

OBJETIVACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO
DEL SÍNDROME DE OJO SECO.
CORRELACIÓN ENTRE PRUEBAS
CLÍNICAS

Fdo.:.....
Hugo Pena Verdeal

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO
EN MEDICINA MOLECULAR
FACULTADE DE ÓPTICA E OPTOMETRÍA



AUTORIZACIÓN DAS DIRECTORAS DA TESE

Dna. Eva Yebra-Pimetel Vilar, Profesora do Departamento de Física aplicada e Dna. María Jesús Giraldez Fernández, Profesora do Departamento de Física aplicada, como Director/a/es/as da Tese de Doutoramento titulada:

«OBJETIVACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE OJO SECO.
CORRELACIÓN ENTRE PRUEBAS CLÍNICAS»

Presentada por D. Hugo Pena Verdeal, alumno do Programa de Doutoramento en Medicina Molecular

Autorizamos a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Director da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 30/1992.

Asdo.....
Eva Yebra-Pimentel Vilar

Asdo.....
María Jesús Giraldez Fernández



*A mi familia, pareja y amigos,
el apoyo sin el que nada sería posible*





«People assume that time is a strict progression of cause to effect, but, actually, from a non-linear, non-subjective viewpoint, it's more like a big ball of wibbly wobbly... timy wimey... stuff»

The Tenth Doctor





Agradecimientos

Primeramente quiero dedicar parte de mis agradecimientos a todos los compañeros del *Grupo de Optometría, GI-2092*. Este agradecimiento va especialmente dirigido a las dos directoras de este trabajo de tesis, la *Dra. Dña. Eva Yebra-Pimentel Vilar* y la *Dra. Dña. María Jesús Giraldez Fernández*, por su consejo y sobre todo su apoyo en la realización de éste trabajo. Destacar además a *D. Carlos García Resúa*, no solo por todo lo que me ha enseñado, sino también por ser un buen amigo durante todo este tiempo.

Agradecer además a los miembros del grupo de investigación *VARPA*, por el apoyo y la buena disposición mostrada a lo largo de estos, así como por todo el buen trabajo realizado en este tiempo.

A los alumnos y pacientes que participaron como voluntarios en las medidas, gracias a los cuales los resultados pudieron ser posibles.

A mis compañeros de *Óptica Eduardo Varela*, que aunque no interviniesen de manera directa en este trabajo, me han acompañado en este periplo siempre con el mejor de los humores.

Y sobre todo, mi agradecimiento más sentido a mi familia, especialmente a mi madre, padre y hermano; *Tila, Juan y Sergio*, sin los que jamás llegaría a donde estoy, por escuchar cuando hace falta y apoyar todas mis decisiones cuando más lo necesito. Y por supuesto, a mis amigos (ellos saben quiénes son) y pareja por ser quienes me dan siempre motivos para seguir adelante. Lo hecho hasta aquí no es un logro mío, es una victoria suya.

Gracias a todos





Objetivación en el diagnóstico del síndrome de ojo seco. Correlación entre pruebas clínicas.

RESUMEN

Mantener la estructura y función de la película lagrimal es esencial para que pueda existir una correcta visión y confort ocular. El Síndrome de Ojo Seco (SOS) es una enfermedad de la unidad funcional lagrimal con un diagnóstico controvertido cuya prevalencia ha aumentado mucho en los últimos años, influyendo a la calidad visual y calidad de vida de las personas.

La principal finalidad del presente trabajo es objetivizar tests clínicos de diagnóstico de SOS mediante técnicas semiautomáticas y automáticas de procesamiento de imagen y video, y desarrollar nuevos protocolos de medida, y así como analizar las relaciones entre los diferentes tests. Para ello, tomando como referencia los principales mecanismos de la patogénesis del Síndrome del ojo seco (la inestabilidad y la hiperosmolaridad lagrimal), la presente tesis se divide en tres partes principales: 1) un conjunto de cuatro estudios de la estabilidad de la película lagrimal donde se realizan análisis de diferentes parámetros de la misma y se valida un test automático de medida; 2) un estudio para validar un test de medida semiautomático para evaluar la altura del menisco lagrimal; y finalmente 3) un estudio donde se proponen y evalúan diferentes métodos de medida para el uso de un osmómetro basado en el descenso del punto de congelación aplicado a la película lagrimal.

Los estudios de validación demostraron resultados prometedores en los tests automáticos y semiautomáticos para el estudio de la estabilidad y cantidad de lágrima. Se encontraron además relaciones importantes de la estabilidad lagrimal con la cantidad de lípidos producidos a nivel palpebral, el área y evolución de la velocidad de ruptura y la osmolaridad lagrimal. Así mismo, los protocolos relacionados con el osmómetro basado en el punto de congelación, aunque presentan ciertas limitaciones, pueden aplicarse en lágrima con la dilución adecuada.

PALABRAS CLAVE

Síndrome de Ojo seco, Diagnóstico del SOS, Estabilidad de la película lagrimal, Menisco Lagrimal, Osmolaridad Lagrimal.

Objetivación no diagnóstico do síndrome de olho seco. Correlación entre probas clínicas.

RESUMO

Manter a estrutura e función da película lagrimal é esencial para que poida existir unha correcta visión e confort ocular. O Síndrome de Ollo Seco (SOS) é unha enfermidade da unidade funcional lagrimal, cunha diagnose controvertida cuxa prevalencia aumentou nos últimos anos, influíndo na calidade visual e de vida das persoas.

A principal finalidade do presente traballo é facer unha obxetivización dos test clínicos de diagnose do SOS mediante técnicas semiautomáticas e automáticas de procesado de imaxe e vídeo, e desenvolver novos protocolos de medida, así como analizar as relacións entre os diferentes test. Para iso, e tomando como referencia os principais mecanismos na patoxénese da síndrome de olho seco (a inestabilidade e a hiperosmolaridade lagrimal) o presente traballo de tese divídese en tres partes principais: 1) un conxunto de catro estudos sobre a estabilidade da película lagrimal onde se realizan análises de diferentes parámetros da mesma e valídase un test automático de medida; 2) un estudo para validar un test de medida semiautomático para avaliar a altura do menisco lagrimal; e finalmente 3) un estudo onde se propoñen e avalían diferentes métodos de medida para o uso dun osmómetro baseado no descenso do punto de conxelación aplicado á película lagrimal.

Os estudos de validación demostraron resultados prometedores nos diferentes test automáticos e semiautomáticos para o estudo da estabilidade e cantidade de lágrima. Atopáronse ademais relacións importantes da estabilidade lagrimal coa cantidade de lípidos producidos a nivel palpebral, a área e velocidade de evolución da ruptura, e a osmolaridade lagrimal. Así mesmo, os protocolos relacionados co osmómetro baseado no descenso do punto de conxelación, aínda que presentan certas limitacións, poden aplicarse en lágrima coa dilución adecuada.

PALABRAS CHAVE

Síndrome de Olo seco, Diagnóstico do SOS, Estabilidade da película lagrimal, Menisco Lagrimal, Osmolaridade Lagrimal.

Objectification in the diagnosis of dry eye disease. Correlation between clinical tests.

SUMMARY

Good balance in tear film production and stability are necessary to fulfil its numerous functions on the ocular surface health. Dry eye disease (DED) is a common condition that causes symptoms of discomfort and visual distortions. DED is a pathology of the lacrimal functional system characterized by its rising prevalence and the diagnosis problems.

The aim of the present study was the objectification of DED diagnosis test by using automatic and semiautomatic image processing software, the development of measurement protocols, as well as the analysis of the correlation between clinical tests. Based on the main DED pathogenic mechanisms (tear film instability and hyperosmolarity), the present study was divided in three sections or studies: 1) a cluster of four studies about tear film stability, where a new software is validated and different tear film parameters were assessed; 2) one study for the validation of an open-source software for tear meniscus height measurement; and finally 3) one study where new protocols for the use of an osmometer based on the freezing point depression technique were proposed and evaluated.

The automatic and semiautomatic techniques for tear film stability and volume assessment showed good results. In addition, tear film stability showed a relationship with meibomian lipids, the area and speed break of the tear film, and the osmolarity. On the other hand, in spite of its limitation, with the adequate dilution, the osmometer based on the freezing point depression technique could be used on tear film assessment.

KEYWORDS

Dry Eye Disease, DED diagnostics, Tear film stability, Tear Meniscus, Tear Film Osmolarity

LISTA DE PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

1 PUBLICACIONES

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Miñones M, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Accuracy of a Freezing Point Depression Technique Osmometer. *Optometry and Vision Science*. 2015; 92:e273-83.

Ramos L, Barreira N, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Computational approach for tear film assessment based on break-up dynamics. *Biosystems Engineering*. 2015; 138:90-103.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Remeseiro B, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Correlation between tear osmolarity and tear meniscus. *Optometry and Vision Science*. 2014; 91:1419-29.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Miñones M, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Interobserver and intraobserver repeatability of lipid layer pattern evaluation by two experienced observers. *Contact Lens & Anterior Eye*. 2014; 37:431-7.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Ramos L, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Diurnal BUT variations determined in healthy subjects by software-assisted interpretation of tear film videorecordings. *Clinical & Experimental Optometry*. *Accepted April, 6 - 2015*.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Ramos L, Yebra-Pimentel E, Giraldez MJ. Analysis of the relationship between tear film dynamic stability and osmolarity. *Ophthalmic Physiol Opt*. *Submission 01/08/2015*.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Barreira N, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Validation of an open-source software for tear meniscus height measurement. *Contact Lens & Anterior Eye*. *Submission 11/03/2015; Revision 1 04/08/2015*.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Miñones M, Yebra-Pimentel E, Giraldez MJ. Clinical relationship between lid margin meibum and tear film stability. *Eye & Contact Lens*. *Submission 22/09/2015*.

2 PROCEEDING

Sanchez L, Barreira N, **Pena-Verdeal H**, Yebra-Pimentel E. A Novel Framework for Hyperemia Grading Based on Artificial Neural Networks. In: Rojas I, Joya G, Catala A, editors. *Advances in Computational Intelligence*. 13th International Work-Conference on Artificial Neural Networks, IWANN 2015, Palma de Mallorca, España, June 10-12, 2015. *Proceedings, Part I*: Springer International Publishing; 2015. p. 263-75.

Carpente A, Ramos L, Barreira N, Penedo MG, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ. On the Automation of the Tear Film Non-invasive Break-up Test. *IEEE 27th International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS)*. New York, NY: IEEE; 2014. p. 185 - 8.

Ramos L, Barreira N, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ. Automatic assessment of tear film break-up dynamics. *Studies in health technology and informatics*. 2014; 207:173-82.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Ramos L, Mosquera A, Yebra-Pimentel E, Giraldez MJ. Measuring the area of tear film break-up by image analysis software. In: SPIE P, editor. *8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Application*. Porto (Portugal): Proc. SPIE; 2013.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Remeseiro B, Penedo MG, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Criteria for lipid layer pattern evaluation: Pli-marker database. In: Costa MFPCM, editor. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications. Porto (Portugal): Proc. SPIE; 2013.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Miñones M, Gilino J, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Accuracy of two osmometers on standard samples: electrical impedance technique and freezing point depression technique. In: Costa MFPCM, editor. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications. Porto (Portugal): Proc. SPIE; 2013.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Lira M, Real Oliveira ME, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Comparison between three methods to value lower tear meniscus measured by image software. In: Costa MFPCM, editor. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications. Porto (Portugal): Proc. SPIE; 2013.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Lira M, Penedo MG, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Interobserver and intraobserver repeatability of lipid layer pattern evaluation by two experienced observers. In: Costa MFPCM, editor. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications. Porto (Portugal): Proc. SPIE; 2013.

Ramos L, Mosquera A, Barreira N, Currás M, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ, Penedo, M.G. Computational Approach for Measuring the Tear Film Break-Up Time in an Unsupervised Manner. In: Jain JWTL, editor. Advanced Techniques for Knowledge Engineering and Innovative Applications: Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 254-67.

Ramos L, Barreira N, Mosquera A, **Pena-Verdeal H**, Yebra-Pimentel E. Break-Up Analysis of the Tear Film Based on Time, Location, Size and Shape of the Rupture Area. In: Kamel M, Campilho A, editors. Image Analysis and Recognition, 10th International Conference, ICIAR 2013. Póvoa do Varzim (Portugal): Springer Berlin Heidelberg; 2013. p. 695-702.

Ramos L, Mosquera A, Barreira N, Currás M, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ, Penedo, M. G. Adaptive parameter computation for the automatic measure of the Tear Break-Up Time. In: Manuel Graña CT, Jorge Posada, Robert J. Howlett, Lakhmi C. Jain, editor. 16th International Conference on Knowledge-Based and intelligent Information & Engineering Systems. San Sebastián (España): IOS Press Ebook; 2012. p. 1370 - 9.

3 COMUNICACIONES A CONGRESOS

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Yebra-Pimentel E, Giraldez MJ. Differences between morning and afternoon tear film osmolarity in normal subjects. Pilot Study. 12th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV15). Braga (Portugal) 2015.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Sanchez L, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Validation of an open source software applied to tear meniscus height assessment. 12th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV15). Braga (Portugal) 2015.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Correlation between tear osmolarity and tear meniscus under symptomatic clustering. 12th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV15). Braga (Portugal) 2015.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Tear Film Osmolarity and dry eye symptoms. III Encontro da Mocidade Investigadora EDI-USC. Santiago de Compostela (España) 2015.

Ramos L, Barreira N, Mosquera A, **Pena-Verdeal H**, Penedo MG. Automatic classification of tear film rupture areas. Vision Sciences and Eye Research Meeting (ViSER 2014). Santiago de Compostela (España) 2014.

Ramos L, Barreira N, Molinelli JM, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ. Computerized tool for an automatic break-up assessment. II International Conference on Applications of Optics and Photonics (AOP 2014). Aveiro (Portugal) 2014.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Miñones M, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Osmolality measurement of eye drops with a freezing point depression Osmometer. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14). Braga (Portugal) 2014.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Miñones M, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Correlation between Osmolarity and common Dry Eye Symptoms. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14). Braga (Portugal) 2014.

Ramos L, Barrera N, Mosquera A, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ. Computerized tool for evaluating tear film break-up dynamics. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14). Braga (Portugal) 2014.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Barreira N, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Assessment of lower tear meniscus height by ImageJ software. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14) 2014.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Miñones M, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Medida de la osmolalidad en un grupo de soluciones salinas y multipropósito. 23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM2014). Madrid. (España) 2014.

Pena-Verdeal H, Donis J, Garcia-Resua C, Yebra-Pimentel E, Giraldez MJ. Variación diurna en la calidad de la película lagrimal de sujetos control mediante el tiempo de ruptura lagrimal. 23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM2014). Madrid. (España) 2014.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Relación entre osmolaridad y menisco lagrimal. Influencia de la edad. Oral, coautor. 23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM2014). Madrid (España) 2014.

Ramos L, Barreira N, Mosquera A, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ. Computerized tool for video analysis in a tear film break-up test framework. VII Iberoamerican Conference on Optics - XI Latinamerican meeting on Optics, Lasers and Applications (RIAO-OPTILAS 2013). Porto (Portugal) 2013.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Donis J, Ramos L, Yebra-Pimentel E, Giraldez MJ. Inter-observer variation on BUT evaluation. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal) 2013.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Miñones M, Gilino J, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Intersession repeatability of two osmometers. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal) 2013.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Lira M, Remeseiro B, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Relationship between Interferential Lipid Layer Patterns and Tear Break-Up Time. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal) 2013.

Garcia-Resua C, **Pena-Verdeal H**, Lira M, Real Oliveira ME, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Assessment of lateral lower Tear meniscus height by image analysis software. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal) 2013.

Ramos L, Barreira N, Mosquera A, **Pena-Verdeal H**, Giraldez MJ. Computer Aided Diagnosis system for the evaluation of the tear film Break-Up Test and the characterization of the rupture áreas. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal) 2013.

Remeseiro B, Ramos L, Barreira N, Penedo MG, **Pena-Verdeal H**. Evaluación automática del síndrome de ojo seco. II Reunión de la Sociedad Gallega de Optometría Clínica. Santiago de Compostela, (España) 2013.

Pena-Verdeal H, Garcia-Resua C, Giraldez MJ, Yebra-Pimentel E. Diurnal variations in tear film quality in healthy subjects evaluated by break-up time. I Encontro da Mocidade Investigadora EDI-USC. Santiago de Compostela (España) 2012.



ABREVIATURAS

AB: *Area of tear film break*, Área de ruptura de la película lagrimal.
ANOVA: *One-way analysis of variance*, Análisis de la varianza en una dirección.
CCLRU: *Cornea and Contact Lens Research Unit Grading*
CLEK: *Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus*
DE: Desviación Estándar;
DEWS: *International Dry Eye Workshop*
DGM: Disfunciones de las Glándulas de Meibomio
GPs: *Glycoproteins*, Glicoproteínas
ICC: *Intraclass correlation coefficient*, Coeficiente de Correlación interclase.
IgE: Inmunoglobulina E
IL: *Interleukin*, Interleucinas
LC: Lente de contacto
MAP: *Mitogen-Activated Protein*, proteína activada por mitógenos
MBI: *Maximum Blink Interval*, Intervalo máximo de parpadeo
MMPs: *Matrix metalloproteinases*, Metaloproteasas de Matriz
NIBUT: *Non-invasive break-up time*
NIK BUT: *Non-invasive-Keratograph-break-up time*
OCT: *Optical Coherence Tomography*, Tomografía de Coherencia óptica
OSDI: *Ocular Surface Disease Index*
IQR: Rango Intercuartil
SB: *Speed of tear film break*, Velocidad de ruptura de la película lagrimal
SFTP: *Secure File Transfer Protocol*
SO: Superficie Ocular
SOS: Síndrome de Ojo Seco
S-TBUD: *Starring tear break-up dynamics*
TBUT: *Tear Break-up time*, Tiempo de ruptura lagrimal.
TMA: *Tear meniscus area*, Área del menisco lagrimal
TMD: *Tear meniscus depth*, Profundidad del menisco lagrimal
TMH: *Tear meniscus height*, Altura del menisco lagrimal
TMH-SL: *Tear Meniscus Height thought Slit-lamp*, Altura del menisco lagrimal mediante lámpara de hendidura
TMH-Tc: *Tear Meniscus Height thought Tearscope*, Altura del menisco lagrimal mediante Tearscope
TMR: *Tear meniscus radius*, Radio del menisco lagrimal
TNF: *Tumor necrosis factor*, Factor de necrosis tumoral
UFL: Unidad funcional lagrimal
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana



ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	1
1.2 HIPÓTESIS.....	2
1.3 OBJETIVOS	3
1.3.1 Objetivo principal.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 LA LÁGRIMA.....	5
2.1.1 Estructura de la película lagrimal.....	5
2.1.2 Principales características y propiedades físico-químicas de la lágrima	7
2.1.3 Funciones de la película lagrimal.....	8
2.2 EL SÍNDROME DE OJO SECO	8
2.2.1 Definición.....	9
2.2.2 Patogénesis: inestabilidad lagrimal e hiperosmolaridad	9
2.2.3 Clasificación	10
2.2.4 Epidemiología	12
2.2.4.1 Datos epidemiológicos del ojo seco: prevalencia.....	12
2.2.4.2 Factores de riesgo en el SOS.....	12
2.2.4.3 Morbilidad del SOS: costo financiero e impacto sobre la calidad de vida.....	13
2.3 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DEL SÍNDROME DE OJO SECO.....	14
2.3.1 Cuestionarios de síntomas	15
2.3.1.1 Ocular Surface Disease Index (OSDI)	15
2.3.1.2 Cuestionario McMonnies	16
2.3.2 Test para evaluar la estabilidad de la película lagrimal	16
2.3.2.1 Tiempo de ruptura lagrimal (Tear Break-up time, TBUT).....	17
2.3.2.2 Interferometría.....	18
2.3.3 Test para evaluar el volumen lagrimal.....	19
2.3.3.1 Test de Rojo Fenol y test de Schirmer.....	19
2.3.3.2 Análisis del menisco lagrimal	19
2.3.4 Test para evaluar la osmolaridad lagrimal	20
2.3.5 Análisis de las Glándulas de Meibomio: Meibometría	23
2.3.6 Evaluación de las tinciones corneales y conjuntivales.....	23
3. POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN	25
3.1.1 Diseño del estudio	25
3.1.2 Grupo Muestral	26
3.2 MATERIAL: PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	27

3.2.1 Cuestionarios de síntomas	27
3.2.1.2 Ocular Surface Disease Index (OSDI)	27
3.2.1.2 Cuestionario McMonnies	27
3.2.2 Valoración de la estabilidad de la película lagrimal	27
3.2.2.1 Video-captura de la película lagrimal	28
3.2.2.2 Determinación del tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) y del intervalo máximo de parpadeo (MBI).....	29
3.2.2.3 Medida del área (Area of break, AB) y velocidad (Speed of break, SB) de ruptura de la película lagrimal	31
3.2.2.4 Medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color	32
3.2.2.4.1 <i>Procedimiento de medida realizada por clínicos</i>	33
3.2.2.4.2 <i>Bases del software y método de evaluación automática del TBUT</i>	34
3.2.3 Valoración del menisco lagrimal	37
3.2.3.1 Adquisición de video y selección de imágenes.....	37
3.2.3.2 Evaluación de la altura del menisco lagrimal	39
3.2.3.3 Evaluación del Grado Subjetiva del menisco lagrimal	40
3.2.4 Valoración de la osmolaridad lagrimal	41
3.2.4.1 Técnica basada en la medida del descenso del punto de congelación (Fiske 110)41	
3.2.4.1.1 <i>Análisis en soluciones estándar no diluidas y líquidos de mantenimiento de lentes de contacto</i>	42
3.2.4.1.2 <i>Análisis en soluciones estándar diluidas</i>	42
3.2.4.1.3 <i>Análisis de la osmolaridad lagrimal en pacientes</i>	43
3.2.4.2 Técnica basada en la medida de impedancia eléctrica (TearLab™).....	44
3.2.5 Meibometría (Meibometer 550)	44
3.2.6 Otros test	45
3.2.6.1 Test de Schirmer	45
3.2.6.2 Test de Rojo Fenol	46
3.2.6.3 Patrones lipídicos interferenciales	46
3.2.6.4 Tinciones corneales.....	47
3.2.7 Tratamiento estadístico	48
3.3 MÉTODO: PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	49
3.3.1 Estudios de la estabilidad de la película lagrimal	49
3.3.1.1 Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video.....	49
3.3.1.1.1 <i>Población y procedimiento</i>	49
3.3.1.1.2 <i>Tratamiento estadístico</i>	50
3.3.1.2 Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral	50
3.3.1.2.1 <i>Población y procedimiento</i>	51
3.3.1.2.2 <i>Tratamiento estadístico</i>	51
3.3.1.3 Análisis de la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el TBUT y la osmolaridad lagrimal.....	52
3.3.1.3.1 <i>Población y procedimiento</i>	52
3.3.1.3.2 <i>Tratamiento estadístico</i>	52
3.3.1.4 Estudio piloto para la validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color	53
3.3.1.4.1 <i>Muestra utilizada y validación de la técnica.</i>	53

