térmico al frío. Los círculos corresponden a los datos de las mujeres mientras que los triángulos corresponden a los datos de los hombres. Las líneas continuas más gruesas superior e inferior corresponde con los límites de referencia del 90% y la que es más fina corresponde con la mediana.

6.6. Muestra externa

Se comprobó la capacidad de los intervalos a la hora de clasificar a la sensibilidad de los ojos como normal o no. Para ello se utilizaron el ojo contralateral de la submuestra 1. En la tabla 7 se muestran el número de ojos, junto con su porcentaje, clasificados como normales en cada uno de los umbrales. También se muestran los datos por separado de los que quedaron por encima y por debajo de dichos umbrales.

Tabla 7. Comportamiento de los intervalos en una muestra externa.

	Ojos sin patología ocular			
	N	Por abajo n; % (IC95% del %)	Normal n; % (IC95% del %)	Por arriba n; % (IC95% del %)
Mecánico	43	0; 0% (0%; 10.2%)	40; 93% (79.9%; 98.2%)	3; 7% (1.8%; 20.1%)
Calor	42	5; 11.9% (4.5%; 26.4%)	37; 88.1% (73.6%; 95.5%)	0; 0% (0%; 10.4%)
Frío	44	0; 0% (0%; 10%)	41; 93.2% (80.3%; 98.2%)	3; 6.8% (1.8%; 19.7%)

IC = Intervalo de Confianza. El tamaño muestral para cada umbral fue diferente debido a que en algunos casos las medidas obtenidas están fuera de rango.

Como puede observarse en la tabla el umbral que peor clasifica es el de calor, en el que no llegamos al límite establecido del 90% de los ojos dentro del intervalo de referencia. A pesar de eso, se clasifican correctamente el 88% de los ojos siendo reseñable mencionar que el intervalo de confianza contiene al 90% por lo que no se aprecian diferencias estadísticamente significativas con un nivel de significación de 0.05. En el umbral de calor, los ojos que se salen del intervalo lo hacen por valores pequeños. En el umbral mecánico se consigue un acierto del 93% y solo se salen del intervalo 3 ojos por valores altos. En el umbral del frío conseguimos la sensibilidad más alta con un 93.2% de ojos clasificados como normales y como en el umbral mecánico solo se salen del intervalo 3 ojos por valores elevados.

7. Discusión

Tradicionalmente la medida de la sensibilidad corneal se ha realizado utilizando el estesiómetro de Cochet-Bonnet. Sin embargo, y debido a la serie de desventajas de este instrumento,^{9,10} entre ellas, la incapacidad de medir otro umbral más que el mecánico, se incentivó el desarrollo de nuevos métodos de medida. Este proceso se culminó en la creación del estesiómetro de gas de Belmonte.¹¹ Este estesiómetro permite la exploración no invasiva de la sensibilidad corneal además de proporcionar información sobre los umbrales mecánico, térmico y químico de la córnea.¹¹ Sin embargo, aún no se han establecido unos intervalos de valores normales dentro de una población sana para esta prueba o unos valores medios. Sin embargo, la ventaja de los intervalos de referencia es que, una vez establecidos, es posible medir y clasificar a los individuos en uno u otro sin necesidad de tener una muestra.

En este estudio utilizamos el estesiómetro de Belmonte para establecer los intervalos de referencia de los umbrales mecánico y térmico al calor y frío en una población sana incluyendo un amplio rango de edades y ambos sexos.

En la tabla 7 se muestran las medias de los umbrales de los diferentes estudios. Como se puede observar los valores de sensibilidad obtenidos han sido muy variados. Nosotros hemos encontrado valores medios más altos para el umbral mecánico en comparación con los obtenidos por *Golebiowski et al*^{10,25} y *Stapleton et al*.¹⁷ Los valores obtenidos para el umbral al calor son bastantes similares en general a los obtenidos por *Acosta et al*.^{12,26} Por último en cuanto al umbral al frío el valor obtenido es diferente al obtenidos por *Acosta et al*.^{12,26} Las diferencias entre estos estudios y el presente pueden deberse a la distancia de la córnea a la punta del estesiómetro^{17,27} ya que es una variable difícil de medir y controlar. A su vez la presencia de diferentes diámetros de la punta¹⁷ o al momento del día en el que se han tomado las medidas^{7,12} también puede aumentar la variabilidad.

Tabla 7. Medias de los umbrales de sensibilidad.

Estudio	Umbral mecánico (media ± desviación típica)	Umbral térmico al calor (media ± desviación típica)	Umbral térmico al frío (media ± desviación típica)
<i>Golebiowski et al</i> ¹⁰	64.4±29.4 ml/min	X	X
<i>Acosta et al</i> ¹²	82.8±13.8 ml/min	1.4±0.1	-2.5±0.6
<i>Golebiowski et al</i> ²⁵	76.2±26.8 ml/min	X	X
<i>Stapleton et al</i> ¹⁷	64.4±28.6 ml/min	X	X
<i>Acosta et al</i> ²⁶	79±5 ml/min	1.2±0.2	-2.4±0.4
<i>Arlanzón et al</i>	104.56±50.53 ml/min	1.38±1.01	-1.9±1.18

min = minuto; ml = mililitro; X = no se hizo.

En cuanto a la definición de unos intervalos de referencia para los umbrales de sensibilidad corneal, hasta la fecha no se ha reportado ningún artículo en el que se haya realizado esto. Los intervalos de referencia son una buena herramienta para la caracterización de la población sana y para facilitar el diagnóstico de determinadas patologías cuando los valores obtenidos se sitúen fuera de esos intervalos. Para conseguir esto nos hemos decantado por la utilización de los modelos GAMLSS ya que permiten mayor flexibilidad a la hora de modelizar los resultados de una variable, en nuestro caso la sensibilidad corneal. En nuestro caso, ninguna de las distribuciones que mejor se ajustan a nuestros datos es la distribución normal y por

tanto esto refuerza la elección de los modelos GAMLSS para estimar los límites de referencia. Las características de los residuos de los umbrales mecánico y térmico al frío no revelaron problemas con los modelos. Sin embargo, para el umbral al calor se necesitó ajustar una mixtura de distribuciones.

Hemos encontrado diferencias entre las diferentes edades y el sexo en el umbral mecánico y debido a esto los intervalos de referencia se muestran en función de los mismos. La influencia de estos factores ha sido reportada en la literatura científica tanto con el uso del estesiómetro de gas de Belmonte^{18,25,28} como con el estesiómetro de Cochet-Bonnet.^{19,20} Algunos estudios^{18,28} han reportado una disminución de la sensibilidad mecánica con la edad, sin embargo, esto no es un hallazgo universal ya que *De Paiva et al*²⁷ no hallaron diferencias de sensibilidad mecánica en cuanto a la edad. En nuestro estudio hemos encontrado que el umbral mecánico parece descender según va aumentando la edad con lo que los sujetos mayores serían más sensibles a los estímulos mecánicos que los sujetos jóvenes. *Golibiowski et al*²⁵ sí encontraron una disminución del umbral mecánico con la edad aunque esta disminución solo fue significativa en mujeres. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que ha utilizado una muestra de sujetos tan amplia, por lo que la diferencia en los resultados obtenidos puede deberse a esta característica o a las diferencias en el procedimiento antes mencionadas. También hemos encontrado una diferencia en el umbral mecánico en cuanto al sexo como también han encontrado otros investigadores, aunque con resultados contradictorios.^{18,19,25} En el estudio de *Khezri et al*¹⁹ se encontró que la sensibilidad era más alta en hombres que en mujeres medido con el estesiómetro de Cochet-Bonnet mientras que en el estudio de *Acosta et al*¹⁸ se encontró que la sensibilidad era más alta en mujeres premenopáusicas que en hombres de edad similar medido con estesiometría de no contacto. Los resultados obtenidos por *Golebiowski et al*²⁵ fueron similares a los obtenidos por *Acosta et al*,¹⁸ sin embargo, ellos encontraron una sensibilidad más alta en mujeres sin diferenciar su estado reproductivo. En nuestro estudio las mujeres también presentan una sensibilidad media ligeramente más reducida que los hombres. Esta pequeña diferencia parece mantenerse a lo largo de todo el intervalo.

En el umbral térmico al calor también hemos encontrado diferencias en cuanto a la edad y el sexo y nuevamente los intervalos de referencia se muestran en función de estas dos variables. Nuevamente las mujeres presentan una sensibilidad algo más reducida que los hombres y esto se mantiene a lo largo de todo el intervalo. En este caso la tendencia del umbral térmico con respecto a la edad es no lineal. Por tanto, el umbral parece aumentar hasta los 35 años, luego desciende y vuelve a aumentar a partir de los 60. Este comportamiento es similar entre hombres y mujeres. La presencia de dos grupos con umbrales distintos es de igual manera reseñable ya que debido a esto se necesitó ajustar una mixtura de distribuciones. En la literatura científica no hay artículos que hayan reportado resultados similares. Principalmente se han centrado en definir las medias de este umbral en distintas muestras siendo similares a las obtenidas en este estudio^{9,12,26,29} Son necesarios más estudios para intentar encontrar una explicación a la presencia de grupos con umbrales al calor diferentes. Quizás pueda deberse al orden en el que se midió el umbral térmico y que pueda cambiar en función de si se midió antes el frío que el calor o viceversa. Quizás pueda haber una afectación de los receptores en función del tipo de estimulación térmica que pueda afectar a la medida del posterior umbral.

Finalmente, en cuanto al umbral térmico al frío no hemos encontrado diferencias en cuanto al sexo como si encontramos en los otros dos modelos. También hemos encontrado un aumento de la sensibilidad en función de la edad. Así si lo comparamos con otro estudio en el que también se midió la sensibilidad térmica al frío encontramos resultados contradictorios.²⁸ En

este estudio no analizaron la influencia del sexo aunque sí que se reportó una disminución de la sensibilidad cuando la muestra se dividió en tres grupos de edad, jóvenes, adultos y ancianos en la cual los jóvenes presentaban una mayor sensibilidad que los ancianos.

En cuanto a los intervalos de referencia podemos observar que en algunos grupos de edad los valores de los percentiles se sitúan por debajo del rango del estesiómetro. Esto es debido a que el modelo predice esos valores, aunque el aparato no pueda alcanzarlos. Es interesante considerar a su vez que los rangos obtenidos son muy amplios cubriendo casi todo el rango del aparato en algunos casos.

Considerando el comportamiento del modelo a la hora de clasificar una muestra externa de ojos sin patología podemos decir que en general fue bueno. La capacidad de clasificación más alta la obtuvo el modelo de umbral térmico al frío con un 93.2% de los ojos clasificados como normales, seguido del umbral mecánico con un 93%. Sin embargo, el umbral calor no alcanzó el 90% de clasificación elegido quedándose en un 88%.