3.3.1.4.2 Tratamiento estadístico	53
3.3.2 Estudio del menisco lagrimal: Validación de un software de código abierto para la medida de la altura del menisco	53
3.3.2.1 Población y procedimiento	54
3.3.2.2 Tratamiento estadístico.....	54
3.3.3 Estudio de la osmolaridad: precisión de un osmómetro basado en el descenso del punto de congelación (Fiske 110)	54
3.3.3.1 Procedimientos y muestras analizadas	55
3.3.3.1.1 Soluciones estándar.....	55
3.3.3.1.2 Soluciones de mantenimiento para lentes de contacto.....	55
3.3.3.1.3 Población y procedimiento.....	56
3.3.3.2 Tratamiento estadístico.....	56
4. RESULTADOS	57
4.1 ESTUDIOS DE LA ESTABILIDAD DE LA PELÍCULA LAGRIMAL	57
4.1.1 Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video	57
4.1.1.1 Variaciones diurnas en la ruptura de la película lagrimal	58
4.1.1.2 Correlación entre TBUT y MBI	58
4.1.1.3 Repetibilidad entre Clínicos	59
4.1.2 Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral	60
4.1.2.1. Correlación en una muestra no estratificada	60
4.1.2.2 Correlación en una muestra estratificada por síntomas según OSDI	63
4.1.3 Análisis de la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el TBUT y la osmolaridad lagrimal	64
4.1.3.1 Relación del TBUT con AB y SB	65
4.1.3.2 Relación de la osmolaridad con AB y SB	66
4.1.4 Estudio piloto para validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color	67
4.2 ESTUDIO DEL MENISCO LAGRIMAL: VALIDACIÓN DE UN SOFTWARE DE CÓDIGO ABIERTO PARA LA MEDIDA DE LA ALTURA DEL MENISCO	68
4.2.1 Análisis de la repetibilidad entre dos clínicos	68
4.2.2 Comparación de las medidas de TMH con la muestra estratificada según los criterios de apariencia subjetiva	69
4.2.2.1 Análisis de la repetibilidad entre dos Clínicos	70
4.2.2.2 Análisis de las diferencias de los valores de TMH entre los diferentes grupos subjetivos.....	70
4.3 ESTUDIO DE LA OSMOLARIDAD: PRECISIÓN DE UN OSMÓMETRO BASADO EN EL DESCENSO DEL PUNTO DE CONGELACIÓN (FISKE 110) ..	71
4.3.1 Resultados en soluciones estándar	71
4.3.1.1 Precisión en la medida de soluciones estándar no diluidas	73
4.3.1.2 Precisión en la medida de soluciones estándar diluidas	73
4.3.2 Resultados en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto	73
4.3.3 Concordancia en las medidas in vivo entre el osmómetro Fiske 110 y el osmómetro TearLab	73
5. DISCUSIÓN	75
5.1 ESTUDIOS DE LA ESTABILIDAD DE LA PELÍCULA LAGRIMAL	76

5.1.1 Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video.....	77
5.1.1.1 Variaciones diurnas en la ruptura de la película lagrimal.....	77
5.1.1.2 Correlación entre TBUT y MBI.....	78
5.1.1.3 Variabilidad entre dos Clínicos.....	78
5.1.2 Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral.....	79
5.1.3 Análisis de la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el TBUT y la osmolaridad lagrimal.....	80
5.1.4 Estudio piloto para validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color	83
5.2 ESTUDIO DEL MENISCO LAGRIMAL: VALIDACIÓN DE UN SOFTWARE DE CÓDIGO ABIERTO PARA LA MEDIDA DE LA ALTURA DEL MENISCO	84
5.3 ESTUDIO DE LA OSMOLARIDAD: PRECISIÓN DE UN OSMÓMETRO BASADO EN EL DESCENSO DEL PUNTO DE CONGELACIÓN (FISKE 110) .	87
5.3.1 Resultados en soluciones estándar.....	88
5.3.1.1 Precisión en la medida de soluciones estándar no diluidas.....	88
5.3.1.2 Precisión en la medida de soluciones estándar diluidas.....	88
5.3.2 Resultados en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto.....	89
5.3.3 Concordancia en las medidas in vivo entre el osmómetro Fiske 110 y el osmómetro TearLab	90
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	93
6.1 CONCLUSIONES	93
6.2 PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	97
ANEXOS.....	115
ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	117
ANEXO 2: CUESTIONARIO OSDI.....	119
ANEXO 3: CUESTIONARIO DE MCMONNIES	121
ANEXO 4: ABSTRACTS DE LAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	123

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Representación esquemática de las tres capas de la película lagrimal. La capa más externa se forma de lípidos hidrofóbicos, la capa acuosa comprende más del 90% de la película lagrimal, y la capa interna hidrofílica de mucina está integrada con el epitelio corneal[110, 111, 113].....	5
Figura 2.2. Diagrama sobre la dinámica de las capas lagrimales durante el parpadeo y el cierre	7
Figura 2.3. Mecanismos del SOS [6].....	10
Figura 2.4. Principales causas etiológicas del SOS[6]	11
Figura 2.5. Representación esquemática sobre los eventos locales en el tiempo de ruptura lagrimal.....	17
Figura 2.6. Ejemplo real de medida de TBUT y MBI. En cada uno de los fotogramas puede verse como la ruptura de la película lagrimal avanza durante el parpadeo mantenido	17
Figura 2.7. Patrones morfológicos de ruptura lagrimal y ejemplo de cada uno. De derecha a izquierda: <i>dot</i> (punto), <i>streak</i> (línea), y <i>pool</i> (piscina o charco) [76].....	18
Figura 2.8. Representación del menisco lagrimal	20
Figura 2.9. Ejemplo de distribución normal de las curvas de la osmolaridad lagrimal obtenida en sujetos normales y pacientes con “ <i>queratoconjuntivitis seca</i> ” en una revisión entre 1978 y 2004. Un valor referente o punto de corte para el SOS obtenidos de la intersección de estas curvas es en 315,6 mOsm/l[65]	21
Figura 2.10. Osmómetros utilizados en la medida de la película lagrimal. A) Clifton (Clifton Technical Physics, Hartford, NY) [66, 70, 86-88]; B) Advanced Model 3100 Tear Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA) [159]; C) Advanced Micro-osmometer 3320 (Advanced Instruments, Norwood, MA) [181, 182]; D) Wescor 5520 Vapor Pressure Osmometer (Wescor, Inc.) [183].....	21
Figura 2.11. Glándulas de Meibomio	23
Figura 2.12. Ejemplo de tinción corneal	24
Figura 3.1. FWCapture. A) Pantalla principal de grabación; B) Ejemplo de grabación.....	28
Figura 3.2. Programa Coriander utilizado para los ajustes de imagen. A) Ajustes de configuración para la iluminación; B) Ajustes de configuración de la región de interés.....	29
Figura 3.3. BUTAnalysis. A) Ventana principal; B) Principio de medida [Tecla de espacio]; C) Ruptura de la película lagrimal o TBUT [Tecla B]; D) Último fotograma previo al parpadeo o MBI [Tecla de espacio]; E) Ejemplo de un archivo de texto indicando los fotogramas de las tres marcas	30
Figura 3.4. Ejemplo de progresión temporal del área y velocidad de ruptura de la película lagrimal.....	31
Figura 3.5. Ejemplo de medida de áreas de ruptura con el ImageJ. A) Área total de córnea expuesta; B) áreas totales de ruptura lagrimal	32
Figura 3.6. Filezilla	33
Figura 3.7. Web Video Marker.....	33

Figura 3.8. Pasos para la medida automática del TBUT.....	34
Figura 3.9. Ajuste del ROI para descartar las secciones con información irrelevante [228]..	36
Figura 3.10. Curvas de evolución (línea punteada verde) y función del polinomio de segundo orden (línea solidada roja). El área negra se incrementa con el tiempo y el punto en el que la ruptura se produce es detectado cuando esta curva sobrepasa el umbral t_e [228].....	37
Figura 3.11. Tearscope™ Plus (Keeler, Windsor, UK). A) Tearscope; B) Dispositivo Tearscope acoplado a la lámpara de hendidura Topcon SL-D4	38
Figura 3.12. Límites del TMH-SL	39
Figura 3.13. Límites del TMH-Tc.....	39
Figura 3.14. Ejemplo de medida del TMH mediante ImageJ. A) TMH-SL; B) TMH-Tc	40
Figura 3.15. Clasificación subjetiva del menisco. A) Intacto o Grado 1; B) Ligeramente disminuido o Grado 2; C) Marcadamente disminuido o Grado 3; D) Ausente o Grado 4	41
Figura 3.16. Osmómetro Fiske 110 (Advanced Instruments Inc., Norwood, MA, USA)	41
Figura 3.17. Proceso de recolección, dilución y medida de diluciones con el osmómetro Fiske 110.....	42
Figura 3.18. Proceso de recolección, dilución y medida de diluciones con el osmómetro Fiske 110.....	43
Figura 3.19. Proceso de recolección, dilución y medida de la lágrima con el osmómetro Fiske 110.....	43
Figura 3.20. TearLab™ Osmometer. A) Dispositivo en reposo; B) Medida con el cabezal; C) Dispositivo tras la medida.....	44
Figura 3.21. Dispositivos para la Meibometría. A) Meibometer® MB550 (Courage-Khazaka electronic GmbH); B) Cinta mate sintética y reglas con marcas estandarizadas para crear el lazo	45
Figura 3.22. Test de Schirmer tipo 1. A) Sno-Strips; B) Colocación de la tira de Schirmer..	46
Figura 3.23. Test de Rojo Fenol. A) Tiras Zone-Quick; B) Colocación de la hilo de rojo fenol	46
Figura 3.24. Clasificación de Guillon para patrones lipídicos interferencias. A) Marmóreo Abierto; B) Marmóreo cerrado; C) Fluido; D) Amorfo; E) Coloreado	47
Figura 3.25. Esquema de clasificación Oxford para la gradación de tinciones corneales	48
Figura 4.1. Medidas de TBUT obtenidas en cada uno de las sesiones (9.30am, 12.30pm, 3.30pm y 6.30pm). Las barras de error indican el IC del 95% en cada sesión. $n = 26$. 3_TBUT = Media de los tres valores de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT = Media de los dos valores más cercanos de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia. A) Media de los tres valores de TBUT de cada sujeto en cada sesión; B) Media de los dos valores más cercanos de TBUT de cada sujeto en cada sesión	58
Figura 4.2. Media frente a la diferencia media (Bland y Altman) en medidas de TBUT en las grabaciones para cada par de Clínicos. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas solidadas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza del 95%. La línea punteada vertical se encuentra señalando los 15 segundos. $n = 312$. A) Clínico 1 vs. Clínico 2; B) Clínico 1 vs. Clínico 3; C) Clínico 2 vs. Clínico 3. DE = Desviación Estándar.....	59
Figura 4.3. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 3_TBUT en la población completa. $n = 145$. 3_TBUT = Media de los tres valores de TBUT en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 3_TBUT, B) Correlación entre Meibo_8 y 3_TBUT, C) Correlación entre Meibo_15 y 3_TBUT	61

Figura 4.4. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 2_TBUT en la poblacion completa. n = 145. 2_TBUT = Media de los dos valores más cercanos de TBUT en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 2_TBUT; B) Correlación entre Meibo_8 y 2_TBUT; C) Correlación entre Meibo_15 y 2_TBUT 61

Figura 4.5. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 3_MBI en la poblacion completa. n = 145. 3_MBI = Media de los tres valores de MBI en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 3_MBI; B) Correlación entre Meibo_8 y 3_MBI; C) Correlación entre Meibo_15 y 3_MBI 62

Figura 4.6. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 3_TBUT en la poblacion completa. n = 145. 2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de MBI en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 2_MBI; B) Correlación entre Meibo_8 y 2_MBI; C) Correlación entre Meibo_15 y 2_MBI..... 62

Figura 4.7. Media (\pm DE) de los valores de AB/SB obtenidos en cada rango de TBUT. Las barras de Error indican el Intervalo de Confianza del 95%. Los datos de AB se encuentran en porcentaje (%), mientras que los de SB en porcentajes de área por segundo (%área/s). TBUT = Tiempo de ruptura lagrimal; AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal; DE = Desviación Estándar 65

Figura 4.8. Media (\pm DE) de los valores de AB/SB obtenidos en cada rango de osmolaridad. Las barras de Error indican el Intervalo de Confianza del 95%. Los datos de AB se encuentran en porcentaje (%), mientras que los de SB en porcentajes de área por segundo (%área/s). AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal; DE = Desviación Estándar..... 66

Figura 4.9. Media frente a la diferencia media (Bland y Altman) en medidas de TBUT para cada par. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas solidas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza de 95%. La línea punteada vertical se encuentra señalando los 15 segundos. n = 264. A) Clínico 1 vs. Clínico 2; B) Clínico 1 vs. Clínico 3; C) Clínico 2 vs. Clínico 3. DE = Desviación Estándar 67

Figura 4.10. Media frente a la diferencia (Bland y Altman) entre los valores obtenidos en pacientes por cada Clínico. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas solidas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza del 95%. n = 176. TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope. A) Medidas de TMH-SL del Clínico 1 frente al Clínico 2; A) Medidas de TMH-Tc del Clínico 1 frente al Clínico 2 69

Figura 4.11. Valores de TMH (Media \pm DE) de los dos Clínicos en cada uno de los grados subjetivos generados por el Clínico de Referencia. Las barras de error indican los Intervalos de Confianza del 95% para cada parámetro. TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope. A) TMH-SL; B) TMH-Tc 70

Figura 4.12. Diagrama mostrando las medidas realizadas en soluciones estándar con el Fiske 110. Las líneas verticales continuas representa el Intervalo de Confianza del 95% en cada dilución. Las líneas horizontales continuas indican el valor real de osmolaridad/osmolalidad de la solución. Las líneas horizontales discontinuas indican el rango de tolerancia facilitado por la compañía fabricante de cada solución. El eje horizontal indica el tiempo de solución empleada (no diluida, 1:1, 1:4 y 1:9). n = 20 medidas. A) Advanced® Calibration Standard 50mOsm/kg; B) Clinitrol™ 290 Reference Solution; C) 297 Normal Osmolarity Control Solution; D) 338 High Osmolarity Control Solution; E) Advanced ® Calibration Standard 850mOsm/kg 72

Figura 4.13. Media frente a la diferencia media (Bland y Altman) de los valores obtenidos entre ambos osmómetros en sujetos. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas solidas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza del 95%. n = 60. A) TearLab vs. Fiske 110 (4 μ l); B) TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l)74



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Resumen de los principales componente y funciones de cada una de las capas lagrimales [116].....	6
Tabla 2.2. Esquema de factores de riesgo del ojo seco[6].....	13
Tabla 2.3. Panel de Delphi modificado por el <i>DEWS</i> para la clasificación del grado de SOS. Este panel fue propuesto para dividir la enfermedad en cuatro niveles o grados en base a síntomas y signos comúnmente usados con el objetivo de tomar decisiones diagnósticas para el posterior tratamiento [6, 41]	15
Tabla 2.4. Principales cuestionarios en el síndrome de SOS [1].....	15
Tabla 3.1. Clasificación subjetiva del menisco lagrimal propuesta por Khurana et al. [179], y modificada por Garcia-Resua et al. [57]. Grados 1 y 2 representan meniscos sanos, mientras que los grados 3 y 4 representan meniscos anormales	40
Tabla 3.2. Diluciones usadas en el osmómetro Fiske 110.....	42
Tabla 3.3. Características de los diferentes capilares utilizados (Microcap, Drummond Scientific Company).....	43
Tabla 3.4. Variables proporcionadas por el fabricante de las muestras de mantenimiento.....	55
Tabla 3.5. Componentes principales de las soluciones usadas. MAPD: dimetilamina miristamidopropil; HPMC: hidroxipropil de metilcelulosa [181, 273].....	56
Tabla 4.1. Estadísticos descriptivos obtenidos en el TBUT y MBI en cada uno de los metodos de promedio y sesiones del dia. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; DE = Desviación Estándar; IQR = Rango Intercuartil.....	57
Tabla 4.2. Diferencias medias (Wilcoxon test) por pares de sesiones para el TBUT. n = 26. 3_TBUT = Media de los tres valores de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT = Media de los dos valores más cercanos de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; DE = Desviacion estándar	58
Tabla 4.3. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de TBUT y MBI. n = 26. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; DE = Desviacion estándar	58
Tabla 4.4. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares de Clinicos para la muestra. n = 312. DE = Desviacion estándar; IC 95% = Intervarlo de Confianza del 95%	59
Tabla 4.5. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares de Clinicos considerando unicamente los valores de TBUT bajo 15 segundos. n = 272. DE = Desviacion estándar; IC 95% = Intervarlo de Confianza del 95%	60
Tabla 4.6. Estadísticos descriptivos para los resultados de OSDI, Meibometro, TBUT y MBI. n = 145. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en	

grabaciones; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones; DE = Desviación estándar; IQR = Rango Intercuartil.....	60
Tabla 4.7. Estadísticos descriptivos en la muestra agrupada por síntomas. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones. DE = Desviación estándar; IQR = Rango Intercuartil.....	63
Tabla 4.8. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y TBUT/MBI en en la muestra agrupada por síntomas. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones	64
Tabla 4.9. Estadísticos descriptivos del TBUT, AB, SB y osmolaridad. n = 110. TBUT = Tiempo de ruptura lagrimal; AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal; DE = Desviación Estándar; IQR = Rango Intercuartil	64
Tabla 4.10. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de TBUT y AB/SB. n = 110. TBUT = Tiempo de ruptura lagrimal; AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal	65
Tabla 4.11. Correlación (Pearson test) entre los valores de osmolaridad y AB/SB. n = 110. AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal	66
Tabla 4.12. Estadísticos descriptivos obtenidos en el TBUT por cada Clínico/Software. DE = Desviación Estándar; IQR = Rango Intercuartil	67
Tabla 4.13. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares para la muestra de estudio completa. n = 264.....	68
Tabla 4.14. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares de Clínicos considerando unicamente los valores de TBUT bajo 15 segundos. n = 253. DE = Desviación estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%	68
Tabla 4.15. Estadísticos descriptivos de las medidas de TMH para cada Clínico en ambas técnicas. n = 176. TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope. DE = Desviación Estándar... ..	68
Tabla 4.16. Diferencias medias (t-test para muestras relacionadas) obtenidas para las diferencias entre las medidas realizadas por cada Clínico en cada técnica. n = 176. TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope; DE = Desviación Estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%	69
Tabla 4.17. Estadísticos descriptivos y diferencia (t-test de una muestra) para las medidas del Fiske 110 en soluciones estándar no diluidas y diluidas. n = 20 medidas. DE = Desviación Estándar.....	71
Tabla 4.18. Estadísticos descriptivos para las medidas del Fiske 110 en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto y resultados obtenidos en estudios previos. n = 10 medidas. DE = Desviación Estándar.....	73
Tabla 4.19. Estadísticos descriptivos para las medidas en pacientes de los protocolos TearLab vs. Fiske 110 (4µl) y TearLab vs. Fiske 110 (2µl). n = 60. DE = Desviación Estándar.....	74
Tabla 4.20. Diferencias medias (t-test para muestras relacionadas) de osmolaridad obtenidas entre las medidas usando TearLab vs. Fiske 110 (4µl) y TearLab vs. Fiske 110 (2µl). n = 60. DE = Desviación Estándar;	74

1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

1.1 JUSTIFICACIÓN

Mantener la estructura y función de la película lagrimal, es esencial para que pueda existir una correcta visión y confort ocular. El Síndrome de Ojo Seco (SOS) es una enfermedad de la superficie ocular (SO) cuya prevalencia ha aumentado considerablemente en los últimos años hasta afectar a un 10-35% de la población, influyendo en la calidad visual y por tanto en la calidad de vida de las personas[1-5]. El SOS es una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la unidad funcional lagrimal (UFL), con síntomas de disconfort ocular, alteraciones visuales, inestabilidad de la película lagrimal, hiperosmolaridad de la lágrima y daño de la SO [1, 6-9]. No existe un acuerdo respecto a la definición, clasificación y al diagnóstico del SOS. Para intentar llegar a un consenso se emitió el informe del "International Dry Eye Workshop" (DEWS) de 2007[1, 6, 10-13], y la Sociedad "Tear Film Ocular Surface" creó el taller internacional sobre las Disfunciones de las Glándulas de Meibomio (DGM) que concluyó en 2010[14-22].¹ Entre sus conclusiones sobre el SOS se valora que los tests clínicos de diagnóstico presentan una variabilidad importante, debido principalmente a la subjetividad de las pruebas diagnósticas; todos estos hechos son responsables también de la amplia variabilidad de los estudios epidemiológicos.

Para el diagnóstico de SOS se puede realizar análisis de síntomas a través de cuestionarios estandarizados (Cuestionario de McMonnies, OSDI, etc.) [1, 23-31], pruebas lagrimales cualitativas (Tiempo de ruptura lagrimal, etc.) [32-44], cuantitativas (Test de Schirmer, Test de rojo fenol, Test de aclaramiento lagrimal, Evaluación de los parámetros del menisco lagrimal, etc.) [1, 8, 45-63] y bioquímicas (osmolaridad lagrimal, ELISA, HPLC, etc.)[24, 64-70].

Una de las pruebas empleadas habitualmente y que se considera la principal prueba para el diagnóstico de SOS es la valoración de la estabilidad lagrimal a través del test de TBUT (*Tear Break-Up Time*), que consiste en medir el tiempo transcurrido desde el último parpadeo hasta la ruptura de la película lagrimal [1, 6-8, 13, 35, 39, 71, 72]. En el transcurso de este tiempo se produce un adelgazamiento de la película lagrimal, que se identifica con la aparición de áreas cada vez más oscuras, llegando a la ruptura real de la película lagrimal, momento en el que aparecen áreas de color negro. Además del tiempo, hay varias características de la ruptura como la zona, la forma, el tamaño y la evolución, que podrían

¹Ambos informes, organizadas por *Tear Film and Ocular Surface Society* (TFOS), recogen el trabajo de un gran número de expertos seleccionados en base a su historial clínico y científico a través de un largo periodo de tiempo. El objetivo de ambos informes fue revisar y actualizar el conocimiento actual sobre estas enfermedades, siguiendo el trabajo comenzado por el National Eye Institute/Industry Workshop en 1995 (*Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on Clinical Trials in Dry Eye. CLAO J 1995; 21:221-32*).

afectar a la severidad del SOS [73-76]. Esta prueba, generalmente realizada en la práctica clínica de manera manual, presenta una baja repetibilidad debido principalmente a la apreciación subjetiva de las zonas oscuras, las diferencias entre expertos y la variabilidad de la película. La automatización del análisis de la ruptura reduciría su carácter subjetivo, permitiendo una evaluación más precisa de la película lagrimal.