Las limitaciones principales de este estudio se deben a que la muestra ha sido tomada por distintos operadores con lo que la variabilidad de la técnica puede aumentar. La medida de la distancia de la punta del estesiómetro hasta el ápex corneal depende enteramente del operador y por tanto operadores distintos pueden juzgar esa distancia de manera diferente. Para evitar esto una de las opciones que puede ser tenida en cuenta es la modificación del estesiómetro añadiendo cámaras que sean capaces de medir la distancia a la córnea de manera precisa, como ya hicieron *González et al.*³⁰ De esta forma esta variable tan crítica para la realización de la prueba puede ser controlada para disminuir la variabilidad inter-operador de esta prueba. Además, la toma de los datos se ha extendido de gran manera en el tiempo con lo que pueden haberse dado variaciones en el aparato debido al envejecimiento del mismo y la toma de la muestra se ha realizado por operadores distintos aumentando la variabilidad. Por último, la gran variabilidad de los datos hace que los rangos de normalidad sean muy amplios y que por lo tanto se limite la eficacia de esta prueba a la hora de identificar a un sujeto sano de uno con patología. De momento esta prueba puede utilizarse para monitorizar de manera individual el estado de la sensibilidad corneal del paciente. A la hora de reducir esta variabilidad y disminuir los rangos se podría aumentar el tamaño muestral utilizando un mismo operador.

En líneas futuras sería interesante ampliar la muestra utilizando un mismo operador para reducir la variabilidad encontrada, además de validar los intervalos en muestras totalmente externas sin patología y con patología.

8. Conclusiones

Se ha conseguido modelizar los umbrales de sensibilidad mecánica y térmica al calor y al frío en una población sana utilizando estesiometría corneal de no contacto para definir los intervalos de referencia asociados a estas variables. El rango de normalidad abarca casi todo el rango de medida del aparato.

Se ha determinado que la sensibilidad mecánica es dependiente de la edad y el sexo y que aumentan según nos hacemos mayores. En cuanto a la sensibilidad térmica al calor también depende de la edad y del sexo y parece disminuir hasta la tercera década de la vida para luego aumentar ligeramente hasta la sexta década y de ahí disminuir otra vez. Finalmente, la sensibilidad térmica al frío solo depende de la edad y aumenta según nos hacemos más mayores.

La prueba de estesiometría corneal de no contacto puede servir de manera más satisfactoria como una prueba de tipo individual para monitorizar los cambios en la sensibilidad de un paciente a lo largo del tiempo ya que los rangos de normalidad para la sensibilidad corneal son tan amplios que limitan su capacidad como prueba diagnóstica. El aumento del tamaño muestral es necesario para intentar reducir la variabilidad de los intervalos y aumentar la capacidad diagnóstica de la prueba.

9. Bibliografía

1. DelMonte, D. W. & Kim, T. Anatomy and physiology of the cornea. *J. Cataract Refract. Surg.* **37**, 588–98 (2011).
2. Müller, L. J., Marfurt, C. F., Kruse, F. & Tervo, T. M. T. Corneal nerves: Structure, contents and function. *Exp. Eye Res.* **76**, 521–542 (2003).
3. He, J., Bazan, N. G. & Bazan, H. E. P. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp. Eye Res.* **91**, 513–523 (2010).
4. Marfurt, C. F., Cox, J., Deek, S. & Dvorscak, L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp. Eye Res.* **90**, 478–492 (2010).
5. Cruzat, A., Qazi, Y. & Hamrah, P. In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves in Health and Disease. *Ocul. Surf.* **15**, 15–47 (2017).
6. Magendie, J. De la influencia de la cinquieme paire nerfts sur la nutrition et les fonctions de l'œil. *J. Physiol.* **4**, 176–182 (1824).
7. Bourcier, T. *et al.* Decreased corneal sensitivity in patients with dry eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 2341–2345 (2005).
8. ML, T. *et al.* Sensibilidad corneal. Una medida clave para la salud ocular. *Ver y Oír*
9. Tesón, M., Calonge, M., Fernández, I., Stern, M. E. & González-García, M. J. Characterization by Belmonte's gas esthesiometer of mechanical, chemical, and thermal corneal sensitivity thresholds in a normal population. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 3154–3160 (2012).
10. Golebiowski, B., Papas, E. & Stapleton, F. Assessing the sensory function of the ocular surface: Implications of use of a non-contact air jet aesthesiometer versus the Cochet-Bonnet aesthesiometer. *Exp. Eye Res.* **92**, 408–413 (2011).
11. Belmonte, C., Acosta, M. C., Schmelz, M. & Gallar, J. Measurement of corneal sensitivity to mechanical and chemical stimulation with a CO2 esthesiometer. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (1999).
12. Acosta, M. C., Tan, M. E., Belmonte, C. & Gallar, J. Sensations evoked by selective mechanical, chemical, and thermal stimulation of the conjunctiva and cornea. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2001). doi:10.1016/S0002-9394(01)01279-X
13. Royston, P. & Wright, E. M. *Goodness-of-fit statistics for age-specific reference intervals. Statistics in medicine* **19**, (2000).
14. Grasbeck, R. Establishment and use of normal values. . *Scand J Clin Invest* 1–15 (1969).
15. Horn, P. S. & Pesce, A. J. Reference intervals: an update. *Clin. Chim. Acta* **334**, 5–23 (2003).
16. Rigby, R. A. & Stasinopoulos, D. M. Generalized Additive Models for Location, Scale and Shape. *J. R. Stat. Soc.* **54**, 507–554 (2005).
17. Stapleton, F. *et al.* Corneal and conjunctival sensitivity to air stimuli. *Br. J. Ophthalmol.* **88**, 1547–1551 (2004).
18. Acosta, M. C., Alfaro, M. L., Borrás, F., Belmonte, C. & Gallar, J. Influence of age, gender and iris color on mechanical and chemical sensitivity of the cornea and conjunctiva. *Exp. Eye Res.* **83**, 932–938 (2006).

19. Khezri, F., Mirzajani, A., Karimian, F. & Jafarzadehpur, E. Is corneal sensitivity sex dependent? *J. Ophthalmic Vis. Res.* **10**, 102–105 (2015).
20. Mirzajan, A., Khezri, F., Jafarzadehpur, E., Karimian, F. & Khabazkhoob, M. Normal corneal sensitivity and its changes with age in Tehran, Iran. *Clin. Exp. Optom.* **98**, 54–57 (2015).
21. R Core, T. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (2018). Available at: <https://www.r-project.org/>.
22. Stasinopoulos, M. & Rigby, B. *A flexible regression approach using GAMLSS in R.* (2009).
23. Dunn, P. K. & Smyth, G. K. Randomized Quantile Residuals. *J. Comput. Graph. Stat.* **5**, 236–244 (1996).
24. Van Buuren, S. & Fredriks, M. Worm plot: A simple diagnostic device for modelling growth reference curves. *Stat. Med.* **20**, 1259–1277 (2001).
25. Golebiowski, Bl., Papas, E. & Stapleton, F. Factors Affecting Corneal and Conjunctival Sensitivity Measurement. *Optom Vis Sci* **85**, 241–246 (2008).
26. Acosta, M. C., Belmonte, C. & Gallar, J. Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J. Physiol.* **534**, 511–525 (2001).
27. De Paiva, C. S. & Pflugfelder, S. C. Corneal epitheliopathy of dry eye induces hyperesthesia to mechanical air jet stimulation. *Am. J. Ophthalmol.* **137**, 109–115 (2004).
28. Murphy, P. J., Patel, S., Kong, N., Ryder, R. E. J. & Marshall, J. Noninvasive assessment of corneal sensitivity in young and elderly diabetic and nondiabetic subjects. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1737–1742 (2004).
29. Lopez-de la Rosa, A. *et al.* Corneal Sensitivity and Inflammatory Biomarkers in Contact Lens Discomfort. *Optom Vis Sci* **93**, 892–900 (2016).
30. Gonzalez, A. *et al.* Age-Related Corneal Sensitivity assessed with a modified BHVI-Belmonte Aesthesiometer: a preliminary study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, (2014).

Anexos

Anexo A

Tabla 1A. Transformación de la temperatura del estesiómetro a la temperatura de la córnea y al umbral.

Sensación de calor			Sensación de frío		
Temperatura del estesiómetro	Temperatura de la córnea	Umbral de calor	Temperatura del estesiómetro	Temperatura de la córnea	Umbral de frío
50 °C	34.0 °C	0.0	50 °C	34.0 °C	0.0
55 °C	34.4 °C	0.4	45 °C	33.6 °C	-0.4
60 °C	34.8 °C	0.8	40 °C	33.2 °C	-0.8
65 °C	35.2 °C	1.2	35 °C	32.8 °C	-1.2
70 °C	35.6 °C	1.6	30 °C	32.4 °C	-1.6
75 °C	36.0 °C	2.0	25 °C	32.0 °C	-2.0
80 °C	36.4 °C	2.4	20 °C	31.6 °C	-2.4
85 °C	36.8 °C	2.8	15 °C	31.2 °C	-2.8
90 °C	37.2 °C	3.2	10 °C	30.8 °C	-3.2
95 °C	37.6 °C	3.6	5 °C	30.4 °C	-3.6
100 °C	38.0 °C	4.0	0 °C	30.0 °C	-4.0

°C = Grados centígrados. Adaptado de: Acosta MC, Belmonte C, Gallar J. Sensory experiences in humans and single-unit activity in cats evoked by polymodal stimulation of the cornea. *J Physiol.* 2001;534.2:511–25.²⁶



IOBA Consentimiento Informado

'FENOTIPADO DE LAS GLÁNDULAS DE MEIBOMIO Y CAMBIOS CON LA EDAD EN RELACIÓN CON SU FUNCIÓN Y MORFOLOGÍA'



TÍTULO DEL ESTUDIO

Fenotipado de las glándulas de Meibomio y cambios en la edad en relación con su función y morfología.

Promotor: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada – Pº de Belén 17 47011 – Valladolid

Equipo Investigador: Andrea Novo Díez

Marta Blanco Vázquez

Mª Pilar Cañadas Suárez

Mª Jesús González García

Pablo Arlanzón Lope

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Está siendo usted invitado a participar en un estudio de investigación cuyo objetivo es caracterizar la morfología de las glándulas de Meibomio en sujetos sanos y observar cómo varían sus características en función de la edad.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento.

CONDICIONES DEL ESTUDIO

Si decide participar, usted accede a que se le realicen cuestionarios de salud general y ocular, y una evaluación de la superficie ocular mediante pruebas habituales descritas posteriormente.

DESCRIPCIÓN DE LA VISITA

Las pruebas citadas anteriormente tendrán lugar en una única visita de 1 hora de duración aproximadamente.

En primer lugar, se le informará sobre el propósito y la metodología del estudio, se le responderá a todas las preguntas que plantee y se le pedirá que firme este formulario de consentimiento antes de iniciar su participación.

Se le preguntará sobre su actual estado de salud, general y ocular y se le pedirá que cumplimente un cuestionario sobre sus síntomas oculares.