Los tests de referencia para cuantificar el volumen lagrimal, tienen el inconveniente de ser invasivos. Una alternativa de test no invasivo para cuantificar el volumen lagrimal es determinar la altura del menisco lagrimal (TMH, *Tear meniscus height*) [53-58]; este test ofrece una medida clínica útil en la evaluación de la película lagrimal al estar estrechamente relacionado con su volumen, y especialmente por su carácter no invasivo [77-81]. Sin embargo, realizado generalmente de manera manual en la práctica clínica, presenta una baja repetibilidad [55, 57, 82-84]. En este trabajo se pretende validar la aplicación de un protocolo de medida mediante asistencia por software de carácter semiautomático, con un software de código abierto para la medida de TMH.

Por último, la hiperosmolaridad lagrimal ha sido reconocida como una característica común de todos los tipos de SOS, y se ha referido como el “Gold Standard” diagnóstico de ojo seco [1, 6, 10-13, 65, 66, 69, 78, 85]. El osmómetro Clifton, basado en el descenso del punto de congelación, ha sido considerado el de referencia diagnóstica [66, 70, 86-88]. En este trabajo se pretende analizar la eficacia de un osmómetro basado en el mismo principio de medida que el osmómetro Clifton, para su aplicación clínica en el estudio de la lágrima.

Las herramientas y protocolos de apoyo al diagnóstico del SOS desarrollados en esta tesis, están orientadas a la práctica clínica. Se trata así de objetivizar los tests de diagnósticos desarrollando técnicas de procesado de imagen y vídeo con la finalidad de la incorporación en la práctica diaria de test fiables, objetivos, sencillos y rápidos. Estas herramientas y protocolos permitirán, no sólo valorar de forma repetible el estado de la película lagrimal del paciente, sino también establecer correlación entre los valores obtenidos con las distintas pruebas diagnósticas y caracterizar de una forma completa la calidad de la película lagrimal. Todas las técnicas automáticas de procesado de imagen y vídeo se desarrollarán y serán validados en colaboración con los expertos clínicos. La tesis, además de profundizar en las pruebas clínicas más usadas en el diagnóstico, las correlaciona con la prueba de laboratorio de osmolaridad lagrimal, considerada el “Gold Standard” potencial en diagnóstico del SOS [1, 6, 10-13, 65, 66, 69, 78, 85].

1.2 HIPÓTESIS

El SOS presenta una gran prevalencia en la población mundial, principalmente en usuarios de lentes de contacto [1-5]. Una baja estabilidad y cantidad de la película lágrima son causa de SOS [89-95]. Siendo la medida de la osmolaridad lagrimal el “Gold Standard” para el diagnóstico del SOS.

Los tests de evaluación de la cantidad y calidad de la lágrima permiten conocer el comportamiento de la película lagrimal a lo largo del tiempo y evaluar su estabilidad [96-100]. La evaluación manual de dichos tests requiere tiempo y experiencia, y presenta el inconveniente de ser subjetiva. Y por tanto, no existiendo herramientas objetivas de apoyo al diagnóstico en este campo, la hipótesis de este trabajo de investigación es que es posible y

necesario el desarrollo de herramientas para evaluar de forma objetiva y automática la estabilidad y cantidad de la película lagrimal, así como el desarrollo de protocolos más exactos y fiables, con la finalidad última de mejorar el diagnóstico del SOS[36-38, 95, 101-107].

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo principal

A la vista de la heterogeneidad de las pruebas para el diagnóstico del SOS, de la subjetividad de las evaluaciones de los test de lágrima y la falta de repetibilidad de dichos tests, el objetivo principal de este trabajo de investigación es objetivizar las pruebas o tests clínicos, desarrollando nuevos protocolos de medida, y técnicas semiautomáticas y automáticas de procesado de imagen y video.

1.3.2 Objetivos específicos

Así mismo, y en aras de cumplir el objetivo principal, los objetivos específicos de cada uno de los diferentes estudios de la tesis son los siguientes:

- ~ Identificar el patrón de variación diurna de la estabilidad de la película lagrimal en sujetos sanos.
- ~ Determinar la relación entre la estabilidad de la película lagrimal y el tiempo de apertura palpebral.
- ~ Cuantificar la variabilidad entre clínicos en las evaluaciones de la estabilidad de la película lagrimal.
- ~ Analizar la relación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral.
- ~ Analizar la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el tiempo de ruptura y la osmolaridad lagrimal.
- ~ Validar la utilización de un software para la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color
- ~ Verificar la utilidad de un protocolo de medida mediante asistencia por software código abierto de carácter semiautomático para la medida de la altura del menisco lagrimal.
- ~ Evaluar la capacidad de medida del osmómetro Fiske 110 en soluciones diluidas y no diluidas.
- ~ Determinar la utilidad de un protocolo de recogida y medida de muestra lagrimal para la aplicación del osmómetro Fiske 110 en un entorno clínico.



2. INTRODUCCIÓN

La superficie ocular (SO), los párpados, las glándulas (lagrimal principal y accesorias) y los nervios sensoriales y motores que inervan dichas estructuras y los circuitos reflejos neuronales interconectados, conforman una unidad integrada cuyas partes actúan conjuntamente; a este sistema se le llama Unidad Funcional Lagrimal (UFL) [1, 108, 109]. Cualquier alteración o enfermedad en los componentes de la UFL puede desestabilizar la película lagrimal y producir enfermedad de la SO. La función de la UFL es preservar la integridad de la película lagrimal, la transparencia de la córnea y la calidad de la imagen retiniana [1, 108, 109].

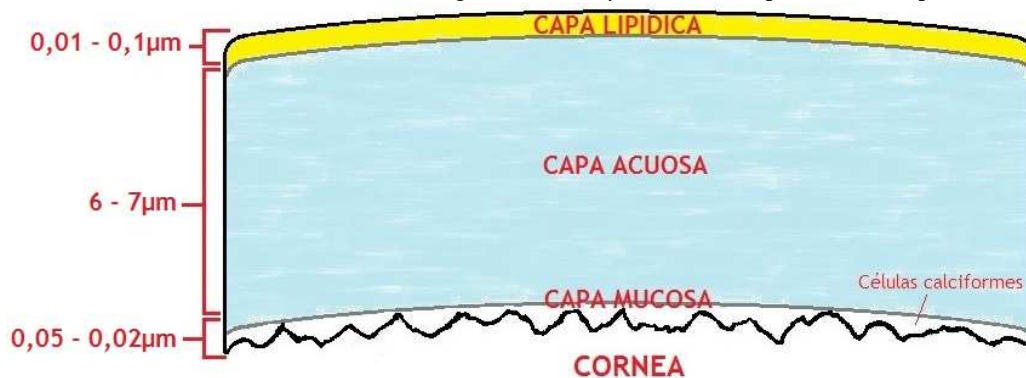
2.1 LA LÁGRIMA

La lágrima es una secreción fundamentalmente acuosa que cubre la SO, formando una película entre el medio ambiente exterior y la superficie cornealconjuntival. Es la parte más externa de la UFL, y el mantenimiento de su estructura, propiedades y funciones es esencial para que pueda existir una correcta visión y confort ocular.

2.1.1 Estructura de la película lagrimal

El fluido lagrimal forma una película pre-ocular compuesta de tres capas descrita inicialmente por Wolff en 1946 (Figura 2.1)[110, 111]: la capa superficial o lipídica, de unas $0,1\mu\text{m}$ de grosor; la capa intermedia o acuosa, de unas $7\mu\text{m}$ de espesor; y la capa profunda o mucosa, de $0,02$ a $0,05\mu\text{m}$ grosor. De manera reciente, se han formulado hipótesis que hablan de una mayor complejidad en la estructura lagrimal, destacándose modelos como el de Tiffany [112] que describe un total de seis capas con sus respectivas interfases. Aunque la estructura de Wolff es algo simplista, se considera el modelo más útil desde el punto de vista clínico [110, 111, 113].

Figura 2.1. Representación esquemática de las tres capas de la película lagrimal. La capa más externa se forma de lípidos hidrofóbicos, la capa acuosa comprende más del 90% de la película lagrimal, y la capa interna hidrofílica de mucina está integrada con el epitelio corneal[110, 111, 113]



1) *Capa Superficial o Lipídica*: La capa lipídica, con un espesor de 0,01 - 0,1µm, es secretada principalmente por las Glándulas de Meibomio y las glándulas de Zeiss y Moll. Es la capa más superficial, y es la responsable de evitar una rápida evaporación de la película lagrimal. La capa anterior (no polar) está compuesta fundamentalmente por triglicéridos, ésteres de colesterol y de cera, y la capa interna (altamente polar) compuesta por colesterol libre, ácidos grasos libres y fosfolípidos; un incremento en los lípidos apolares y una disminución en los polares disminuye la estabilidad de la película lagrimal [110, 111, 114] (Tabla 2.1).

2) *Capa Intermedia o Acuosa*: La capa acuosa es la capa de mayor grosor con un espesor de 6 - 7µm. Forma más del 90% del volumen total de la película lagrimal, es secretada por la glándula lagrimal principal y las accesorias (Krause y Wolfring), proporciona a la córnea oxígeno y nutrientes, y está compuesta por agua, gases (oxígeno y CO₂), electrolitos (sodio, potasio, magnesio, calcio, cloruros y bicarbonatos), sustancias orgánicas de bajo peso molecular (glucosa, urea, etc.), histamina, enzimas, proteínas séricas (IgA sérica, IgE, IgM) y de secreción (IgA de secreción, albumina, lisozima, lactoferrina, etc.) [110, 111, 115] (Tabla 2.1).

3) *Capa Profunda o Mucosa*: Es la capa en contacto con el epitelio corneal, con un espesor 0,05 - 0,02µm, que marca el límite de la película lagrimal propiamente dicha y las células corneales. Esta capa se compone principalmente de glucoproteínas, compuestas por Glúcidos (glucosa, galactosa, fructosa, manosa, glucosamina, galactosaminasa, etc.), y aminoácidos (glutamina, serina y treonina) [110, 111]. La función principal de esta capa es conseguir que la superficie de epitelio (hidrófoba) sea humectada por la lágrima. Las glucoproteínas son las responsables del descenso de la tensión superficial, al reducir la tensión superficial del agua de 70 dinas/cm a 40 dinas/cm, lo que permite que la película lagrimal se extienda sobre una superficie hidrófoba (epitelio corneal) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Resumen de los principales componente y funciones de cada una de las capas lagrimales [116]

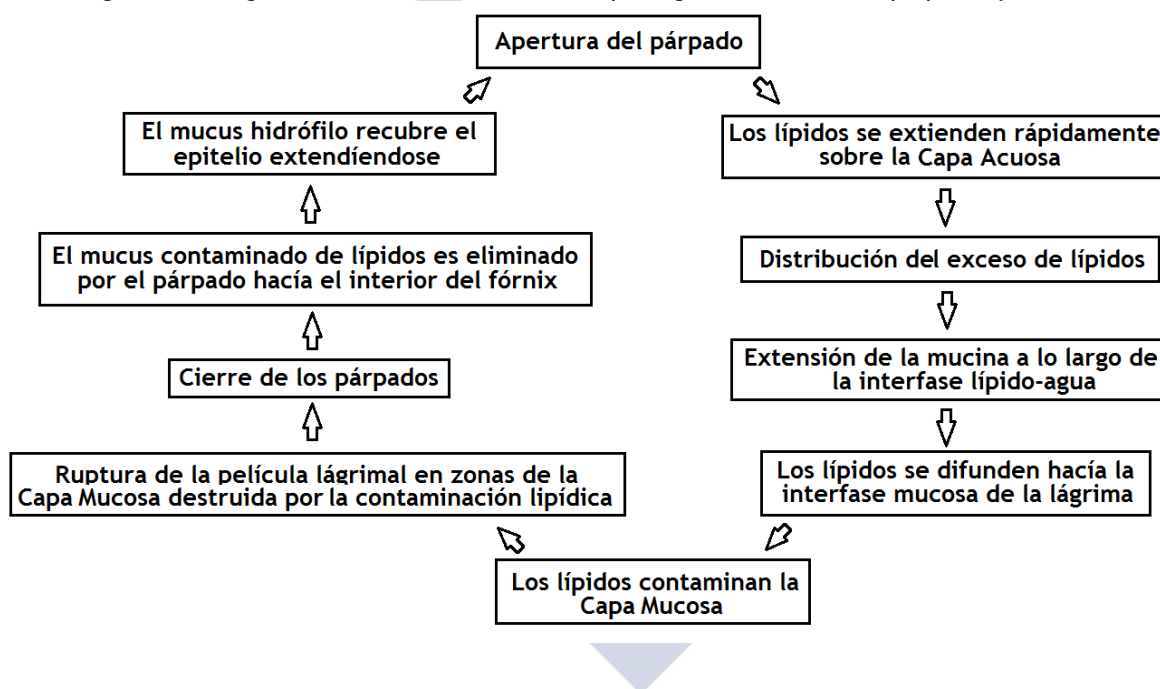
Estructura	Origen	Componentes principales	Funciones
Capa lipídica	Glándulas de Meibomio	Ésteres de colesterol Ésteres de ceras	Evita la evaporación Proporciona una superficie ópticamente suave
Capa acuosa	Glándulas lagrimales	Agua Proteínas Sales	Bacteriostática Limpieza del debris Mantenimiento de la hidratación epitelial
Capa mucosa	Células conjuntivales de Globet Glándulas de Moll y Krause	Glicoproteína	Convierte en hidrófila la superficie epitelial para que la capa acusa la humecte

Debemos tener en cuenta que la dinámica del fluido lagrimal se caracterizará por presentar diferentes interfases: líquida-sólida entre la película lagrimal y las células epiteliales de la córnea; líquido-líquido entre las capas lipídica y acuosa; y gas-líquido entre la capa lipídica y el aire. Para que toda esta estructura sea constante, el parpadeo debe de tener una frecuencia de aproximadamente 12-15 parpadeos/minuto (un parpadeo cada 4-5 segundos). Esto provoca que la película lagrimal esté en continuo movimiento de cambio y obligada a reorganizarse sobre la SO tras cada parpadeo en un pocos milisegundos para realizar adecuadamente sus funciones fisiológicas y de protección [113].

Cuando el ojo se cierra durante un parpadeo, la capa lipídica se comprime entre los márgenes de los párpados. La mucina, contaminada de lípido cuando la película lagrimal se rompe, se mueve hacia el fórnix superior e inferior, desde donde es excretada a través del conducto lagrimal. Cuando el ojo se abre, una capa acuosa nueva se extiende a través de la superficie epitelial, ahora hidrofílica. A medida que se forma, el lípido, que había sido exprimido en una capa gruesa durante el cierre de los párpados, se extiende produciendo una nueva monocapa sobre la fase acuosa para reducir la evaporación lagrimal[116, 117] (Figura 2.2).

La nueva capa de lágrima es una estructura relativamente inestable. A pesar de la presencia de la capa lipídica, aún hay algo de evaporación lagrimal que reduce el espesor de la película lagrimal. Cuando esto ocurre, los lípidos comienzan a difundirse hacia el mucus. El mucus ahora contaminado de lípido, comienza a perder su hidrofilia, y la película lagrimal empieza romperse, formando áreas aisladas de ruptura lagrimal. Este es el estímulo para parpadear y para que el ciclo se repita[116, 117] (Figura 2.2).

Figura 2.2. Diagrama sobre la dinámica de las capas lagrimales durante el parpadeo y el cierre



2.1.2 Principales características y propiedades físico-químicas de la lágrima

La película lagrimal, de un volumen promedio de $7,0 \pm 2 \mu\text{l}$, con un caudal de aproximadamente $1,2 \mu\text{l}/\text{min}$ [118, 119], que forma una película entre el medio ambiente exterior que rodea al ojo y la superficie corneo-conjuntival, de cuya protección se encarga. La lágrima se encuentra formada aproximadamente por un 98% de agua, siendo su peso específico de entre $1,004$ y $1,005 \text{ g}/\text{cm}^3$ y su viscosidad de $0,3 \text{ dinas}\cdot\text{seg}/\text{cm}^2$ [120, 121]. La evaporación de este líquido en un sujeto normal será de aproximadamente $4,1 \cdot 10^{-7} \text{ g}/\text{cm}^2/\text{s}$, con una tensión superficial de $40 \pm 1,5 \text{ dinas}/\text{cm}$ [120, 121]. El índice de refracción es bastante cercano al de la córnea, oscilando entre $1,336$ y $1,337$ [120, 121].

Su pH es neutro o ligeramente alcalino entre $7,3$ y $7,4$, pudiendo llegar a surgir variaciones importantes: el registro continuo de las variaciones de pH a nivel de la conjuntiva demuestra que en el momento de la abertura de los párpados, después del sueño nocturno, el

pH es del orden de 6,5 y cuando el ojo se queda abierto se estabiliza al cabo de unos 50s[122]. Entre la abertura y el cierre de los párpados en un sujeto con ritmo de parpadeo normal, puede considerarse que las variaciones de pH son del orden de una unidad, variando entre aproximadamente 6,5 y 7,5 [120, 122].

La temperatura normal de la lágrima varía entre 30 y 35°C con los ojos abiertos, disminuyendo 1°C en ausencia de parpadeo, y aumentando 0,5°C con los párpados cerrados. Los estudios termográficos más precisos muestran que existen diferentes zonas de la superficie ocular con distinta temperatura, siendo la zona corneal la más fría.

2.1.3 Funciones de la película lagrimal

Debido a su posición en el sistema ocular y su composición específica, la película lagrimal será la encargada de cumplir las siguientes funciones [110, 123]:

Función óptica: es la encargada de crear una superficie perfectamente lisa sobre la córnea (que no lo es), dándole así mayor regularidad y poder dióptrico al mantener la interfase entre el aire y la córnea.

Función metabólica: la córnea es avascular debido a la necesidad de tener la mayor transparencia posible, por lo que la mayoría de las sustancias necesarias para su metabolismo le llegan a través de la lágrima.

Función defensiva o protectora: al ser la primera superficie preocular, tiene un papel en la protección del UFL mediante dos mecanismos:

a) *Mecanismos de defensa pasivos:* la lágrima genera una protección mecánica contra cambios de temperatura, viento, agentes químicos, polvo y diferentes cuerpos extraños que puedan agredir a córnea y conjuntiva. Este mecanismo se basa en la barrera anatómica, el movimiento de parpadeo, la viscosidad y la mucina

b) *Mecanismos de defensa activos:* la lágrima protege al UFL de infecciones y agentes similares mediante un sistema muy complejo, que incluye proteínas de actividad antibacteriana no específica, anticuerpos, sistema inmunocompetente, inmunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, etc.

Función lubricante: gracias a sus cualidades acuoserosas, favorece el desplazamiento de los párpados sobre la superficie corneal. Es, por tanto, también la encargada de mantener la humectación y proteger a las células epiteliales de la desecación.

Función limpiadora: debido a la acción de los párpados, la lágrima ayuda a eliminar sustancias de desecho del metabolismo corneal, detritus, células escamosas, cuerpos extraños etc.

2.2 EL SÍNDROME DE OJO SECO

Si bien existen diversos trastornos lagrimales, en el presente trabajo nos centraremos en el análisis del SOS, con los signos y síntomas que lo acompañan[124].

2.2.1 Definición

El SOS es una enfermedad multifactorial de la lágrima y la SO que causa síntomas de malestar, distorsiones visuales e inestabilidad de la película lagrimal, con daño potencial en la superficie ocular. Se caracteriza por ir acompañada de variaciones en la composición de la película lagrimal con un aumento de la hiperosmolaridad, la cual causa inflamación de la SO[1, 6-8]. Se trata de una alteración de la UFL (integrado por las glándulas lagrimales, superficie ocular y los nervios sensoriales y motores que los interconectan). La función principal de dicha unidad es preservar la integridad de la película lágrima, la transparencia de la córnea y la calidad visual.

2.2.2 Patogénesis: inestabilidad lagrimal e hiperosmolaridad

La SO requiere una película lagrimal estable para mantener su estructura y su función[78]. Una producción, distribución y eliminación adecuadas y en equilibrio son necesarias para mantener la estructura y la función de la película lagrimal. Cualquier desequilibrio de estos procesos puede llevar al SOS[125]. Los mecanismos centrales de esta patología están gobernados por la inestabilidad y la hiperosmolaridad de la película lagrimal [6] (Figura 2.3).

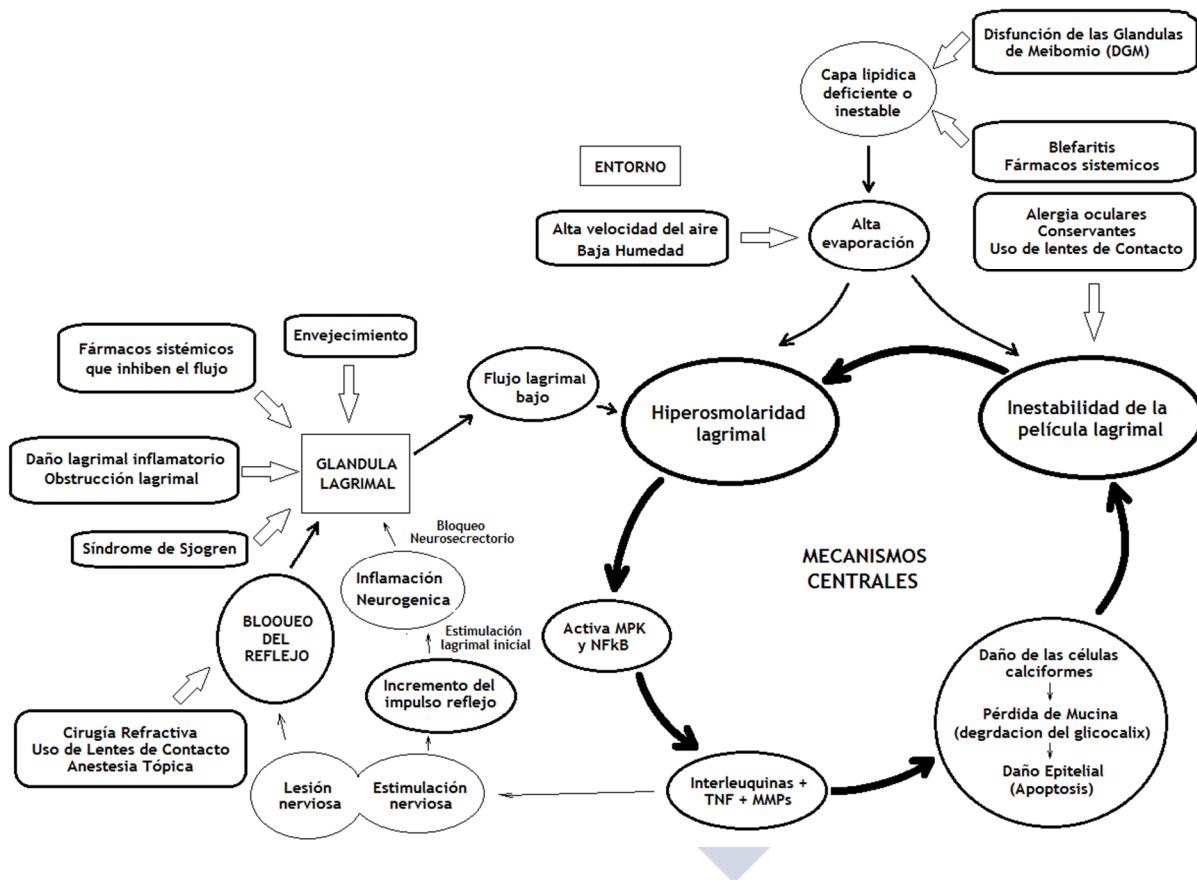
La inestabilidad de la película lagrimal es el principal agente desencadenante de los problemas de sequedad (Figura 2.3). Ésta genera tasas de evaporación más altas, que a su vez generan un impacto considerable en la dinámica de la película lagrimal, especialmente en el volumen y concentración [78, 93-95, 126, 127]. Este aumento de evaporación crea un descenso de volumen lagrimal, provocando, un aumento de la concentración de proteínas y electrolitos, y con ello un aumento de la osmolaridad lagrimal [78, 93-95, 126, 127]. La osmolaridad que mide la concentración de partículas en una solución independientemente de su tamaño y carga, será menor en situaciones de hiperhidratación y mayor en aquellas de deshidratación. La homeostasis normal requiere mantener regulados, por tanto, el flujo lagrimal [128].

La hiperosmolaridad se produce a causa de la secreción deficiente de lágrima, de su excesiva evaporación o de ambas. Esta hiperosmolaridad estimula una cascada de eventos inflamatorios en las células epiteliales de la córnea y la conjuntiva. La activación de las proteínas quinasas (MAP quinasas) y los factores de transcripción nuclear, hace que aumente la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8 y las metaloproteinasas (MMP-1, 3, 9 y 13)[89-92] (Figura 2.3). Se produce una posterior respuesta inflamatoria que culmina en la apoptosis de las células conjuntivales, corneales y epitelios de la glándula lagrimal, queratinización y daño neuronal[8, 89, 91]. La inflamación puede, a su vez, causar la disfunción o la desaparición de las células responsables de la secreción lagrimal. Como consecuencia de todo ello se reduce el glicocálix y la capa de mucina, y aumenta la inestabilidad de la película lagrimal y la evaporación, lo que a su vez potencia la reacción inflamatoria y genera síntomas oculares y signos en la SO.

La hiperosmolaridad de la película lagrimal ha sido considerada como el mecanismo central en la inflamación de la SO, generando daños y síntomas característicos [6, 37, 68]. La inflamación también puede ser iniciada por una irritación crónica (por ejemplo, portadores de lentes de contacto), o por enfermedades sistémicas, como las conectivopatías autoinmunes (por ejemplo, la artritis reumatoide). Independientemente de la etiología, puede desarrollarse un círculo vicioso de inflamación en la superficie ocular que conduce a la enfermedad de la superficie ocular. Esta inflamación crónica es responsable de los síntomas de irritación,

degradación de la superficie epitelial ocular y alteración de la función de barrera del epitelio corneal. Existen varias terapias anti-inflamatorias para el ojo seco que se dirigen a uno o más de los mediadores de la inflamación[89, 90, 92]. En 1941, von Bahr[129] postula una asociación entre la osmolaridad de la película lagrimal, su producción y su evaporación. Balik[130], en 1952, fue el primero en proponer que la hiperosmolaridad de la película lagrimal es un factor patogénico en el SOS. La reciente definición de esta enfermedad, publicada por el DEWS de 2007, es compatible con esta hipótesis: se estableció la hiperosmolaridad como uno de los principales mecanismos patogénicos del SOS [1, 6, 10-13, 65, 66, 69, 78, 85].

Figura 2.3. Mecanismos del SOS [6]



2.2.3 Clasificación

El SOS es uno de los problemas más comunes de los pacientes que buscan atención primaria ocular, y se caracteriza por síntomas de irritación ocular, visión borrosa, visión fluctuante, inestabilidad de la película lagrimal, aumento de la osmolaridad de la lágrima, etc. [1, 6-8, 13]. A menudo su identificación y diagnóstico suponen un reto clínico debido a su compleja clasificación etiológica. La clasificación del SOS ha variado y se ha adecuado a los conocimientos de cada época[6, 131, 132]. Esta enfermedad produce un impacto en la calidad de vida al producir síntomas de sensación de sequedad ocular y signos de sequedad de la SO. Si el estadio es de gravedad puede producir signos corneales, tales como hipoestesia, ulceraciones y leucomas corneales que pueden provocar una pérdida de visión permanente, es decir, mermar la capacidad de realizar actividades diarias como leer, usar el ordenador o conducir.

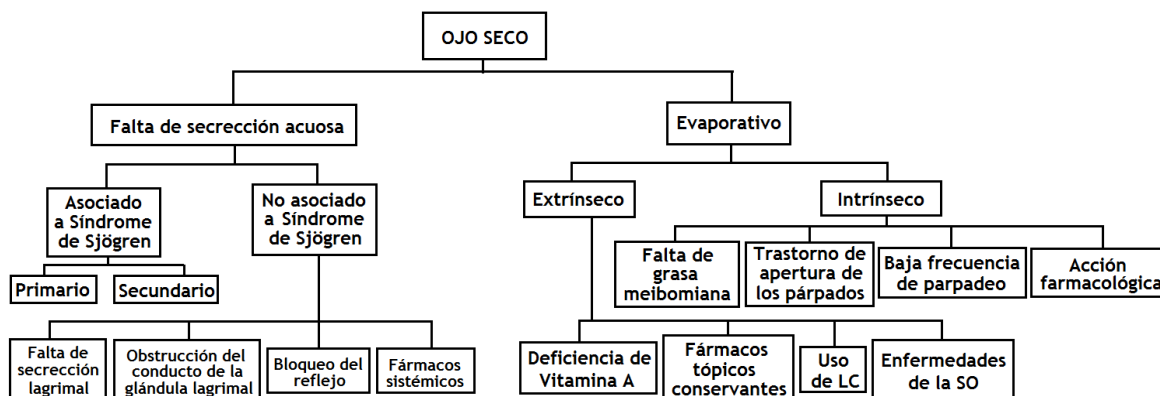
Hasta la fecha, una de las clasificaciones más extendida fue la triple clasificación propuesta por Marube et al. [131, 132], que describe tres parámetros o ejes: determinar la etiología y patogenia que producen el ojo seco, el tipo y grado de afectación de las diversas glándulas y tejidos implicados y, como tercer parámetro, la gravedad de la afectación ocular. El objeto final de esta clasificación es que sea de utilidad para que en la clínica diaria se pueda establecer sobre ella diagnóstico, pronóstico y tratamiento de cada caso de ojo seco.

1. *Clasificación según su etiología*: Se divide en 1) Etario o relacionado con la edad; 2) hormonal; 3) Farmacológico; 4) Inmunopático, 5) Hiponutricional; 6) Disgenético; 7) Infeccioso, alérgico o inflamatorio; 8) Traumático; 9) Neurológico; y finalmente, 10) Tantálico.
2. *Clasificación según las glándulas y tejidos afectados* (clasificación «ALMEN»): se divide en 1) Deficiencia acuosa; 2) Deficiencia lipídica; y 3) Deficiencia mucínica
3. *Clasificación según la gravedad*: contempla los grados 1) subclínico; 2) leve; 3) medio; 4) grave; e 5) incapacitante.

La clasificación en la que se basan los nuevos modelos, y más aceptada en la actualidad, fue la propuesta por el DEWS de 2007[6]. Esta clasificación, que puede verse en detalle en la Figura 2.4, toma como referencia la etiología, estableciendo dos grandes grupos:

1. *SOS por falta de secreción acuosa o hiposecretor*: se produce debido a una insuficiente producción de lágrima. En cualquier forma de SOS, la obstrucción o disfunción de la glándula lagrimal implicara procesos de sequedad que resultan en descenso de la secreción y el volumen [119, 133]. Este proceso provocara la aparición del círculo vicioso inflamatorio previamente explicado (Figura 2.3). A su vez puede encontrarse asociado a Síndrome de Sjögren y No asociado a Síndrome de Sjögren [6] (Figura 2.4).
2. *SOS evaporativo*: es debido a la pérdida excesiva de agua en la superficie ocular expuesta, con respecto a una situación normal. Se encuentra fuertemente relacionado con los procesos de inestabilidad lagrimal. A su vez puede dividirse en dos subgrupos dependiendo si los factores que lo provocan siendo extrínsecos (exposición a agentes agresivos) o intrínsecos (los propios componentes del sistema son los que fallan) al UFL (Figura 2.4). Es importante mencionar que el límite entre estas dos categorías es a veces difícil de establecer[6](Figura 2.4).

Figura 2.4. Principales causas etiológicas del SOS[6]



2.2.4 Epidemiología

2.2.4.1 Datos epidemiológicos del ojo seco: prevalencia

Se han realizado multitud de estudios a lo largo del tiempo para calcular la prevalencia de esta enfermedad, pero uno de los problemas que presentan los estudios son las diferentes definiciones de ojo seco, clasificaciones y pruebas diagnósticas utilizadas.

La comparación de los datos específicos sobre la prevalencia del SOS, tomados de estudios epidemiológicos más relevantes, los sitúa en un rango de aproximadamente 5% a 35%[4]. Estas altas variaciones dependen de los restrictivos que se sean con los síntomas. Como ejemplo de estudios, destaca como uno de los primeros el realizado por Jacobsson et al. [134] en 1989, en una población sueca en la que el 14,9% de los sujetos de una muestra, constituida por 705 individuos de 52 a 72 años, presentaban “sequedad ocular”. Otro trabajo relevante fue el realizado casi una década más tarde por Schein et al. [135] en 1997 en Maryland (EEUU), conocido con el nombre de *Salisbury Eye Evaluation Study* (SEE), donde se encontró una prevalencia de 14,6% en una muestra de 2420 sujetos con un rango de edad de 65-84 años. Otro de los estudios de referencia fue realizado en 2003, llevado a cabo en Taipei (Taiwán)[5], en el que participaron 1361 sujetos donde esta prevalencia llegaba al 33,7% de los sujetos participantes. Pese a estas variaciones, podemos deducir que la prevalencia del SOS se encuentra en este rango del 5-30%, viéndose especialmente incrementada con la edad.

La prevalencia puede aumentar además por diversos factores como la edad, siendo el doble en mujeres que en hombres, y mayor en poblaciones asiáticas que en europeas o americanas, llegando al 50% en usuarios de lentes de contacto [1-3]. Un ejemplo de esto es el estudio realizado en Canadá en 1998[136], mediante el uso de 13.517 cuestionarios que encontraron una prevalencia del 21,7% en no portadores y de 51,1% en portadores de lentes de contacto.

Existe poca información sobre el curso natural del ojo seco tratado y no tratado, así como, falta de datos sobre el curso clínico de ojo seco de gravedad variable y los índices de evolución de leve a grave. Mediante la objetivación de las pruebas clínicas para todos los pacientes se podría crear un estándar para obtener datos útiles sobre este campo, ya que, al igual que ocurre con los sesgos en la incidencia[137], no existe unidad en las definiciones.

2.2.4.2 Factores de riesgo en el SOS.

Hace apenas dos décadas que comenzaron a estudiarse datos sobre los factores de riesgo para el desarrollo del ojo seco. Por ello apareció la necesidad de crear estudios de la forma de vida o dieta de las personas para ver como repercutían en esta enfermedad, siendo clara la necesidad de más estudios [37]. En la Tabla 2.2 se muestra un resumen los principales factores de riesgo según su nivel de evidencia científica hasta el momento recopilados por el DEWS de 2007 [6].

Factores de riesgo importantes: sexo femenino, edad avanzada, terapia de estrógenos en postmenopausia dieta baja en ácidos grasos esenciales omega 3 o con una inadecuada relación de ácidos grasos omega 6 a omega 3, cirugía refractiva, deficiencia de vitamina A, radioterapia, trasplante de médula ósea, hepatitis C, y ciertos medicamentos sistémicos y oculares (antihistamínicos)[6, 138, 139].

Otros factores de riesgo (poco estudiados): Diabetes mellitus, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus linfotrófico T humano 1, enfermedades del tejido

conectivo, quimioterapia para cáncer sistémico y otros medicamentos como la isotetrinoína, antidepresivos, ansiolíticos, beta-bloqueantes y diuréticos [6].

Tabla 2.2. Esquema de factores de riesgo del ojo seco[6]

Nivel de evidencia		
Consistente en su mayoría	Sugere	Poco clara
<ul style="list-style-type: none"> ~ Aciano ~ Sexo Femenino ~ Terapia hormonal de la postmenopausia ~ Ácidos grasos Omega 3 y Omega 6 ~ Deficiencia de Andrógenos ~ Enfermedad del Tejido Conectivo ~ Cirugía refractiva LASIK ~ Radioterapia ~ Trasplante de células madre ~ Deficiencias de Vitamina A ~ Infección por hepatitis C ~ Medicamentos: Antihistamínicos 	<ul style="list-style-type: none"> ~ Asiático ~ Diabetes Milleutis ~ Infección por VIH/HTLV1 ~ Ambiente de baja humedad ~ Disfunción ovárica ~ Sarcoidosis ~ Queratotomía penetrante ~ Quimioterapia sistémica ~ Medicamentos: Antidepresivos y Diuréticos, Inhibidores selectivos de la receptación de la serotonina, Beta-Bloqueantes 	<ul style="list-style-type: none"> ~ Hispano ~ Tabaquismo ~ Menopausia ~ Anticonceptivos Orales ~ Embarazo ~ Inyección de toxina botulínica ~ Gota ~ Acné ~ Anticolinérgicos: Ansiolíticos, Antipsicóticos, Alcohol

Pese a esta extensa lista, la mayoría de estos factores requieren de un estudio más exhaustivo y normalizado, siendo necesario concentrarse en hipótesis biológicas detalladas. Uno de los métodos principales para estimar de forma correcta los datos epidemiológicos es, como ya se dijo, mediante la estandarización de pruebas y el uso generalizado de buenos cuestionarios de síntomas para los pacientes.

2.2.4.3 Morbilidad del SOS: costo financiero e impacto sobre la calidad de vida.

El SOS es importante para la salud pública, debido a la alta prevalencia especialmente entre los grupos de mayor edad, teniendo en cuenta el actual envejecimiento poblacional y el modo de vida [140]. El envejecimiento de la población, los hábitos derivados del uso de pantallas electrónicas, la cada vez mayor exposición al Síndrome del Edificio Enfermo, el aumento creciente de la contaminación ambiental, el aumento en la incidencia de patologías oculares y sistémicas con repercusión en la lágrima, el mayor consumo de fármacos etc.; hace que la prevalencia de esta enfermedad sea creciente. El costo financiero es difícil de calcular directamente, pero abarca consultas, intervenciones quirúrgicas, medicamentos, así como la necesidad de lentes especializadas [141-143]. Además, existen costos indirectos como los tiempos de productividad perdida durante el trabajo [144, 145]. Dado el gasto económico asociado a las consultas especializadas, se ha propuesto que los costes derivados de esta patología podrían minimizarse si los pacientes se monitorizaran adecuadamente por los profesionales de atención primaria [141].

El SOS repercute, además, en la calidad de vida al afectar al bienestar; el dolor y los síntomas provocados por la irritación y la influencia en la pérdida de la función visual; llegando a tener afectaciones más severas psicológicas o físicas. Estudios actuales muestran que cada vez son mayores las afectaciones de la función visual [1, 6-9]. Uno de las principales afectaciones es la agudeza visual al contraste, siendo esto muy aquejado entre los pacientes de ojo seco, como visión borrosa o nebulosa transitoria que les obliga a parpadear. En contadas ocasiones el SOS puede causar ceguera o disminución de la visión de forma permanente [146], sin embargo, si se mantiene sin ser tratado, puede dañar los tejidos de la superficie ocular y causar disminución de la visión [147]. Estos problemas afectan también en la intolerancia para

el uso de lentes de contacto o la imposibilidad de realizar cirugía refractiva limitando ciertos aspectos de la vida del paciente[1].

2.3 PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DEL SÍNDROME DE OJO SECO

Debido a su etología multifactorial, el diagnóstico de SOS requiere de una combinación de cuestionarios de síntomas y test clínicos. La mayoría de estos test clínicos están dirigidos al estudio de la cantidad o incluso la calidad lagrimal, siendo su subjetividad motivo de gran variabilidad [97-100]. Esto genera la necesidad de hacer amplias baterías de pruebas, sin tener todavía un “Gold Standard” diagnóstico. Adicionalmente, parece existir una baja correlación entre tests, seguramente debido a este factor subjetivo[148], e incluso entre síntomas y signos[51].

Entre las pruebas clínicas de diagnóstico más utilizadas clásicamente están los cuestionarios [1, 23-31]; los test rojo de fenol y de Schirmer [1, 47-52]; el TBUT [32-41]; la evaluación de las Glándulas de Meibomio[18-20, 22, 149-151]; o la tinción corneal y conjuntival mediante fluoresceína, verde lisamina o rosa de bengala[52, 82, 152, 153]. La mayoría de estas medidas son específicas para un subtipo de la enfermedad, sin embargo, se utilizan ampliamente en los ensayos clínicos como criterios de inclusión[152, 154]. Además los valores de especificidad y sensibilidad pueden variar muy ampliamente dependiendo de los test y del criterio de corte: El Schirmer puede presentar una sensibilidad entre 10 y 85% y una especificidad entre el 68 y el 100% [155-157]; en el caso de la osmolaridad la sensibilidad puede variar entre el 48 y el 95 % y su especificidad entre el 78 y el 99% [65, 86]; mientras que cuestionarios como el McMonnies presenta una sensibilidad del 98% y una especificidad del 97% [29]. Esto llega a generar diagnósticos confusos, y asienta la necesidad de crear grandes baterías para que unos test diagnósticos suplan las deficiencias de otros.

Debido a la variedad de procesos patológicos asociados con la progresión del SOS, aparecen frecuentemente signos en conflicto, por ejemplo, un paciente con baja producción de lágrima (Schirmer < de 5mm) también puede presentarse con un buen TBUT (TBUT > 20s), pudiéndose dar incluso el caso inverso. El problema radica en que estos signos pueden llevar a una variación significativa del análisis, puesto que la importancia relativa de cada signo no está claramente establecida ya que los signos indicativos de los subtipos de la enfermedad no se correlacionan necesariamente con la severidad de la misma[13, 51]. Además, hay pocos datos disponibles sobre la variación longitudinal y diurna de los actuales signos clínicos, que pueden jugar un papel en la falta de correlación entre estos signos y síntomas [13, 51, 152, 154, 158]. En un estudio de 2004, Nichols et al. [51] correlacionaron pruebas diagnósticas clásicamente usadas (tinción corneal, test de rojo fenol, test de Schirmer, etc.) con los síntomas del test de McMonnies original (picor, sequedad, quemazón y enrojecimiento), encontrando valores de correlación bajos entre ellos, con una frecuencia de “síntomas ocasionales” como respuesta más común en pacientes de ojo seco severo. En un estudio similar de Sullivan et al. [158] de 2014, los autores discuten la dificultad en el diagnóstico por encontrarse incongruencias entre el estados sintomático y los signos clínicos.

Pese a ello, en el DEWS de 2007 se han establecido ciertas bases para intentar cuantificar y graduar el grado de severidad del SOS dependiendo de una serie de signos y síntomas (Tabla 2.3) [1, 6, 13, 41]. Una de las propuestas más aceptadas y extendidas, es el “*Panel de Delphi: Sistema de clasificación de gravedad del ojo seco*” creado por Behrens et al. [41] y modificado por el DEWS para clasificar la severidad del grado de SOS[6, 41]. Actualmente, la

inestabilidad y la hiperosmolaridad lagrimal han sido reconocidos como una característica común de todos los tipos de SOS y se han referido como el posibles "Gold Standard" diagnóstico [6, 13, 69, 154, 159].

Tabla 2.3. Panel de Delphi modificado por el DEWS para la clasificación del grado de SOS. Este panel fue propuesto para dividir la enfermedad en cuatro niveles o grados en base a síntomas y signos comúnmente usados con el objetivo de tomar decisiones diagnósticas para el posterior tratamiento [6, 41]

Nivel de Gravedad	1	2	3	4
Incomodidad, gravedad y frecuencia	Leve y/o episódico: ocurre bajo estrés ambiental	Episódico o crónico, moderado, con o sin estrés	Frecuencia o constante grave sin estrés	Severo y/o incapacitante y constante
Síntomas visuales	Ninguna o fatiga episódica leve	Episódico molesto y/o limitantes	Molesto, crónico y/o constante, limitante	Constante y/o posiblemente incapacitante
Inyección conjuntival	Ninguna o leve	Ninguno o leve	+/-	+ / ++
Tinción conjuntival	Ninguna o leve	Variable	Moderado o marcado	Marcado
Tinción corneal (severidad/ubicación)	Ninguna o leve	Variable	Central marcado	Erosiones punteadas severas
Signos corneales/lagrimal	Ninguna o leve	Desecho leves, bajo menisco	Queratitis filamentososa, agregación de moco, aumento de desechos en las lagrimas	Queratitis filamentososa, agregación de moco, aumento de desechos en las lágrimas, ulceración
Párpado/Glándulas de Meibomio	DGM variablemente presente	DGM variablemente presente	Frecuente	Triquiasis, queratinización, simblefaron
TBUT (s)	Variable	≤10	≤5	Inmediato
Puntuación de Schirmer (mm/5min)	Variable	≤10	≤5	≤2

En el presente estudio nos centraremos en la explicación más detallada de aquellas pruebas objeto de esta tesis.

2.3.1 Cuestionarios de síntomas

Una de las herramientas más utilizadas por los clínicos para diagnosticar el SOS es evaluar la sintomatología asociada mediante el uso de cuestionarios estandarizados. Los cuestionarios para evaluar el SOS son numerosos y en continua aparición (Tabla 2.4), siendo dos de los más utilizados el *Ocular Surface Disease Index* (OSDI) [1, 23-27] y el McMonnies[1, 24, 28-31].