Se realizarán las siguientes pruebas

- Medida de la agudeza visual y refracción en gafa.
- Evaluación de la película lagrimal* (prueba opcional según el criterio del investigador principal).

- Biomicroscopía de polo anterior: evaluación del estado de la superficie ocular con una lámpara de hendidura, y tras instilar tinciones vitales (fluoresceína y verde de lisamina).
- TBUT: medida del tiempo que tarda la lágrima en desestabilizarse (con fluoresceína).
- Evaluación de las glándulas de Meibomio con lámpara de hendidura.
- Evaluación de la morfología de las glándulas de Meibomio mediante meibografía.
- Medida de la sensibilidad corneal con un estesiómetro de no contacto.
- Test de Schirmer: medida de la producción lagrimal.

RIESGOS Y MOLESTIAS PREVISIBLES PARA EL PACIENTE

No se ha reportado ningún daño derivado de los procedimientos utilizados en este estudio. Ninguno de los procedimientos que se le van a realizar durante las visitas resulta doloroso.

SUS RESPONSABILIDADES

Usted deberá responder con sinceridad a las preguntas que se le realicen tanto en el cuestionario de salud general y ocular como en el cuestionario sobre síntomas oculares. Se le pedirá que comunique al personal investigador del estudio cualquier cambio de salud o en su medicación (con o sin prescripción médica) que experimente.

CONFIDENCIALIDAD

De acuerdo a la Ley 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, se le informa de que sus datos se incluirán en un fichero de datos personales cuyo responsable y titular es el IOBA. Puede publicarse un informe de los resultados de este estudio o enviarse a las autoridades sanitarias pertinentes, pero su nombre no aparecerá en estos documentos.

Su nombre puede ser revelado a las autoridades sanitarias gubernamentales como la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) o a los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEICs) en caso de que necesiten inspeccionar sus archivos clínicos. Se tomarán las medidas oportunas para mantener la confidencialidad de los archivos clínicos y de la información personal.

PERSONAS DE CONTACTO

Se le anima a que consulte con el personal encargado del estudio cualquier duda que tenga debiendo recibir respuestas satisfactorias a todas sus preguntas. Puede ponerse en contacto con:

Andrea Novo Diez: anovod@ioba.med.uva.es - teléfono: 983 184761

M^a Jesús González García: mjgonzalez@ioba.med.uva.es - teléfono: 983 184191

M^a Pilar Cañadas Suárez: mariapilar.canadas@uva.es— teléfono: 983 184853

Se le entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para sus propios archivos antes de su participación en el estudio.

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Título del estudio: Fenotipado de las glándulas de Meibomio y cambios con la edad en relación con su función y morfología.

Al firmar abajo, yo declaro que:

1. He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto.
2. He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas.
3. Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento.
4. Personal del equipo investigador: _____, Dirección: Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada, Valladolid; Número de Teléfono: 983 184761; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación.
5. He comprendido completamente que los representantes del equipo investigador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros clínicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
6. Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

PACIENTE

Nombre: _____

NIF: _____

Firma: _____

Fecha: _____

REPRESENTANTE LEGAL AUTORIZADO (si aplica)

Nombre: _____

NIF: _____

En calidad de: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Persona que explicó el consentimiento informado

Nombre: _____

NIF: _____

Firma: _____

Fecha: _____

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Nombre: _____

NIF: _____

Firma: _____

Fecha: _____

**APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO
(CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)**

Yo _____ revoco el
consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado con fecha

Firma:

Anexo C

Tabla 1C. Modificaciones del modelo en función de la forma de la curva ajustada en el worm plot.

Forma de la curva ajustada en el worm plot	Residuos	Variable respuesta
Nivel por encima del origen	Media demasiado alta	El parámetro de localización (μ) es demasiado bajo
Nivel por debajo del origen	Media demasiado baja	El parámetro de localización (μ) es demasiado alto
Pendiente positiva	Varianza demasiado alta	El parámetro de escala (σ) es demasiado bajo
Pendiente negativa	Varianza demasiado baja	El parámetro de escala (σ) es demasiado alto
Forma U	Asimetría Positiva	El parámetro de asimetría (ν) es demasiado bajo
Forma U invertida	Asimetría Negativa	El parámetro de asimetría (ν) es demasiado alto
Forma S con la cola izquierda por debajo	Más apuntada que la normal	El parámetro de curtosis (τ) es demasiado bajo
Forma S con la cola izquierda por arriba	Menos apuntada que la normal	El parámetro de curtosis (τ) es demasiado alto

μ = media; σ = desviación típica; ν = simetría; τ = curtosis.

Anexo D

Tabla 1D. Parámetros de los residuos del umbral mecánico.

Media (IC95%)	Varianza (IC95%)	Coficiente de Asimetría (IC95%)	Coficiente de Curtosis (IC95%)
-0.04 (-0.21, 0.129)	0.93 (0.739, 1.213)	0.24 (-0.126, 0.634)	3.14 (2.562, 3.798)

IC = Intervalo de Confianza.