Tabla 2.4. Principales cuestionarios en el síndrome de SOS [1]

Título	Resumen del cuestionario	Descripción/uso
OSDI [1, 23-27]	12 preguntas	Gravedad de la enfermedad
McMonnies[1, 28-31]	15 preguntas	Detección en población clínica
CANDEES[160]	13 preguntas	Estudios epidemiológicos en una muestra aleatoria grande
NEI-VFQ[161]	25 preguntas	Comparaciones grupales
IDEEL[162]	57 preguntas (3 módulos)	Estudios epidemiológicos y clínicos
DEQ[163]	21 preguntas	Estudios epidemiológicos y clínicos

2.3.1.1 Ocular Surface Disease Index (OSDI)

El cuestionario OSDI (Allergan, Inc. Irvine, CA, USA)[1, 23, 26, 27, 164] (Anexo 2) es utilizado para cuantificar el impacto en la calidad de vida de los síntomas visuales relacionados con el SOS. Este cuestionario específico incluye 12 preguntas que están

subdivididas en tres grupos: (1) disconfort ocular, que incluye síntomas como “dolor ocular”; (2) funcionalidad, que mide la limitación en la realización de actividades comunes como leer o trabajar con un ordenador; y finalmente (3) agentes ambientales, que mide el impacto de fenómenos como el viento o las áreas de baja humedad en la aparición de dichos síntomas. Las preguntas están realizadas en referencia a la semana previa. Las respuestas posibles se refieren a la frecuencia o molestias: nunca, algunas veces, la mitad del tiempo, la mayor parte del tiempo o todo el tiempo. La puntuación del cuestionario se calcula siguiendo la guía que provee la propia empresa [23, 26, 164]. Esta puntuación varía entre 0 y 100, representando mayores puntuaciones a mayores problemas. El cálculo de la misma se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{OSDI} = \frac{\text{Suma de las puntuaciones} \times 25}{\text{Numero de cuestiones respondidas}}$$

El resultado de esta fórmula es comparada con una escala progresiva que varía en dependencia del número de preguntas respondidas y la suma de las respuestas. Cuando se utiliza como criterios de corte o inclusión el valor más extendido para diferencias pacientes sanos de patológicos es una puntuación mayor o igual de 13 como resultado a esta fórmula [1, 23-27]. Este cuestionario permite además categorizar a los pacientes según su gravedad como sujetos sanos (OSDI de 0 a 13), sujetos con síntomas de leves a moderados (OSDI entre 13 y 23), sujetos con síntomas de moderados a severos (OSDI entre 23 y 32) y sujetos con sintomatología severa (OSDI mayor de 32) [23-27].

2.3.1.2 Cuestionario McMonnies

El cuestionario de McMonnies [1, 28-31] (Anexo 3) es un cuestionario específico de ojo seco utilizado para determinar el número, tipo y frecuencia de los síntomas de sequedad. Este cuestionario, compuesto de 12 preguntas repartidas en 6 áreas que afectan a la superficie ocular: (1) área de datos de afiliación, para obtener datos como la edad o el sexo; (2) área que trata de averiguar si el paciente ha sido diagnosticado previamente de SOS; (3) área que se centra en la sintomatología del paciente (picor, sequedad, sensación de arenilla, quemazón y molestia/ dolor) y la frecuencia de los mismos; (4) área enfocada a la influencia medioambiental y situaciones adversas que pueden agravar los síntomas como “fumar”; (5) área orientada al uso de medicamentos que puedan agravar el SOS (antihistamínicos, diuréticos, tranquilizantes, etc.); y finalmente (6) un área centradas en condiciones o enfermedades sistémicas y oculares relacionadas con el SOS, como el “síndrome de Sjögren”, problemas de la tiroides o lagofthalmos nocturno. Según las respuestas del paciente se dará una puntuación que será más alta cuanto más grave sea la condición.

En la literatura se han propuesto multitud de valores de corte, siendo uno de los más extendidos un valor de 10 en la puntuación resultante (valores mayores de indican problemas de ojo seco) [30, 31]. Al igual que ocurre con el OSDI, pero de maneras menos elaborada, este cuestionario también permite categorizar a los sujetos según su gravedad como sujetos sanos (McMonnies de 0 a 9), sujetos con ojo seco marginal (McMonnies de 10 a 20) y sujetos con ojo seco (McMonnies mayor de 20) [30, 31, 165].

2.3.2 Test para evaluar la estabilidad de la película lagrimal

La capa lipídica juega un papel importante en la limitación de la evaporación del resto del film lagrimal en los periodos entre parpadeos, siendo esencial para una correcta estabilidad de toda la estructura. De manera no, o mínimamente invasiva, la calidad y grosor de esta película

puede ser estudiada o estimada mediante pruebas clínicas como el TBUT[37, 38], el NIBUT [34, 42-44] o pruebas de Interferometría [166-168].

2.3.2.1 Tiempo de ruptura lagrimal (*Tear Break-up time, TBUT*)

El tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) es una técnica diseñada para medir la estabilidad lagrimal[1, 6-8, 32-41, 71, 72, 74, 75]. Tras la instilación de fluoresceína sobre la superficie corneal, y en una lámpara de hendidura con los filtros adecuados para su visualización, se mide el tiempo que transcurre entre el primer parpadeo y la aparición de la ruptura en la película lagrimal (Figura 2.5). En la Figura 2.5 se puede observar cómo tras la apertura palpebral, la película lagrimal se va a adelgazamiento principalmente por procesos evaporativos, hasta que se produce una ruptura o ausencia de la estructura lagrimal. Esta ruptura se representa como un punto o línea negra o “charco” que aparece en la superficie verde fluorescente generada por la fluoresceína. En la Figura 2.6, se muestra un ejemplo real de este proceso; se puede observar cómo en los primeros segundos aparecen zonas de adelgazamiento, llegando a la ruptura en el segundo 5 (5 s) momento en el que aparecen zonas negras. Se observa igualmente el tiempo transcurrido entre parpadeos, correspondiendo con el MBI, en este caso 12 segundos.

Figura 2.5. Representación esquemática sobre los eventos locales en el tiempo de ruptura lagrimal

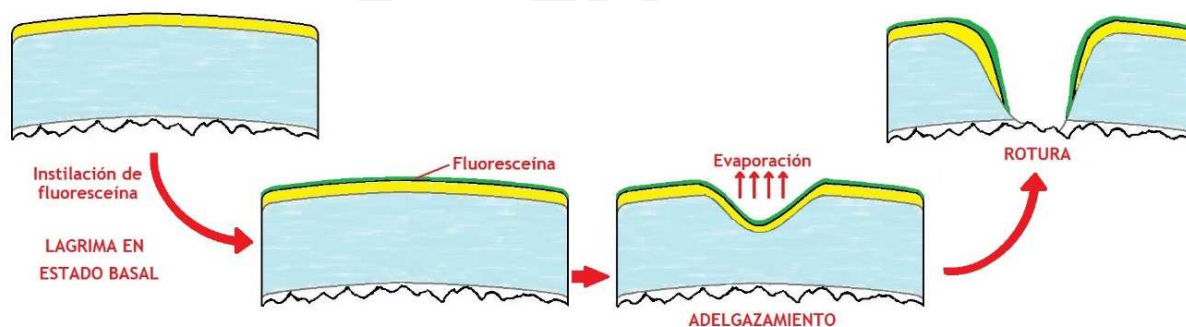
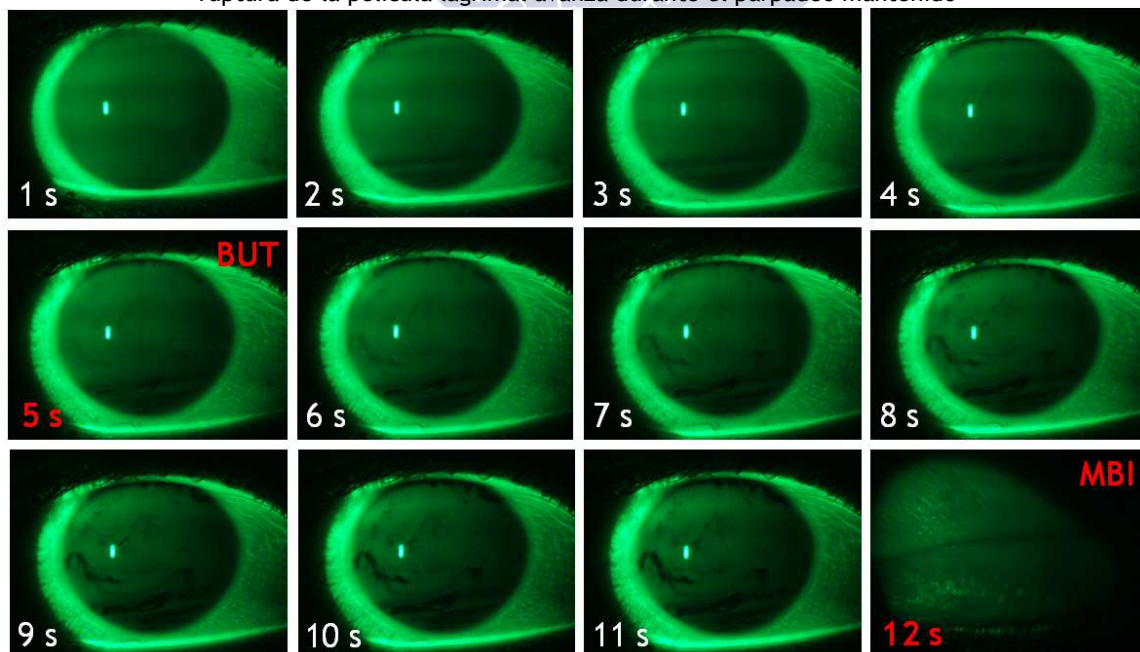
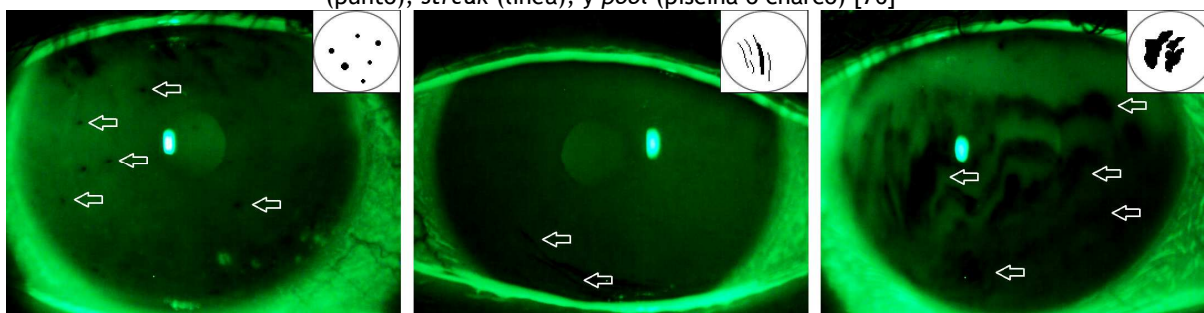


Figura 2.6. Ejemplo real de medida de TBUT y MBI. En cada uno de los fotogramas puede verse como la ruptura de la película lagrimal avanza durante el parpadeo mantenido



Debido a que se trata de un test simple, ha sido ampliamente utilizado en el diagnóstico de problemas de la película lagrimal como el SOS, mostrando buena sensibilidad y especificidad en referencia a otros test diagnósticos, con ambos valores por encima del 80% en los diversos criterios de corte [1, 6-8, 13, 35, 39, 71, 72]. Sin embargo, la interpretación y significado de TBUT no ha sido claramente definido. El criterio de corte clásico para pacientes con problemas de sequedad ocular ha oscilado en valores entre 8 y 10 segundos [6, 41, 69], pero muchos pacientes patológicos o sanos muestran tiempos fuera de estos rangos [1, 37, 73, 75]. Uno de los motivos principales que puede haber generado este hecho, es la variabilidad inherente que existe entre criterios clínicos al decidir cuando la imagen de la película muestra realmente la ruptura del film [1, 6, 50]. Otro punto ya comentado en la literatura es que no todas las rupturas son similares, pudiendo ser en punto, línea o charco (Figura 2.7), lo que alteraría la interpretación real [76].

Figura 2.7. Patrones morfológicos de ruptura lagrimal y ejemplo de cada uno. De derecha a izquierda: *dot* (punto), *streak* (línea), y *pool* (piscina o charco) [76]



Para atajar estos problemas, se ha propuesto estandarizar el volumen de fluoresceína que se instila previamente al test (clásicamente, se utilizan tiras que instilan un volumen no controlado que oscila de los 5 a los 50 μ l) [32-35, 95]. Como segunda medida, la evaluación en grabaciones y no en tiempo real, ayuda a evitar malas interpretaciones y minimiza las medidas mal realizadas [6, 36, 95].

Como parámetro adicional al propio tiempo de ruptura lagrimal, se ha propuesto el tiempo máximo de parpadeo (MBI)² como indicador complementario de calidad lagrimal [36, 74, 75] (Figura 2.6). Este parámetro se define como el tiempo máximo que el paciente es capaz de mantener su ojo abierto antes de la aparición del parpadeo reflejo. Estudios recientes han mostrado que este tiempo es mayor en pacientes control que en patológicos [74, 75, 169].

2.3.2.2 Interferometría

El espesor de la capa lipídica se puede examinar in vivo con la lámpara de hendidura mediante Interferometría, técnica basada en la observación de la reflexión especular sobre la lágrima. Para generar este fenómeno de interferencia, se han propuesto sistemas como el Tearscope Plus (Keeler, Windsor, UK)[166, 170-172], basado en la proyección de una fuente cilíndrica de luz blanca sobre la superficie ocular. Esta fuente de iluminación específica nos permite visualizar el patrón interferencial de la capa lipídica superficial, y de esta manera evaluar el grosor y regularidad mediante la observación del aspecto y color del mismo[166, 167, 173]. Existe una relación directa entre el espesor de la capa lipídica y su color, pudiendo oscilar este entre 90 – 135 nm en espesores gruesos, 60 – 90 nm en espesores medios, y < 60nm en espesores finos.

²MBI: Maximum Blink Interval.

El método más comúnmente usado para la clasificación de estos patrones lipídicos interferenciales con el Tearscope, es la clasificación de Guillon, que de menor a mayor grosor la dividimos en: Marmóreo (abierto: 15 – 30 nm; cerrado: 30 – 50 nm), Fluido (50 – 80 nm), Amorfo (80 – 90 nm) y Coloreado (90- 180 nm; patológico > 180 nm) [102, 166, 170, 171]. Este autor describe además la existencia de un patrón “Anormal” en situaciones patológicas[174].

A pesar de que esta técnica muestra un método útil para evaluar el film lagrimal, la clasificación de imágenes de patrones interferenciales es difícil, por lo que se encuentra muy afectado por el criterio subjetivo y la experiencia del evaluador [165, 170]. Se ha establecido incluso que existe una “curva de aprendizaje” de larga duración, lo que relega esta técnica a un segundo plano en la evaluación clínica del film lagrimal [175].

2.3.3 Test para evaluar el volumen lagrimal

Las glándulas lagrimales principal y accesorias son las encargadas de general la mayor parte del volumen lagrimal. Un lagrimeo excesivo puede venir causado por la hipersecreción de estas glándulas o un drenaje insuficiente del sistema. Existen varios test encargados de medir la cantidad de secreción, con el objetivo de estudiar el estado de este sistema.

2.3.3.1 Test de Rojo Fenol y test de Schirmer

Entre los test de medida del volumen lagrimal, destacan el Test de Rojo Fenol y el Test de Schirmer [1, 47-52]. Ambos test se basan en la colocación de un hilo de algodón impregnado de rojo fenol en el primero y un papel de filtro blanco en el segundo, en el tercio externo del párpado inferior, con o sin anestesia (dependiendo de la modalidad que se utilice). Tras un tiempo establecido para cada prueba, el hilo o el papel es retirado, y la longitud de la marca húmeda producida por la secreción, medida. Hay una relación directa entre la longitud de la tira humedecida y el volumen lagrimal. Resultados bajos de esta medida indicarán problemas de secreción, oscilando los valores normales para el test de Schirmer entre 12 y 15 mm[1, 50-52]. En relación al hilo de algodón de rojo de fenol se coloca igual que el Schirmer, el colorante es sensible al pH, cambia su color, de amarillo a rojo cuando se humedece por la lágrima. El volumen se mide por los milímetros de hilo humectado, siendo su valor normal entre 10-20 mm a los 15 segundos[1, 48-52].

2.3.3.2 Análisis del menisco lagrimal

Se calcula que el 75–90% del volumen total de la lágrima, se encuentra contenido en el menisco lagrimal (Figura 2.8), por lo que la medida de sus características ofrece un indicador no invasivo del volumen total del film lagrimal [77, 79-81]. Por ello, parámetros como la altura del menisco lagrimal (TMH)³[53-58], el radio de curvatura (TMR)⁴[59, 60], el área (TMA)⁵[61-63] o la profundidad (TMD)⁶[62, 63], han sido aplicados en el diagnóstico de problemas relacionados con la sequedad lagrimal [13, 55, 62, 77, 172, 176, 177]. La media del TMH es actualmente una de las más usadas en la rutina clínica diaria, con especial relevancia en la clínica del SOS [13, 82, 83]. Sin embargo, su medida *in situ* se encuentra limitada por su pequeño tamaño que implica una dificultad en la visualización de los límites inferior y superior, y los propios micromovimientos que los ojos realizan.

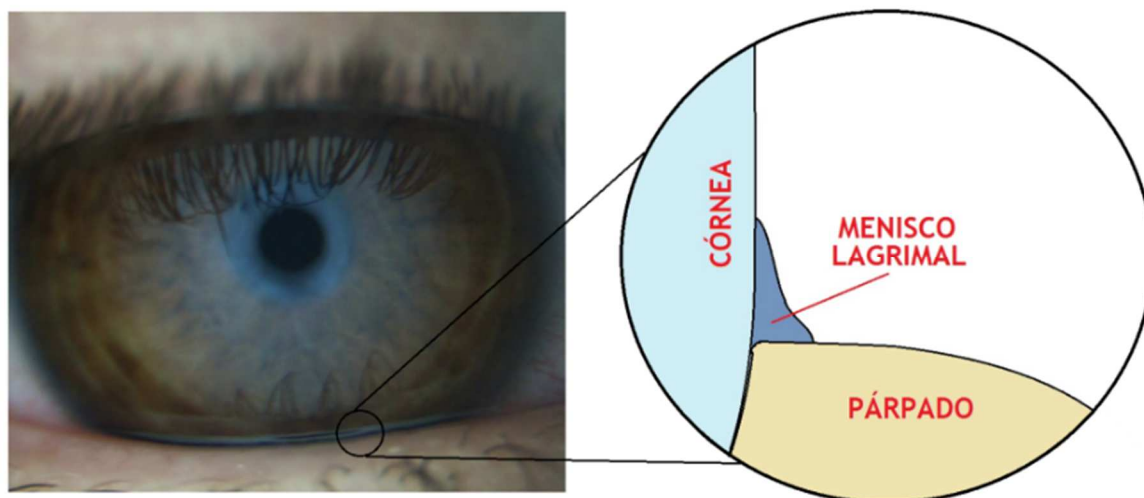
³TMH: Tear meniscus height.

⁴TMR: Tear meniscus radius.

⁵TMA: Tear meniscus area.

⁶TMD: Tear meniscus depth.

Figura 2.8. Representación del menisco lagrimal



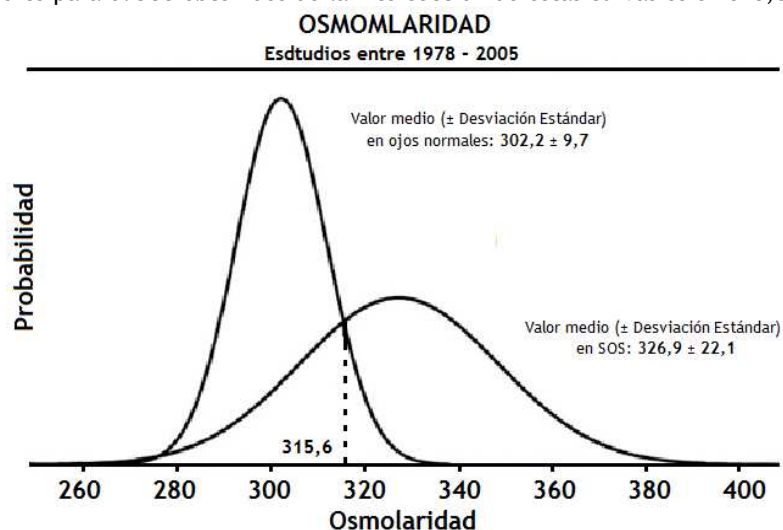
Otra técnica de rutina utilizada para evaluar el menisco es la valoración subjetiva del aspecto del menisco. Ésta se basa en el uso de escalas gradadas para describir el estado y la altura del menisco lagrimal inferior [24, 57, 178]. El uso de escalas clínicas ha mejorado significativamente la monitorización de cambios en la fisiología ocular, dando valores más estables y sensibles que las descripciones verbales[57, 179]. Sin embargo, existe todavía una variabilidad subjetiva entre clínicos, además del error generado por usar escalas basadas en pasos escalares no continuos. Para contrarrestar estos últimos problemas, se recomienda el uso de técnicas de grabación y captura de imagen [24].

2.3.4 Test para evaluar la osmolaridad lagrimal

Osmolalidad y osmolaridad son dos términos que habitualmente se utilizan como intercambiables cuando nos referimos a diluciones: la osmolalidad de una solución es la concertación de partículas osmóticamente activas en una disolución expresado en osmoles por kilogramo (mOsm/kg), mientras que la osmolaridad está calculada en osmoles por litro (mOsm/l)[78]. Las soluciones biológicas (como la sangre o la orina) son en su mayor parte agua, por lo que estos dos términos pueden ser similares. En el caso de la lágrima, la diferencia entre osmolaridad y osmolalidad es menor de un 1-5%, así que se tratan como términos intercambiables [78, 180]. Para ser consistentes con la literatura del campo, en el presente trabajo usaremos preferentemente el término osmolaridad.

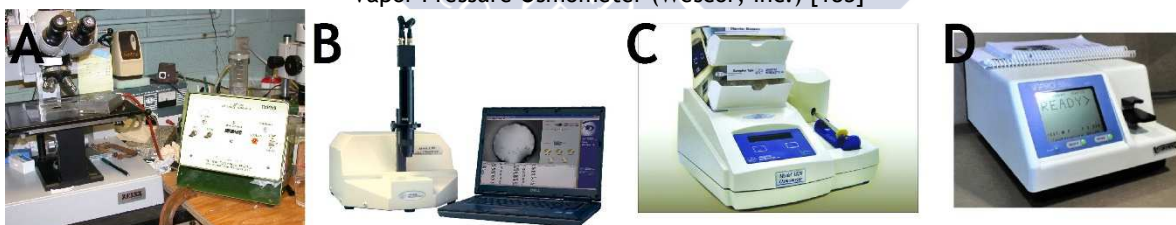
Se considera que la osmolaridad de la película lagrimal normal es de $302 \pm 6,3$ mOsm/l[24, 65, 66, 68-70], aumentado en el SOS de forma brusca y llegando a rondar los valores de 321-340 mOsm/l[65-67] (Figura 2.9). En la actualidad se han propuesto multitud de criterios de corte diagnósticos para el SOS, siendo 316 mOsm/l[65, 70, 78], con una sensibilidad del 73% y una especificidad del 90%, uno de los más usados[70].

Figura 2.9. Ejemplo de distribución normal de las curvas de la osmolaridad lagrimal obtenida en sujetos normales y pacientes con “*queratoconjuntivitis seca*” en una revisión entre 1978 y 2004. Un valor referente o punto de corte para el SOS obtenidos de la intersección de estas curvas es en 315,6 mOsm/l[65]



Los beneficios de medir la osmolaridad lagrimal en el diagnóstico de la enfermedad del ojo seco se han visto socavados por las dificultades de su medición, ya que se trata clásicamente de una prueba de laboratorio. Estas dificultades han impedido su aceptación y aplicación general en la práctica clínica. En la actualidad, se utilizan para estudios de diagnóstico de SOS tres tipos de osmómetros, basados en diferentes procedimientos físico-químicos: 1) medida del descenso del punto de congelación, 2) medida de la presión de vapor y 3) medida de la impedancia eléctrica.

Figura 2.10. Osmómetros utilizados en la medida de la película lagrimal. A) Clifton (Clifton Technical Physics, Hartford, NY) [66, 70, 86-88]; B) Advanced Model 3100 Tear Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA) [159]; C) Advanced Micro-osmometer 3320 (Advanced Instruments, Norwood, MA) [181, 182]; D) Wescor 5520 Vapor Pressure Osmometer (Wescor, Inc.) [183]



1) *Osmómetros de disminución del punto de congelación o descenso punto crioscópico:* es la más comúnmente usada para la medición de la osmolaridad de la lágrima y considerada la técnica de referencia para este propósito [68, 78, 152]. Este método recibe su nombre de la supercongelación que sufre la muestra. El agua se congela a 0°C , pero las soluciones (agua mezclada con un soluto) se congelan a temperaturas más bajas, es decir, que el punto de congelación de la solución se encuentra "deprimido". Por lo tanto, cuanto menor sea el punto de congelación de una solución, mayor es su osmolaridad[180]. Es un método muy preciso, pero que habitualmente se encuentra recluido a laboratorios [66, 184]. Esta técnica incluye la necesidad de conocimientos especializados, el mantenimiento constante de los equipos, un largo procedimiento de medida, y posibles errores debido a la evaporación de la muestra de ensayo [70, 184]. Dentro de este grupo destaca el osmómetro Clifton (Clifton Technical Physics, Hartford, NY) [66, 70, 86-88], considerado el osmómetro “Gold Standard” para el diagnóstico del SOS (Figura 2.10a). En la última década se han intentado crear algunos

osmómetro de congelación para la medida de la osmolaridad en lágrima, destacando el Advanced Model 3100 Tear Osmometer (John Morris Scientific, Inc.) [159] (Figura 2.10b), el cual actualmente no se puede adquirir en el mercado, o la aplicación de osmómetros como el Advanced Micro-Osmometer 3320 (Advanced Instruments, Norwood, MA) (Figura 2.10c) [181, 182].

2) *Osmómetros por presión de vapor*: en comparación con el descenso del punto de congelación, la osmometría por presión de vapor es un método alternativo relativamente simple para medir [185]. Funciona con el principio de que la presión de vapor de una disolución es menor que la presión de vapor del disolvente puro (ej. el agua) a la misma temperatura y presión. En otras palabras, cuantas más partículas se presenten en la solución, más tiempo tarda en evaporarse. Aunque este método es rápido y fiable, tiene una gran desventaja para la medición de la película lagrimal ya que requiere una muestra relativamente grande. Asimismo, se requiere habilidad para recoger la muestra sin provocar lagrimeo reflejo. Sólo unos pocos estudios de investigación han utilizado este método para medir la osmolaridad en el SOS [185]. En consecuencia, se ha sugerido que osmometría por presión de vapor debe ser considerado como un test diagnóstico secundario [37, 78]. En este caso, uno de los osmómetros de referencia en este campo es el Wescor 5520 Vapor Pressure Osmometer (Wescor, Inc.) [183] (Figura 2.10d), junto a los subsiguiente modelos de la misma casa.

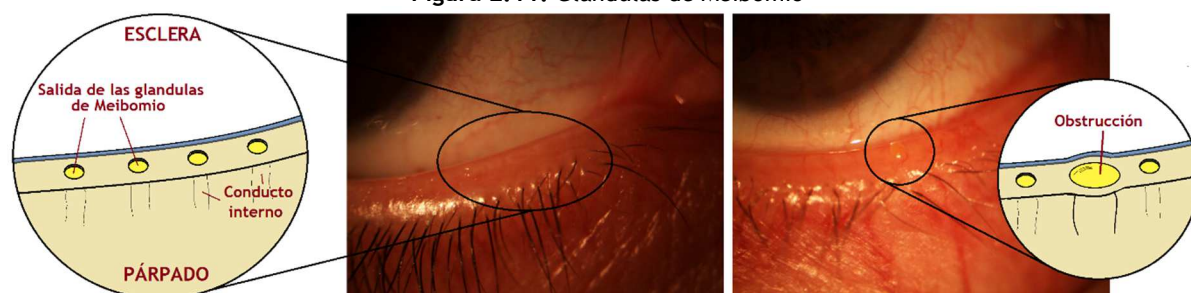
3) *Osmómetro de Impedancia eléctrica*: Este método se basa en la conductividad eléctrica de los fluidos para medir la osmolaridad de la película lagrimal. Ogasawara et al. [186] fueron los primeros en determinarla indirectamente, a través, de la medición de la conductividad eléctrica de las muestras de lágrima. Todos los fluidos tienen propiedades eléctricas, es decir, que se caracteriza por su contenido iónico. Si hay algún cambio en la composición y concentración de los iones en el líquido, su conductividad eléctrica va a cambiar, y este cambio se correlaciona con la osmolaridad (los monitores de glucosa en la sangre utilizan una técnica similar). El osmómetro TearLab™ (TearLab™ Corporation) se basa en la medida de la osmolaridad a través de la impedancia eléctrica [24, 52, 65, 69, 78, 97, 152, 182, 186, 187]. La medición se obtiene a través de una sonda que contiene un microprocesador de un solo uso con el que se captura la muestra de lágrima (nanolitros). Esta sonda contiene a su vez unos electrodos que miden la impedancia eléctrica de la muestra, para después transformarla en unidades de osmolaridad [52, 69, 70, 188]. La principal ventaja de esta técnica es la rapidez y la baja invasividad debida la minúscula muestra lagrimal que se requiere; sin embargo la colocación del sensor, cerca del borde del párpado, puede desencadenar el lagrimeo reflejo.

El desarrollo de nuevos instrumentos para la medición de la osmolaridad de la película lagrimal, con potencial para la aplicación clínica, es esencial en la investigación diagnóstica diferencial de las enfermedades lagrimales. La medición de la osmolaridad de la película lagrimal es el mejor medio de captar, en un solo parámetro, el estado del sistema lagrimal. Se han realizado multitud de estudios para fijar qué valores serían los parámetros normales y patológicos, porque, pese a que, anteriormente asumimos que 316 mOsm/l es el valor de corte, son necesarios más estudios para obtener mayor consenso. Es necesario, por tanto, en un futuro desarrollar técnicas sencillas de usar y de menor coste para aplicarla de forma generalizada a la práctica clínica diaria.

2.3.5 Análisis de las Glándulas de Meibomio: Meibometría

Las Glándulas de Meibomio (Figura 2.11) juegan un papel importante en la etiología del SOS [19, 20, 22, 149-151, 189], especialmente en el tipo evaporativo [1, 6-8, 20, 21, 189]. Los trabajos de revisión más actuales han sugerido que la deficiencia o el exceso en la grasa meibomiana es un factor intrínseco asociado con esta enfermedad, catalogándose comúnmente como “*Disfunción de las Glándulas de Meibomio*” (DGM) [19, 20, 22, 149-151]. El taller internacional sobre la disfunción de las Glándulas de Meibomio la define como: “Una alteración crónica y difusa de la Gandulas de Meibomio caracterizada comúnmente por la obstrucción de los conductos terminales y/o cambios cualitativos/cuantitativos en la secreción glandular. Puede causar una alteración de la película lagrimal, síntomas y signos de irritación ocular, inflamación y enfermedades en la SO” [18, 20, 149-151].

Figura 2.11. Glándulas de Meibomio



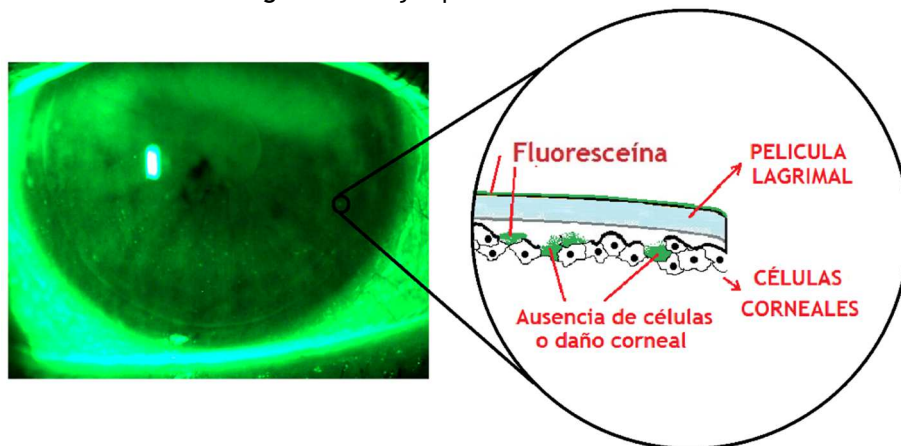
Con el objetivo de evaluar los párpados y la secreción de las Glándulas de Meibomio, se han propuesto un gran número de test diagnósticos que van desde la Evaluación de la Expresión de las Glándulas de Meibomio [8, 190], a la Meiboscopia [8], Meibografía [191, 192], microscopia confocal [150], o el análisis de cuestionarios de síntomas [1, 23-27, 30, 31]. Una de estas técnicas es la medida de los niveles basales de grasa en el margen lagrimal, o Meibometría, que ha presentado hasta el momento resultados diagnósticos prometedores, siendo un aparato destinado a ella el Meibómetro [189, 193-199].

El Meibómetro MB550 de Courage-Khazaka electronic, es un aparato diseñado para una evaluación rápida e *in situ* de la secreción producida por las Glándulas de Meibomio. Tras presionar el párpado inferior paciente para obtener la muestra para provocar la salida de lípido, se toma la muestra utilizando una cinta sintética de medidas estándar. Seguidamente, esta cinta es analizada mediante una unidad fotométrica conectada a un ordenador para obtener las curvas de distribución lipídica. Sin embargo, no existe consenso de cómo se deben promediar los resultados de estas curvas [189, 193-199], o qué criterios de corte diagnósticos deben ser tomados [13, 16].

2.3.6 Evaluación de las tinciones corneales y conjuntivales

El uso de tintes vitales para detectar lesiones sobre la superficie ocular es utilizado comúnmente en la clínica, especialmente en la detección de aquellas generadas por la sequedad ocular [52, 82, 152, 153]. Los tintes vitales más utilizados son la fluoresceína, el verde de lisamina y el rosa de bengala [13, 32-35, 51, 200]. Estos dos últimos son especialmente útiles para las tinciones conjuntivales debido a la fácil visibilidad que presentan, sin embargo, pierden utilidad tiñendo la lágrima y por tanto tienen baja visibilidad a nivel corneal [13]. Al igual que en el análisis del film lagrimal, la visualización de las tinciones a nivel corneal se realizan con fluoresceína previamente instilada (Figura 2.12).

Figura 2.12. Ejemplo de tinción corneal



En las últimas décadas se han propuesto multitud de escala y sistemas de clasificación para las tinciones corneales: el sistema de puntuación Bijsterveld, que valora las tinciones en un rango de 0 a 9 según su severidad [164, 201]; la escala CCLRU, que clasifica las tinciones en 4 grados en incrementos de 0,1 [13, 58, 202-206]; o la Escala colaborativa longitudinal para la evaluación del queratocono (CLEK)⁷, usada en estudios de queratocono recientes para evaluar la localización y forma de la tinción [13, 50, 51, 58, 203-205, 207-209]. Actualmente, una de las escalas más utilizada en clínica es la Escala Oxford, que mide la severidad de las tinciones en una escala de 0 a 5 [13, 200, 210-212].



⁷CLEK: Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus.

3. POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN

Como se comentó, el propósito general de este trabajo fue objetivizar tests clínicos mediante el desarrollo de nuevos protocolos de medida, y técnicas semiautomáticas y automáticas de procesamiento de imagen y video, así como analizar las relaciones entre ellas. Para lograrlo, el presente trabajo se desarrolló como un estudio prospectivo⁸ analítico observacional⁹ en base cohorte.

3.1.1 Diseño del estudio

Tomando como base los principales mecanismos centrales para el diagnóstico del SOS, el presente trabajo de tesis fue dividido en tres partes o estudios. Estos estudios fueron realizados de manera paralela, aislando los diferentes subgrupos muestrales para cada uno de ellos.

- 1) *Estudios de la estabilidad de la película lagrimal*: este estudio fue dividido a su vez en diversas secciones dependiendo del aspecto o técnica que se quería analizar.
 - a) Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos.
 - b) Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral.
 - c) Análisis de la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el TBUT y la osmolaridad lagrimal.
 - d) Estudio piloto para validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color.
- 2) *Estudio del menisco lagrimal*: dirigido a validar la aplicación de un protocolo de medida mediante asistencia por software de carácter semiautomático con un software de código abierto para la medida de TMH.
- 3) *Estudio de la osmolaridad*: en este estudio, y mediante el uso de muestras estándar y de pacientes, se pretende analizar la eficacia de un osmómetro basado en el descenso del punto de congelación (Fiske 110).

Para evitar los efectos de la exageración en la precisión de las estimaciones estadísticas [213, 214], así como los efectos de lagrimeo reflejos producidos por medir el ojo contralateral, en todos los protocolos realizados en pacientes solo los resultados del ojo derecho fueron utilizados. En todos los casos, las pruebas fueron realizadas bajo condiciones similares de luz, temperatura (20-23°C) y humedad (50-60%).

⁸*Prospectivo*: estudio en el tiempo que se diseña y comienza a realizarse en el presente, pero los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo, en el futuro.

⁹*Observacional*: el investigador no interviene, solo hace registros.

3.1.2 Grupo Muestral

Los sujetos fueron reclutados entre los estudiantes y pacientes referidos al *Servicio de Optometría* de la *Facultade de Óptica e Optometría* (Universidade de Santiago de Compostela). Todos los sujetos participaron voluntariamente en el estudio y tuvieron la libertad de abandonar el mismo cuando lo desearan sin justificación. Todos ellos firmaron un consentimiento informado (Anexo 1) tras la explicación de la naturaleza y el procedimiento de esta investigación, así como los posibles riesgos de su participación. Todos los protocolos aquí seguidos se encuentran adheridos a los principios de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el *Comité Ético de la Universidade de Santiago de Compostela* y el *Comité Autónomo de Ética da Investigación de Galicia* de la *Consellería de Sanidade de la Xunta de Galicia*.

Como criterios de inclusión generales, todos los sujetos eran mayores de 18 años, de raza caucásica y residentes en el área geográfica de Galicia. Los sujetos eran excluidos si tenían un historial médico de enfermedades conjuntivales, esclerales o corneales, operaciones oculares previas (incluyendo las de carácter refractivo, trasplantes o tatuajes palpebrales), glaucoma, eran mujeres embarazadas o en fase de lactancia, o tenían enfermedades inflamatorias o autoinmunes [24, 60, 215, 216]. Criterios de inclusión o exclusión adicionales a los de carácter general son pormenorizados en cada uno de los estudios.

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el software PS Power and Sample Size Calculations Versión 3.1.2 (Copyright © by William D. Dupont and Walton D. Plummer, <http://biostat.mc.vanderbilt.edu/PowerSampleSize>) [217, 218] considerando un error Tipo I o $\alpha = 0,05$ y un error Tipo II o $\beta = 0,20$, con lo que se obtiene una potencia de $(1-\beta = 0,80)$ del 80%, típicamente utilizado en investigaciones clínicas. Por ser uno de los principales mecanismos centrales para el diagnóstico del SOS, y el principal test estudiado en el presente trabajo de investigación, para definir el tamaño muestral se atendiendo principalmente a la capacidad de encontrar diferencias significativas en los valores de estabilidad lagrimal. Mediante la revisión bibliográfica, se estableció para este cálculo que los valores de TBUT varían de media \pm Desviación Estándar de $10,83 \pm 6,31$ segundos en pacientes sanos [39, 43, 50, 73, 74, 127, 158, 219-225] a $4,32 \pm 1,66$ para pacientes patológicos [39, 43, 50, 73, 74, 127, 158, 219-222, 224-227]. A su vez, se considera que la variación entre evaluadores y el cambio clínicamente significativo va de 2,5 a 8 segundos [39, 50, 228]. Tomando los criterios más estrictos (un cambio clínicamente significativo de $\delta = 2,5$ y una Desviación Estándar media de $\sigma = 6,31$), el tamaño muestral mínimo necesario para realizar conclusiones estadísticamente validas es de 104 sujetos.

Para el presente trabajo fueron reclutados un total de 266 pacientes (153 mujeres y 113 hombres), con una edad de $30,6 \pm 14,94$ años (edades comprendidas entre 18 y 65 años). Con esta selección superamos el tamaño muestral mínimo que recomienda la aplicación estadística, así como el tamaño muestral utilizado en muchos artículos de investigación en ojo seco [31, 35, 39, 43, 48, 49, 58, 74, 77, 97, 158, 219-221, 226, 227, 229-237]. Es importante mencionar, que los pacientes fueron divididos en diferentes grupos dependiendo del protocolo realizado, y que en todos ellos se trató de superar a su vez este valor mínimo muestral¹⁰. La descripción de las características y tamaño de la muestra utilizada vienen indicados en la explicación de cada protocolo.

¹⁰Debido a la dificultad en la obtención de voluntarios, existe una excepción a esta norma en el estudio de variaciones diurnas en sujetos sanos.

3.2 MATERIAL: PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

En esta sección se proporcionan los detalles de la realización de cada una de las técnicas y pruebas diagnósticas utilizadas en el presente trabajo, independiente del protocolo para el que fuera aplicado. En todos los casos, estos procedimientos fueron seguidos según los estándares recomendamos por la literatura.

3.2.1 Cuestionarios de síntomas

Los cuestionarios fueron utilizados para el análisis del estado sintomático de los pacientes. Con la meta de obtener datos comparables entre sesiones, los cuestionarios seguían el modelo de entrevista estandarizada[238, 239]: se mantenían atributos constantes en cada sesión, especialmente en el orden de las preguntas, siendo leídas tal y como son presentadas en los propios cuestionarios; las interacciones adicionales eran reducidas, con comportamientos lo más neutros posibles ante las respuestas y la omisión de opiniones personales; las aclaraciones solicitadas eran lo más escuetas posibles, ciñéndose a repeticiones o aclaraciones centradas en la propia pregunta. Las respuestas dadas por el paciente anotado para la posterior evaluación numérica.

3.2.1.2 Ocular Surface Disease Index (OSDI)

El cuestionario OSDI (Allergan, Inc. Irvine, CA, USA)[1, 23, 26, 27, 164] (Anexo 2) fue utilizado para cuantificar el impacto en la calidad de vida de los síntomas visuales relacionados con el SOS. La puntuación del cuestionario fue calculada siguiendo la guía que provee la propia empresa mediante la fórmula previamente citada en la sección “2.3.1.1 Ocular Surface Disease Index (OSDI)” [23, 26, 164]. Dependiendo del estudio, este cuestionario fue utilizado como: criterio de inclusión con un valor de corte de una puntuación de 13[1, 23-27], puntuación para crear diferentes clusters a nivel de clasificación de gravedad [1, 23-27], o utilizando el propio valor resultante como dato numérico estadístico. El uso del OSDI en cada estudio viene definido en la explicación de cada protocolo.

3.2.1.2 Cuestionario McMonnies

El cuestionario de McMonnies [1, 28-31] (Anexo 3) es un cuestionario específico de ojo seco utilizado para determinar el número, tipo y frecuencia de los síntomas de sequedad. Al contrario que en el caso del OSDI, el McMonnies fue únicamente utilizado en estudios como criterio de inclusión asumiendo un valor de corte de 10[1, 28-31] o como mero dato descriptivo de la muestra. Ningún tipo de estadística ha sido realizada dependiente de sus resultados.

3.2.2 Valoración de la estabilidad de la película lagrimal

Por tratarse de uno de los mecanismos centrales en el diagnóstico del SOS, el análisis de los parámetros de estabilidad lagrimal fue ampliamente estudiado en el presente trabajo. La grabación de la estabilidad lagrimal se realizó mediante un protocolo clásicamente utilizado para la medición de TBUT de manera digital. Posteriormente, estos videos fueron analizados de diferentes maneras para obtener los diferentes parámetros o la aplicación de diferentes sistemas de evaluación dependiendo del estudio realizado.

3.2.2.1 Video-captura de la película lagrimal

Mediante una micropipeta se instilo un volumen de 2 μ l de fluoresceína sódica al 2% sin conservantes en la conjuntiva temporal bulbar inferior [32-36]. Se instruyó al paciente para que parpadeara tres o cuatro veces de forma natural, sin apretar, para ayudar a la distribución de la fluoresceína por toda la superficie ocular. Pasados 30 segundos tras la instilación, el ojo fue observado a través de una lámpara de hendidura Topcon SL-D4 bajo x200 aumentos (objetivo x16, ocular x12.5) usando un filtro amarillo Wratten 12 y azul cobalto[32-35, 200]. Se le pidió al paciente que parpadeara tres veces, y que luego mantuviese el ojo abierto todo el tiempo que fuera posible [36, 74, 75].

Durante todo este proceso, la película lagrimal fue grabada a través de una cámara digital Topcon DV-3 integrada en la propia lámpara de hendidura y conectada a un ordenador. Este proceso fue repetido tres veces por paciente independiente del estudio.