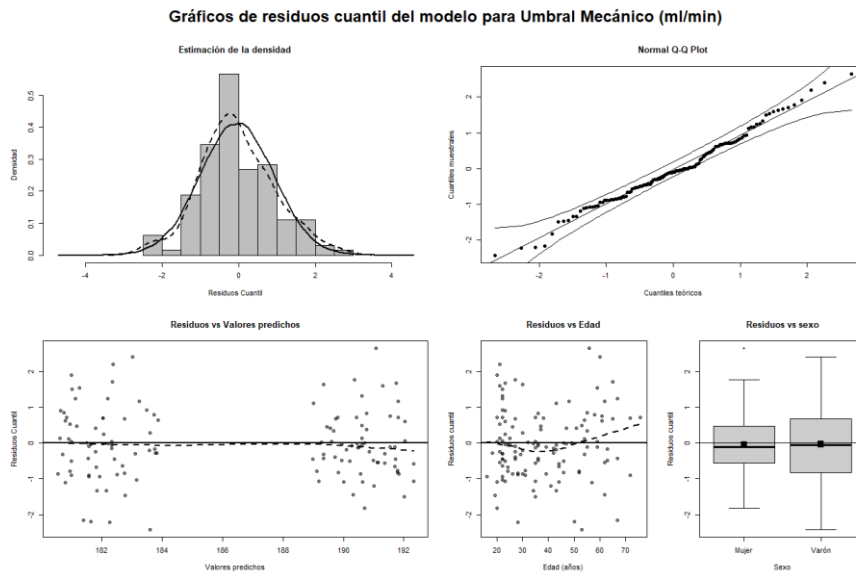


Figura 1D. Gráficos de residuos para el modelo de umbral mecánico. En el histograma la densidad estimada es la línea punteada y la densidad de la normal estándar la línea sólida. En los plots de residuos se representa la línea $Y=0$ (sólida) y la curva suavizada (puntuada).

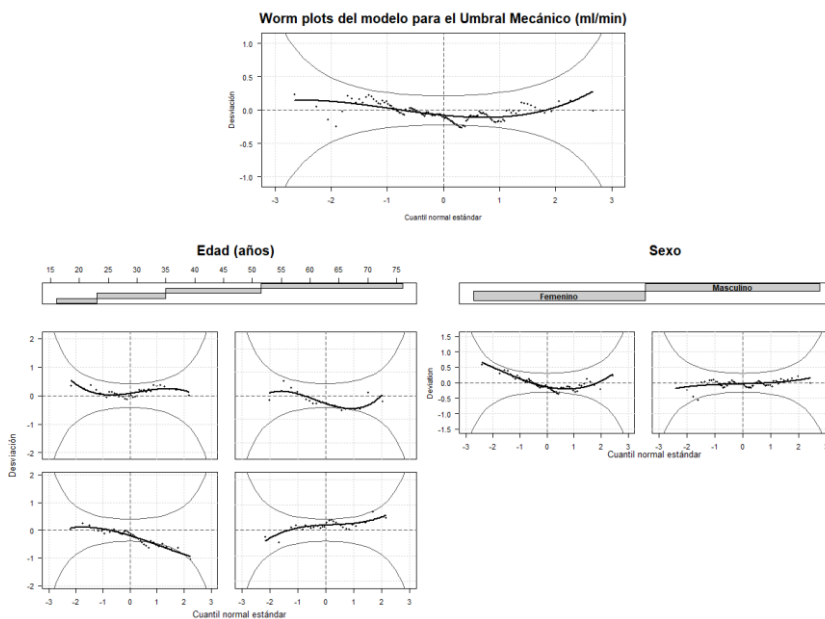


Figura 2D. Worm plot para el modelo de umbral mecánico. Para la edad se consideran 4 rangos y los gráficos se colocan en orden por filas (F1 los dos primeros rangos y F2 los dos últimos).

Tabla 2D. Parámetros de los residuos para el modelo de umbral térmico al frío.

Media (IC95%)	Varianza (IC95%)	Coficiente de Asimetría (IC95%)	Coficiente de Curtosis (IC95%)
0 (-0.174,0.178)	1.01 (0.8,1.314)	-0.01 (-0.382,0.351)	3.01 (2.506,3.665)

IC: Intervalo de Confianza.

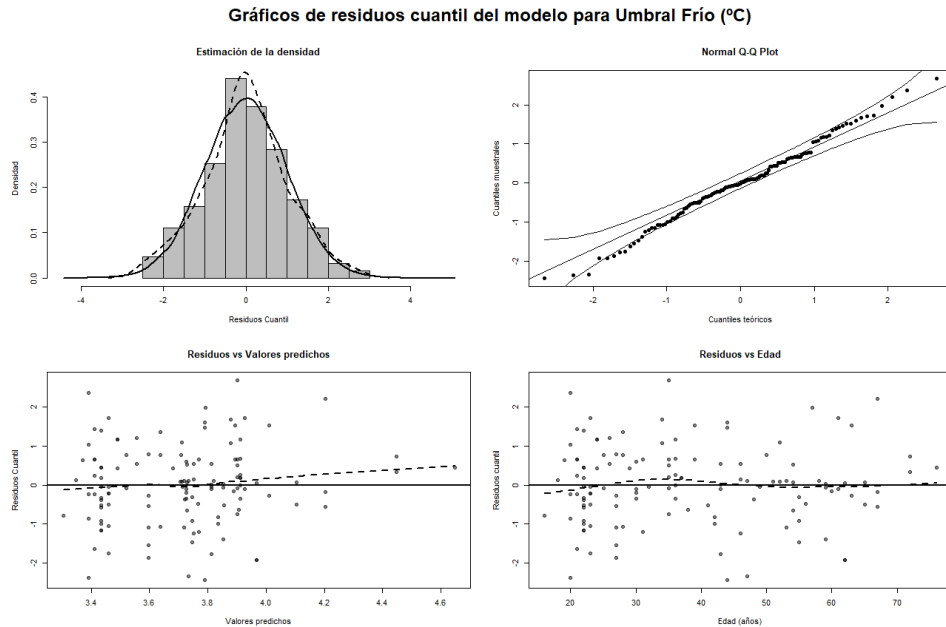


Figura 3D. Gráfico de residuos para el umbral térmico al frío. En el histograma la densidad estimada es la línea punteada y la densidad de la normal estándar la línea sólida. En los plots de residuos se representa la línea $Y=0$ (sólida) y la curva suavizada (puntuada).