El proceso de grabación se realizó en el sistema operativo Linux, mediante un software llamado FWcapture (Figura 3.1), especialmente diseñado para este protocolo por un grupo de Ingeniería Informática (VARPA, Universidad de A Coruña)[36]. Este programa se encuentra escrito en C++, con una interface gráfica creada en Qt4, usando la librería libdc1394 (<http://damien.douxchamps.net/ieee1394/libdc1394/>) para la captura de video y OpenCV para su manipulación.

Adicionalmente a este software, se utilizó el programa público Coriander (GNU General Public License versión 2.0 [GPLv2]; <http://damien.douxchamps.net/ieee1394/coriander/>) (Figura 3.2) para seleccionar los parámetros de grabación que permitiesen la visualización de la película lagrimal de la manera más clara y nítida posible.

Figura 3.1. FWcapture. A) Pantalla principal de grabación; B) Ejemplo de grabación

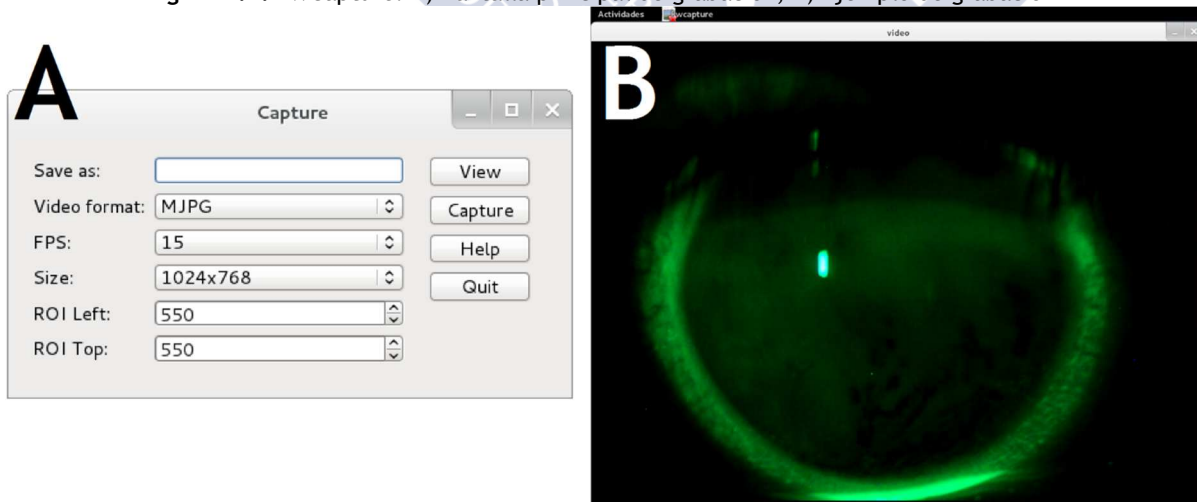
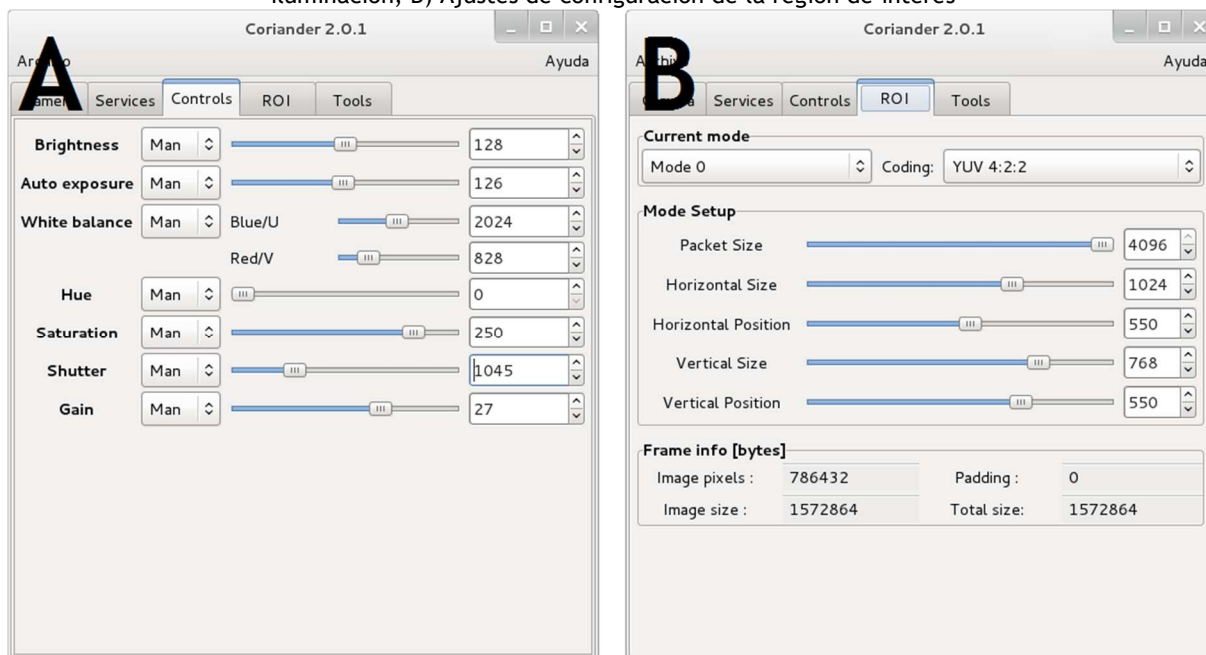


Figura 3.2. Programa Coriander utilizado para los ajustes de imagen. A) Ajustes de configuración para la iluminación; B) Ajustes de configuración de la región de interés



3.2.2.2 Determinación del tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) y del intervalo máximo de parpadeo (MBI)

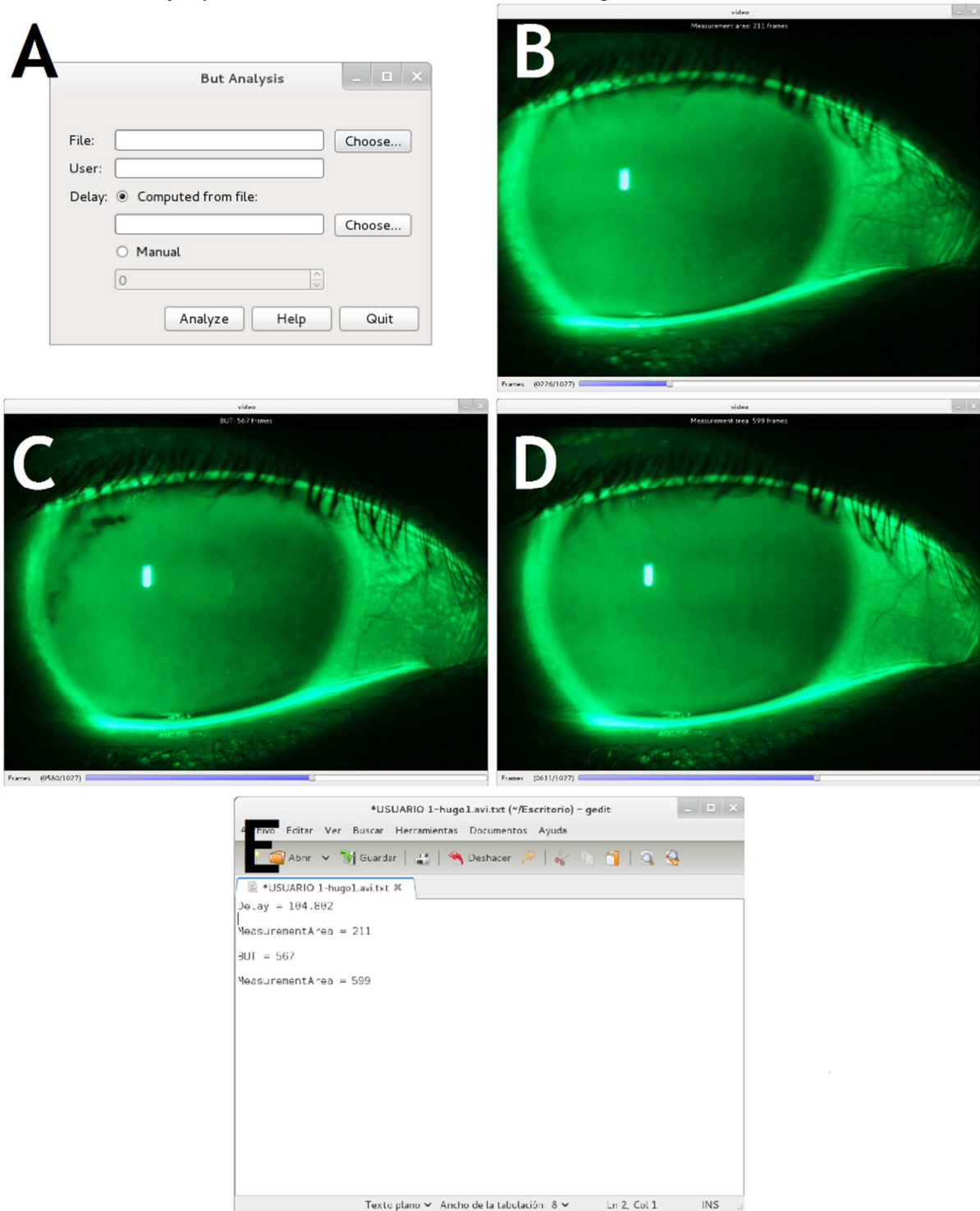
El tiempo de ruptura lagrimal (TBUT)¹¹ [1, 6-8, 32-41, 71, 72, 74, 75], definido como el tiempo desde que el paciente finaliza el último parpadeo hasta la primera aparición de la ruptura de la película lagrimal en forma punto/raya negra, fue medido en las grabaciones. Así mismo, también fue medido el tiempo máximo que el paciente era capaz de mantener ambos parpados abiertos, o intervalo máximo de parpadeo (MBI)¹², antes de realizar el cierre provocado por el reflejo palpebral [36, 74, 75].

Ambos parámetros fueron determinados contando los fotogramas del video (y no los segundos) con el objetivo de aumentar la resolución temporal de los resultados. Al igual que el proceso de grabación, este proceso fue realizado en el sistema operativo Linux, mediante un programa específicamente diseñado para este proceso llamado BUTAnalysis (Figura 3.3a). Al igual que el FWCAapture, este programa está escrito en C++ y utiliza la librería OpenCV para la manipulación de video. Este software permite durante el visionado del video pulsar una tecla [espacio] (Figura 3.3b) y marcar el punto de inicio de la medida tras el final del último parpadeo. Seguidamente, la tecla B marcará el punto en que se produce la ruptura de la película lagrimal (delimitando el valor de TBUT) (Figura 3.3c), y pulsando nuevamente espacio con el parpadeo reflejo delimitamos el área total de medida (delimitando el valor de MBI) (Figura 3.3d). Los resultados de este proceso son suministrados posteriormente en un archivo de texto donde figuran los fotogramas de cada marca (Figura 3.3e). Estos fotogramas fueron posteriormente convertidos en segundos para el tratamiento estadístico y la presentación de resultados (15 fotogramas = 1 segundo).

¹¹TBUT: Tear Break-Up Time.

¹²MBI: Maximum Blink Interval.

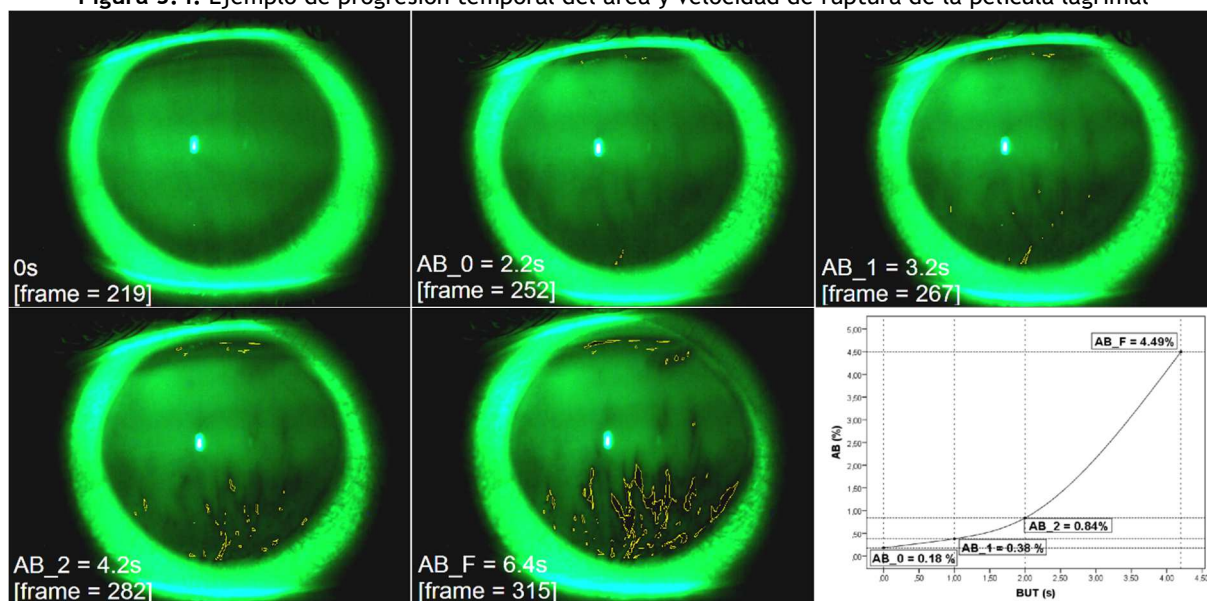
Figura 3.3. BUTAnalysis. A) Ventana principal; B) Principio de medida [Tecla de espacio]; C) Ruptura de la película lagrimal o TBUT [Tecla B]; D) Último fotograma previo al parpadeo o MBI [Tecla de espacio]; E) Ejemplo de un archivo de texto indicando los fotogramas de las tres marcas



3.2.2.3 Medida del área (*Area of break*, AB) y velocidad (*Speed of break*, SB) de ruptura de la película lagrimal

Para realizar la medida del área y velocidad de ruptura lagrimal (AB y BS respectivamente), se realizó la toma de 4 fotogramas diferentes en cada uno de los videos de estabilidad lagrimal grabados [240]. Como se hizo previamente con el TBUT, mediante el uso del programa BUTAnalysis (Figura 3.3), se seleccionó el fotograma en el que se producía la ruptura lagrimal (llamado AB_0). A continuación, se seleccionaron los fotogramas correspondientes a 1 y 2 segundos tras la ruptura adelantando el video 15 (AB_1) y 30 (AB_2) fotogramas respectivamente desde AB_0. El cuarto fotograma seleccionado fue el último fotograma previo al parpadeo (AB_F) (Figura 3.4).

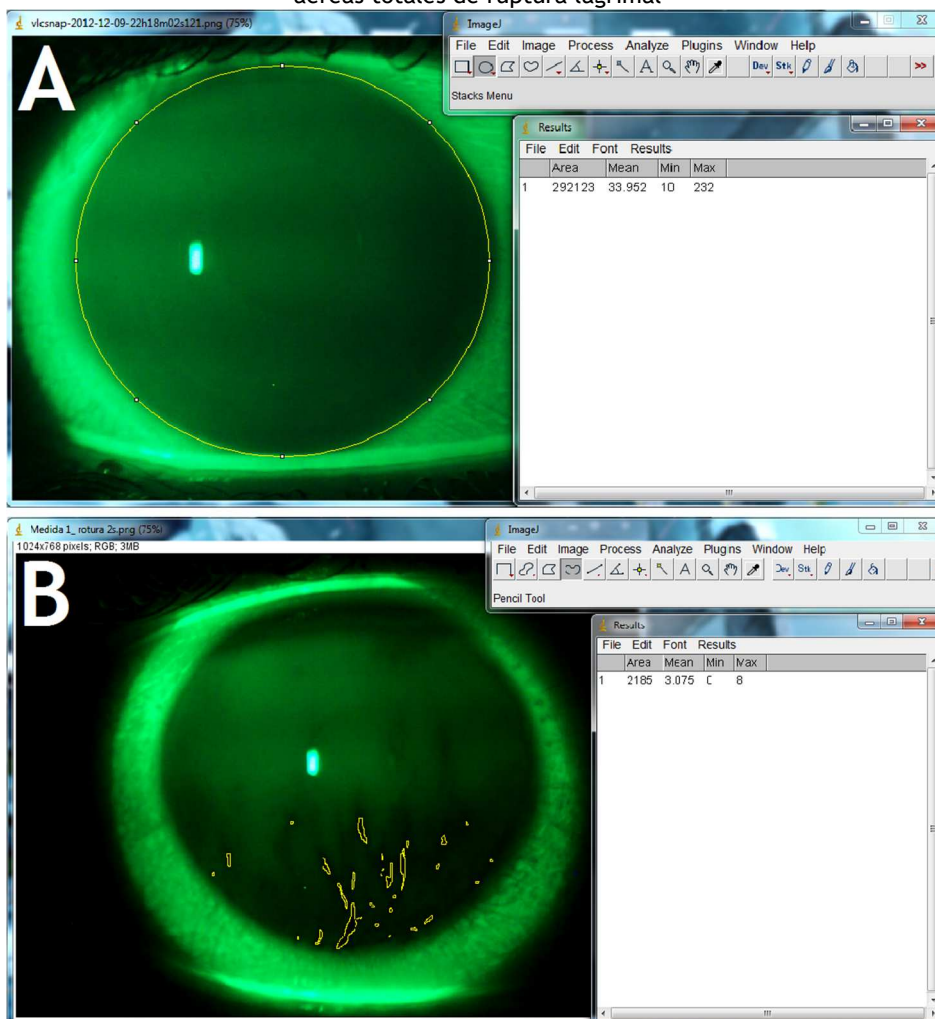
Figura 3.4. Ejemplo de progresión temporal del área y velocidad de ruptura de la película lagrimal



La medida del área total de córnea expuesta y de las áreas de ruptura se realizó utilizando el programa ImageJ v1.49 (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>) [24, 101, 241], software gratuito de código abierto basado en Java. El área de córnea expuesta fue marcada con la herramienta “*Oval*”, que permite seleccionar un área circular o elíptica de tamaño libre. Luego, con la herramienta “*Selection Brush*”, las áreas no deseadas, como la que queda tapada por el parpado superior, fueron eliminadas y el área total de córnea expuesta obtenida por el comando “*Analyse > Measure*”, o presionando la tecla M (Figura 3.5a). Las áreas de ruptura lagrimal fueron seleccionadas una a una usando la herramienta “*FreeHand*” que permite marcar un área de tamaño y forma libre. Al igual que en la selección del área de córnea expuesta, se utilizó la herramienta “*Selection Brush*” para eliminar zonas no deseadas o incorrectamente seleccionadas (Figura 3.5b).

El software empleado nos da también el valor máximo y mínimo de intensidad de pixel en las áreas seleccionadas que va desde el valor 0 (negro) al blanco (255). Si estos valores eran mayores de 10, eran descartados para estar seguros que únicamente se estaba midiendo áreas de ruptura lagrimal que dejaban expuesta la superficie corneal y no adelgazamiento de la película lagrimal [104].

Figura 3.5. Ejemplo de medida de áreas de ruptura con el ImageJ. A) Área total de córnea expuesta; B) áreas totales de ruptura lagrimal



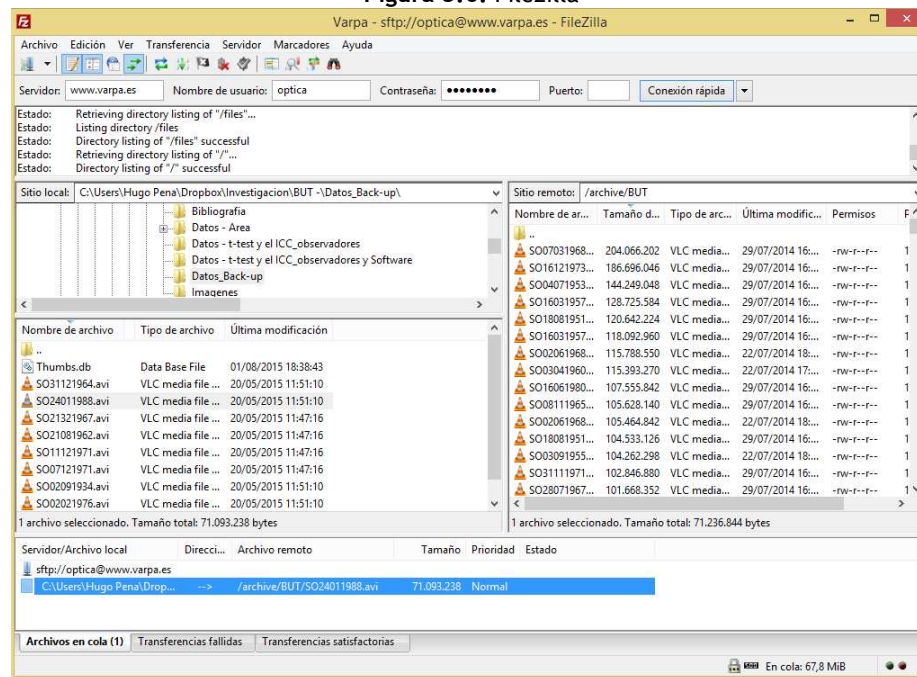
3.2.2.4 Medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color

Además de los métodos de medida de TBUT previamente explicados, se siguió un segundo protocolo para calibrar y comparar resultados con un programa de medida automática de TBUT. Los videos utilizados para esta medida seguían los protocolos de grabación previamente explicados en la sección “3.2.2.1 Video-captura de la película lagrimal”, pero difieren en el método de extracción de sus datos y características tanto por los usuarios como por el software de análisis automático.

Previamente a su análisis, los videos fueron cargados mediante el software FileZilla (GNU General Public License; <https://filezilla-project.org/>) para Windows (Figura 3.6) al servidor www.varpa.es mediante protocolos de comunicación cifrados SFTP¹³. De esta manera se creó la base de datos de video sobre la que usuarios y software trabajaban. Todos estos videos fueron enmascarados mediante un código alfanumérico, previa inclusión a la base de datos.

¹³SFTP: Secure File Transfer Protocol.

Figura 3.6. Filezilla



3.2.2.4.1 Procedimiento de medida realizada por clínicos

Una vez guardados en el servidor de Back-up, los videos fueron marcados online por los clínicos mediante la aplicación Web Video Marker (<http://www.varpa.org/videomarker/>) (Figura 3.7) diseñada especialmente para este protocolo. Al igual que en casos anteriores, la aplicación fue desarrollada por el grupo de Ingeniería Informática (VARPA, Universidade de A Coruña) para el marcaje en línea desde cualquier navegador de internet.