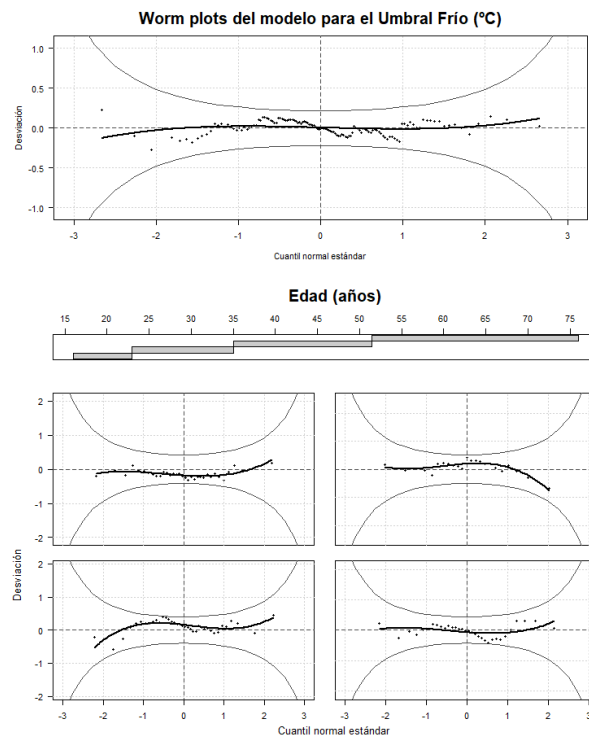


Figura 4D. Worm plot para el modelo de umbral térmico al frío. Para la edad se consideran 4 rangos y los gráficos se colocan en orden por filas (F1 los dos primeros rangos y F2 los dos últimos).

Tabla 3D. Parámetros de los residuos para el segundo modelo de umbral térmico al calor.

Media (IC95%)	Varianza (IC95%)	Coefficiente de Asimetría (IC95%)	Coefficiente de Curtosis (IC95%)
-0.01 (-0.185,0.167)	1.01 (0.798,1.31)	0.04 (-0.332,0.373)	2.93 (2.425,3.454)

IC = Intervalo de Confianza.

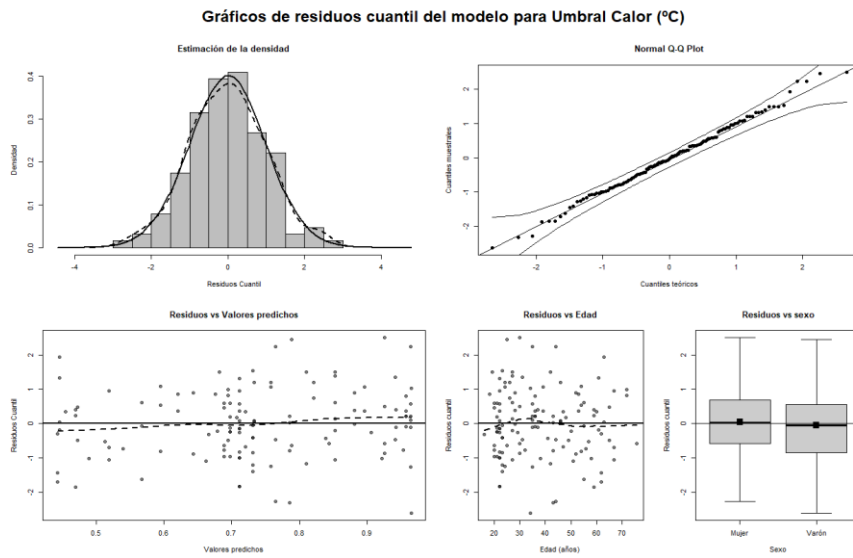


Figura 5D. Gráfico de residuos para el segundo modelo de umbral térmico al calor. En el histograma la densidad estimada es la línea punteada y la densidad de la normal estándar la línea sólida. En los plots de residuos se representa la línea $Y=0$ (sólida) y la curva suavizada (puntuada).

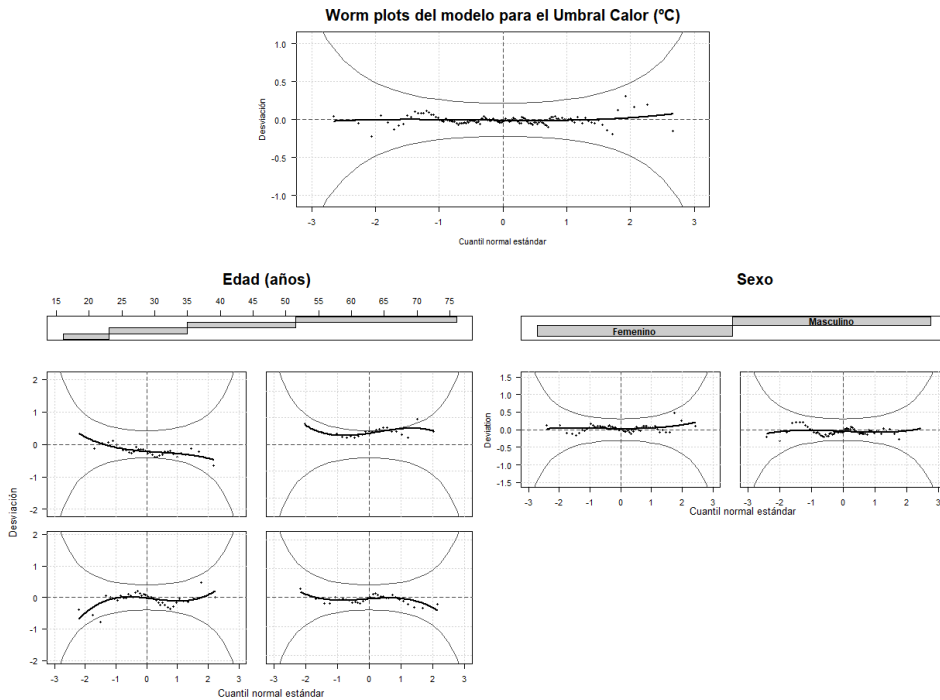


Figura 6D. Worm plot para el modelo del segundo umbral térmico al calor. Para la edad se consideran 4 rangos y los gráficos se colocan en orden por filas (F1 los dos primeros rangos y F2 los dos últimos).

Anexo E

Tabla 1E. Intervalos de referencia para el umbral mecánico en función de la edad y sexo.

Edad	Sexo: M					Sexo: F				
	2.5	5	50	95	97.5	2.5	5	50	95	97.5
≤20	19.05	29.3	122.41	182.4	185.51	19.94	30.66	128.11	190.88	194.14
(20,25]	16.65	26.26	119.39	182.14	185.41	17.43	27.49	124.95	190.62	194.04
(25,30]	14.21	23.1	115.94	181.83	185.29	14.87	24.17	121.34	190.3	193.92
(30,35]	12.01	20.14	112.37	181.5	185.16	12.56	21.08	117.6	189.95	193.78
(35,40]	10.03	17.4	108.68	181.15	185.02	10.5	18.21	113.74	189.58	193.63
(40,45]	8.28	14.9	104.88	180.76	184.87	8.66	15.59	109.76	189.17	193.47
(45,50]	6.75	12.62	100.98	180.35	184.7	7.06	13.21	105.68	188.74	193.29
(50,55]	5.43	10.58	96.97	179.9	184.51	5.68	11.07	101.48	188.27	193.1
(55,60]	4.31	8.76	92.87	179.42	184.31	4.51	9.17	97.2	187.77	192.89
(60,65]	3.36	7.17	88.69	178.9	184.09	3.52	7.5	92.82	187.23	192.66
(65,70]	2.58	5.79	84.45	178.34	183.86	2.7	6.06	88.38	186.64	192.41
(70,75]	1.95	4.61	80.14	177.75	183.6	2.04	4.82	83.87	186.02	192.14
(75,80]	1.63	3.98	77.53	177.37	183.43	1.71	4.17	81.14	185.62	191.97

H = Hombre; M = Mujer.

Tabla 2E. Intervalos de referencia para el umbral térmico al calor

Edad	Sexo: H					Sexo: M				
	2.5	5	50	95	97.5	2.5	5	50	95	97.5
≤20	0.15	0.25	1.11	3.26	3.37	0.15	0.25	1.11	3.41	3.52
(20,25]	0.21	0.33	1.21	3.26	3.37	0.21	0.33	1.21	3.41	3.52
(25,30]	0.3	0.43	1.34	3.26	3.37	0.3	0.43	1.34	3.41	3.52
(30,35]	0.35	0.48	1.4	3.26	3.37	0.35	0.48	1.4	3.41	3.52
(35,40]	0.32	0.46	1.37	3.26	3.37	0.32	0.46	1.37	3.41	3.52
(40,45]	0.25	0.37	1.26	3.26	3.37	0.25	0.37	1.26	3.41	3.52
(45,50]	0.18	0.28	1.16	3.26	3.37	0.18	0.28	1.16	3.41	3.52
(50,55]	0.13	0.22	1.06	3.26	3.37	0.13	0.22	1.06	3.41	3.52
(55,60]	0.1	0.18	0.99	3.26	3.37	0.1	0.18	0.99	3.41	3.52
(60,65]	0.09	0.17	0.97	3.26	3.37	0.09	0.17	0.97	3.41	3.52
(65,70]	0.12	0.2	1.03	3.26	3.37	0.12	0.2	1.03	3.41	3.52
(70,75]	0.17	0.27	1.14	3.26	3.37	0.17	0.27	1.14	3.41	3.52
(75,80]	0.21	0.32	1.21	3.26	3.37	0.21	0.32	1.21	3.41	3.52

H = Hombre; M = Mujer.

Tabla 3E. Intervalos de referencia para el umbral térmico al frío.

Edad	Sexo: Ambos				
	2.5	5	50	95	97.5
≤20	0.2	0.34	2.09	3.47	3.55
(20,25]	0.16	0.29	2.06	3.57	3.66
(25,30]	0.13	0.24	2.06	3.73	3.84
(30,35]	0.1	0.2	2.06	3.93	4.06
(35,40]	0.07	0.16	1.97	4	4.13
(40,45]	0.05	0.11	1.81	3.91	4.04
(45,50]	0.03	0.08	1.64	3.8	3.94
(50,55]	0.02	0.06	1.51	3.77	3.92
(55,60]	0.01	0.04	1.41	3.84	4.01
(60,65]	0.01	0.03	1.34	4	4.19
(65,70]	0.01	0.02	1.28	4.22	4.43
(70,75]	0	0.01	1.21	4.43	4.68
(75,80]	0	0.01	1.16	4.56	4.83