Figura 3.7. Web Video Marker

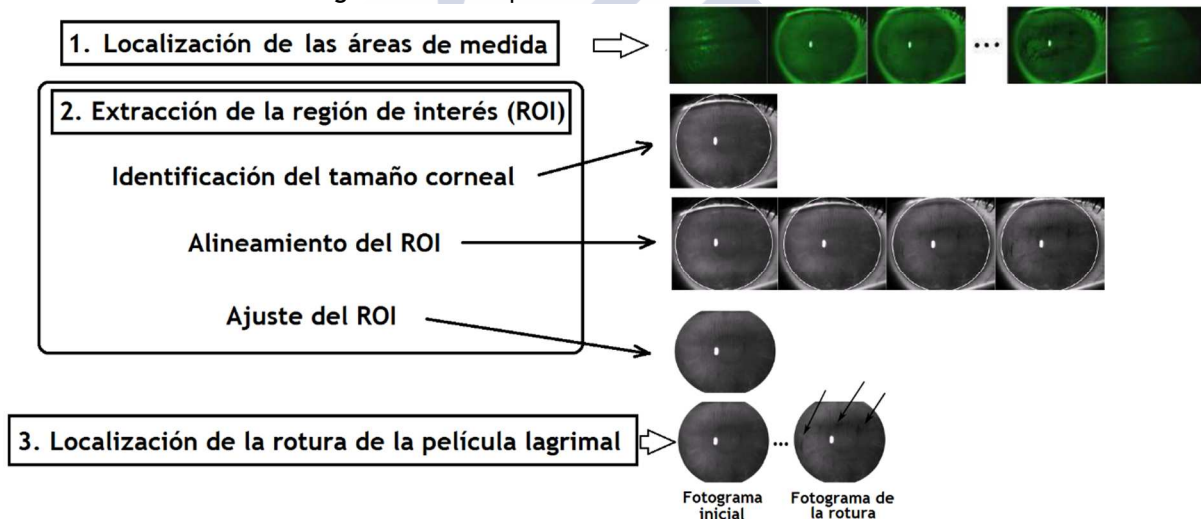


La aplicación permitía poner un video en marcha o detenerlo cuando el usuario deseara mediante el botón de Play/Pause (Figura 3.7, *zona inferior*). Utilizando otros tres botones, se establecía tras el primer parpadeo el inicio de la medida (Figura 3.7, “*Inicio de Área de Medida*”, *zona inferior*), el punto donde se producía la ruptura de la película lagrimal (Figura 3.7, “*BUT*”, *zona inferior*) y el fin del área de medida cuando se producía el siguiente parpadeo (Figura 3.7, “*Fin área*”, *zona inferior*). Estas marcas indicaban el segundo de video en el que se producía cada uno de estos fenómenos (utilizando posteriormente sus diferencias para el cálculo del TBUT). Cada video fue medido una vez (un símbolo de tic indicaba los videos ya medidos, Figura 3.7, *zona derecha*), y los resultados archivados en la base de datos del servidor.

3.2.2.4.2 Bases del software y método de evaluación automática del TBUT

Para este estudio se utilizó un software diseñado para la medida automática del TBUT[228, 242-245]. Esta metodología de medida se realizaba en varios pasos (Figura 3.8): 1) las diferentes áreas de medida de cada video de la película lagrimal eran localizadas automáticamente; 2) la región de interés (ROI)¹⁴ era extraída dentro de cada fotograma, y finalmente 3) se localizaba el fotograma donde se producía la ruptura de la película lagrimal.

Figura 3.8. Pasos para la medida automática del TBUT



1) *Localización de las áreas de medida*: como ya se comentó, cada vídeo contenía diferentes áreas de medida de TBUT que consistían en secuencias delimitadas entre parpadeos consecutivos en las que la ruptura de la película lagrimal podía ser analizada. Así, este paso consistía en detectar los parpadeos para extraer de forma automática todas las áreas de medida y descartar las partes no relevantes de los vídeos. La detección de los parpadeos se basa en el hecho de que cuando el ojo estaba abierto los fotogramas presentaban intensidades altas debido a la parte blanca correspondiente a la esclerótica, mientras que si el ojo estaba cerrado, el párpado ocupaba la totalidad del fotograma, presentando éste intensidades bajas. De este modo, los parpadeos podían ser detectados mediante el análisis de la variación de intensidades entre fotogramas a lo largo de la secuencia. Para detectar estas variaciones, se calculaba la suma de diferencias finitas entre fotogramas consecutivos y cada dos fotogramas:

$$d_i = \Delta_1[f](i) + \Delta_2[f](i) ; \Delta_d[f](i) = f(i + d) - f(i)$$

¹⁴ROI: Region of interest.

Donde $f(i)$ era el valor medio de gris del fotograma i . Posteriormente se calculaba el umbral adaptativo (t_b) a partir de la suma de todas las diferencias a lo largo de la secuencia, descartando los valores mayores que 1, ya que se correspondían con pequeñas variaciones que podrían afectar al resultado.

$$t_b = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}, d_i > 1 \right\}$$

Finalmente, las transiciones de ojo abierto a ojo cerrado y viceversa eran identificadas usando el rango $(-t_b; t_b)$, de modo que los parpadeos están asociados a valores fuera de ese rango mientras que diferencias comprendidas en ese rango se correspondían con las áreas en las que el ojo permanecía abierto.

2) *Extracción de la región de interés (ROI)*: tras localizar las áreas de medida, el siguiente paso era extraer la ROI dentro de cada fotograma para descartar zonas que no contenían información relevante. Para resaltar la ROI se utilizaba un detector de bordes [246] y dado que el iris tiene una forma casi circular, se aplicaban un conjunto de plantillas circulares y elípticas con diferentes radios cubriendo los diferentes posibles tamaños. Se seleccionaban los fotogramas situados en las posiciones 25%, 50% y 75% de cada área de medida y se aplicaba la correlación en el dominio de la frecuencia entre las correspondientes imágenes de bordes y el conjunto de plantillas.

La plantilla que obtenía la correlación más alta era utilizada para definir el tamaño de la ROI a lo largo del área de media. El ojo podía presentar movimientos ligeros a lo largo del vídeo, por lo que las ROIs eran alineadas a lo largo de la secuencia. De este modo, la ROI aparecía siempre en la misma posición en toda el área de medida.

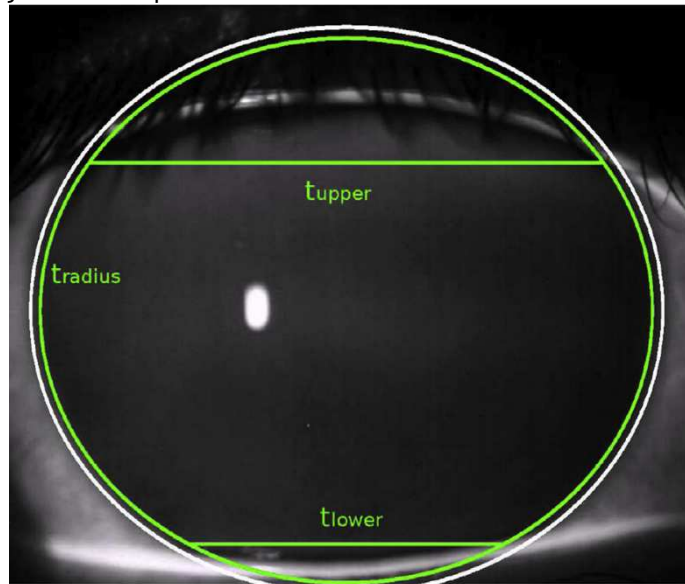
En ocasiones, el grado de apertura del ojo variaba ligeramente a lo largo de la secuencia por lo que la ROI podía contener partes externas como párpados y pestañas que podrían afectar a los resultados. Para descartar estas regiones se lleva a cabo un ajuste adaptativo de la ROI en base a las características del ojo en cada área de medida (Figura 3.9).

Para este ajuste, en primer lugar el radio de la máscara circular era reducido ligeramente lo que permitía eliminar irregularidades y las zonas borrosas asociadas a los bordes del iris. A continuación, se calculaba un límite superior e inferior a partir de la imagen de bordes con el objetivo de recortar la ROI en la parte de arriba y abajo, respectivamente. Esos límites se calculaban a partir del número de píxeles de borde en cada fila i de la mitad superior y la mitad inferior de la imagen, como sigue:

$$Acc(i) = \sum_{j=i}^{cols} edges(i, j)$$

$$l_{upper} = \max\{i, Acc(i) > t_{upper}\} ; l_{lower} = \min\{i, Acc(i) > t_{lower}\}$$

Figura 3.9. Ajuste del ROI para descartar las secciones con información irrelevante [228]¹⁵



Donde $Acc(i)$ era la suma de píxeles de borde en la fila i y t_{upper} y t_{lower} son umbrales obtenidos como un porcentaje del número máximo de píxeles de borde encontrados en cada mitad de la imagen. Debido a la naturaleza del ojo, los párpados superior e inferior invaden la ROI en diferente proporción, por lo que eran usados los parámetros α y β como porcentajes para el cálculo de los límites superior e inferior:

$$t_{upper} = \alpha \max\{Acc(i), 0 \leq i < rows/2\} ; t_{lower} = \beta \max\{Acc(i), rows/2 \leq i < rows\}$$

3) *Localización de la ruptura de la película lagrimal*: el último paso de la metodología consistía en el cálculo del TBUT para cada área de medida, que se obtiene como el tiempo transcurrido desde el inicio de la zona de medida hasta la primera aparición de algún punto negro en la superficie de la córnea. Para detectar la aparición de las zonas asociadas con la ruptura de la película lagrimal, en primer lugar se establecía un umbral de negro t_n de modo que píxeles con intensidades inferiores a ese umbral eran considerados como pertenecientes a regiones con ruptura lagrimal.

Para el cálculo del umbral t_n se seleccionaba el fotograma localizado al final del área de medida, antes del parpadeo final, ya que éste contenía la ruptura lagrimal en su máxima expansión. Sobre este fotograma se aplicaba un algoritmo de segmentación multinivel que utiliza la media y la varianza de la imagen para encontrar umbrales que permitieran segmentar la imagen en múltiples niveles. Este algoritmo partía de un rango inicial que cubre todas las intensidades, es decir de 0 a 255 y calculaba la media μ y la desviación típica σ de todos los píxeles dentro de ese rango. A partir de esos valores, los límites t_1 y t_2 para un nuevo subrango eran calculados como sigue:

$$t_1 = \mu - k\sigma ; t_2 = \mu + k\sigma$$

Donde k era un parámetro libre. Este algoritmo era aplicado recursivamente en los subrangos obtenidos en el paso previo para obtener nuevos subrangos, hasta alcanzar el número de niveles seleccionado. Posteriormente, el umbral de negro t_n se obtenía a partir de

¹⁵Imagen proporcionada por el grupo VARPA (Universidade de A Coruña).

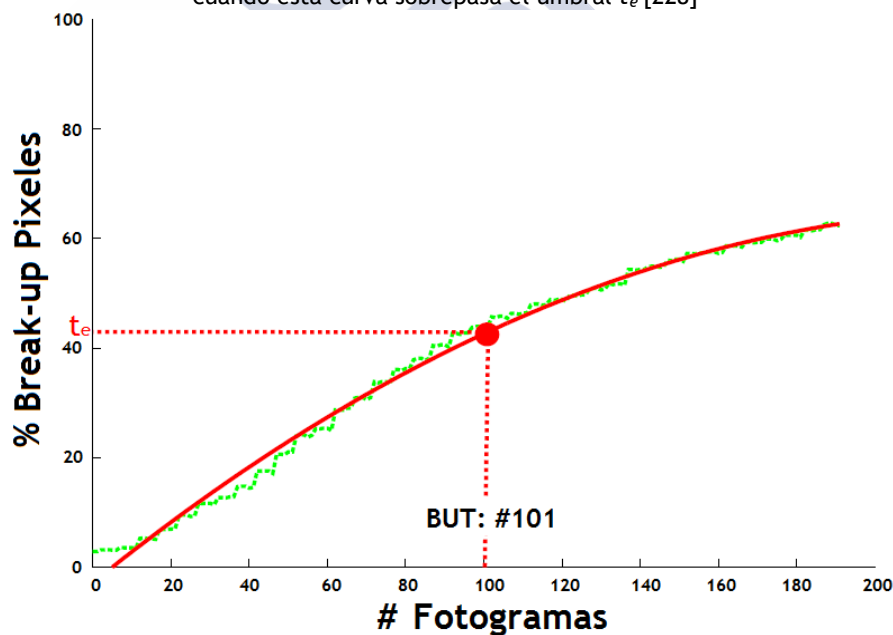
uno de los niveles más bajos de la segmentación multinivel, ya que éstos representaban las zonas más oscuras del fotograma.

Una vez obtenido el umbral de negro t_n se obtenía la curva de evolución de negro a lo largo del área de medida. El porcentaje de píxeles de ruptura en cada fotograma k se obtenía aplicando t_n como sigue:

$$BU_K = \frac{\sum_{i,j} T_k(i,j)}{n_{ROI}} * 100 ; T_k(i,j) = \begin{cases} 1 & \text{si } k(i,j) < t_n \\ 0 & \text{en otros caso} \end{cases}$$

Donde n_{ROI} es el número de píxeles de la ROI. De este modo el TBUT puede ser obtenido mediante el análisis de la curva de evolución de negro. En algunos casos el gradiente de la curva era cero porque no se produce ruptura de la película lagrimal en el área de medida. Sin embargo, cuando se producía ruptura el porcentaje de negro se iba incrementando a lo largo del tiempo ya que la fluoresceína no se vuelve a regenerar. El TBUT se obtenía como el tiempo transcurrido desde el parpadeo que marcaba el principio del área de medida hasta que la curva de evolución sobrepasaba un umbral t_e , obtenido a partir de un porcentaje de la altura máxima de la curva (Figura 3.10). El fotograma asociado a ese instante de tiempo representaba el primer fotograma con ruptura de la película lagrimal.

Figura 3.10. Curvas de evolución (línea punteada verde) y función del polinomio de segundo orden (línea sólida roja). El área negra se incrementa con el tiempo y el punto en el que la ruptura se produce es detectado cuando esta curva sobrepasa el umbral t_e [228]¹⁶



3.2.3 Valoración del menisco lagrimal

Al igual que en el caso previo, el menisco lagrimal fue grabado digitalmente para extraer y evaluar a posterior el valor de TMH y el Grado Subjetivo del menisco lagrimal.

3.2.3.1 Adquisición de video y selección de imágenes

Para la medida del menisco se utilizaron dos métodos de visualización diferentes: la iluminación de la lámpara de hendidura y la entrada por el TearscopeTM Plus (Keeler, Windsor, UK) [166, 170-172]. En todos los sujetos, el orden seguido fue el mismo, primero

¹⁶Imagen proporcionada por el grupo VARPA (Universidade de A Coruña).

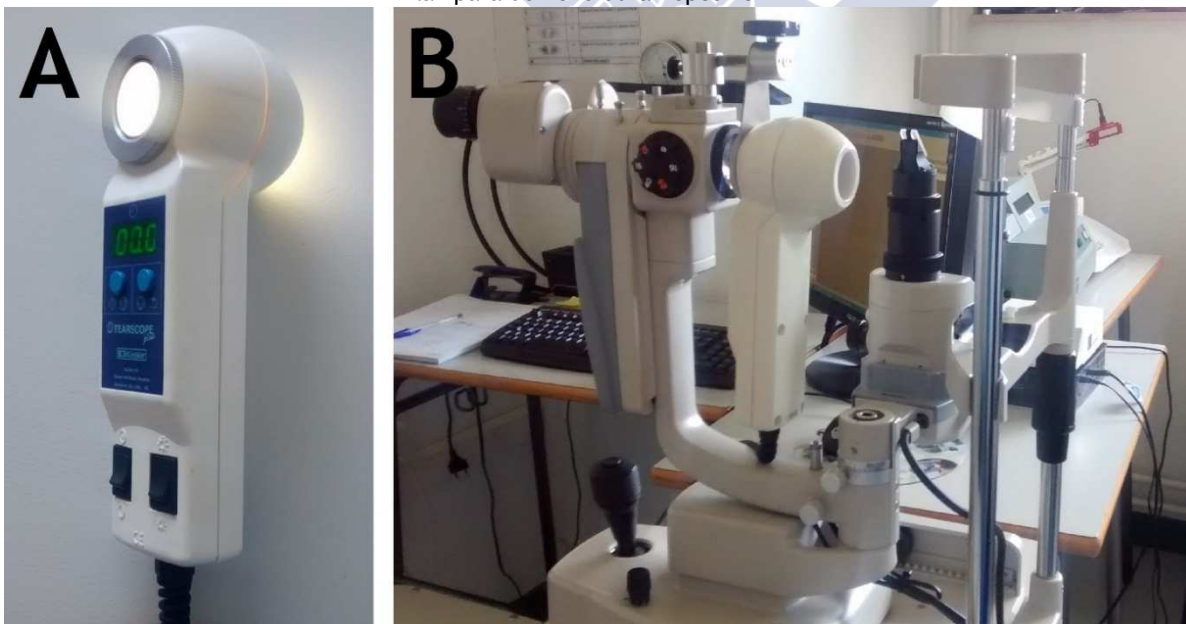
con la lámpara de hendidura, y aproximadamente diez minutos más tarde con el Tearscope. Este orden fue establecido por la baja invasividad provocada por el método de medida utilizado con la lámpara de hendidura[24, 57, 58].

En ambos casos, con el sujeto colocado en la mentonera y la vista fija en posición primaria, el menisco lagrimal inferior era observado con parpadeo normal (sin apretar) a través de una lámpara de hendidura Topcon SL-D4 bajo x500 aumentos (objetivo x40, ocular x12.5). Durante este proceso, el menisco era grabado a través de una cámara digital Topcon DV-3 unida a la propia lámpara de hendidura y guardada en un ordenador a través del programa Topcon IMAGEnet i-base en espacio RGB de color y resolución 1024x768.

1) *Menisco observado mediante la iluminación de la lámpara de hendidura:* tomando como base de grabación las características anteriores, el menisco fue observado utilizando únicamente la propia iluminación proporcionada por la lámpara de hendidura. Para evitar la aparición de lagrimeo reflejo provocado por iluminar de manera directa la pupila, se utilizó una franja pequeña de iluminación moderada de 3 mm de ancho y 5 mm de alto [24, 57]. Debido a la irregularidad a que la altura del menisco varía lo largo de la longitud del párpado[57, 215], fue grabado únicamente el menisco central en la posición de las 6 en punto [24, 57, 58], tomando como referencia el centro pupilar y con el sistema de iluminación situado a 0°[24, 57, 215].

2) *Menisco observado mediante Tearscope:* tomando como base de grabación las características anteriores, se realizó la grabación del menisco lagrimal a través de Tearscope (Figura 3.11a) acoplado a la lámpara de hendidura (Figura 3.11b). En todo momento este dispositivo se mantuvo a distancia constante de la mentonera y con la iluminación de la lámpara de hendidura apagada. El Tearscope permite elegir entre dos tipos de intensidad lumínica diferentes; en todo el proceso se utilizó la más brillante de ambas (la de menor intensidad comprometía la visualización definida del menisco).

Figura 3.11. Tearscope™ Plus (Keeler, Windsor, UK). A) Tearscope; B) Dispositivo Tearscope acoplado a la lámpara de hendidura Topcon SL-D4



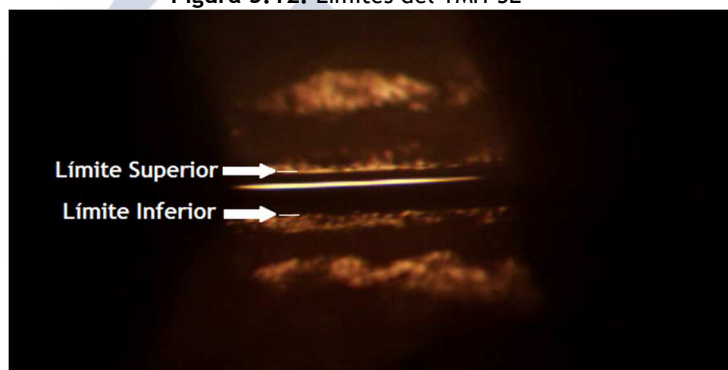
Los parámetros del menisco lagrimal se obtuvieron de imágenes extraídas de los videos, siendo por tanto dos por paciente: una con la iluminación de lámpara de hendidura y otra con iluminación del Tearscope. En ambos casos, la imagen seleccionada seguía los mismos criterios para minimizar la variación entre parpadeos: después del parpadeo, la evolución del menisco era observada, y cuando se encontraba completamente extendido y estable con mínimos cambios, la imagen era extraída (2-3 segundos tras el parpadeo) [24, 59, 79, 215].

3.2.3.2 Evaluación de la altura del menisco lagrimal

Una vez extraídas, las imágenes en ambas técnicas para la captura del menisco lagrimal inferior central se midieron usando software de asistencia siguiendo los siguientes criterios[24, 57, 241]:

1) *Iluminación con lámpara de hendidura*: el menisco lagrimal central con lámpara de hendidura (TMH-SL)¹⁷, fue tomado como la distancia entre el límite oscuro del borde superior del párpado inferior y el límite superior del menisco lagrimal. Fue medido siempre en el centro del área iluminada, y hasta la parte superior del reflejo blanco central del menisco (Figura 3.12).

Figura 3.12. Límites del TMH-SL



2) *Iluminación con Tearscope*: el menisco lagrimal central mediante Tearscope (TMH-Tc)¹⁸, fue tomado como la distancia entre el límite oscuro del borde superior del párpado inferior y el límite superior del menisco lagrimal. Fue medido siempre en el centro del área iluminada hasta la parte superior del área blanca central del menisco (Figura 3.13).

Figura 3.13. Límites del TMH-Tc



¹⁷TMH-SL: Tear Meniscus Height thought Slit-lamp.

¹⁸TMH-Tc: Tear Meniscus Height thought Tearscope.

Para realizar esta medida, se utilizó el software ImageJ v1.49 (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://imagej.nih.gov/ij/>)[24, 101, 241], de carácter gratuito y código abierto basado en Java. Con la herramienta “*straight*”, que permite al usuario crear una línea de posición y tamaño libre, el menisco fue medido siguiendo los límites previamente descritos (Figura 3.14a y Figura 3.14b). Luego, mediante el comando “*Analyse > Measure*”, o presionando la tecla M, el programa nos proporciona el valor de la longitud de esta línea en pixeles (Figuras Figura 3.14a y Figura 3.14b, *zona inferior derecha*).



Previamente a la toma de medidas de menisco, se realizó la grabación y medida con el mismo protocolo de una regla en milímetros, resolviendo que un milímetro real equivalía a 300px en las imágenes. Este dato pre-estudio fue utilizado para realizar las futuras conversiones y medidas estadísticas del menisco.

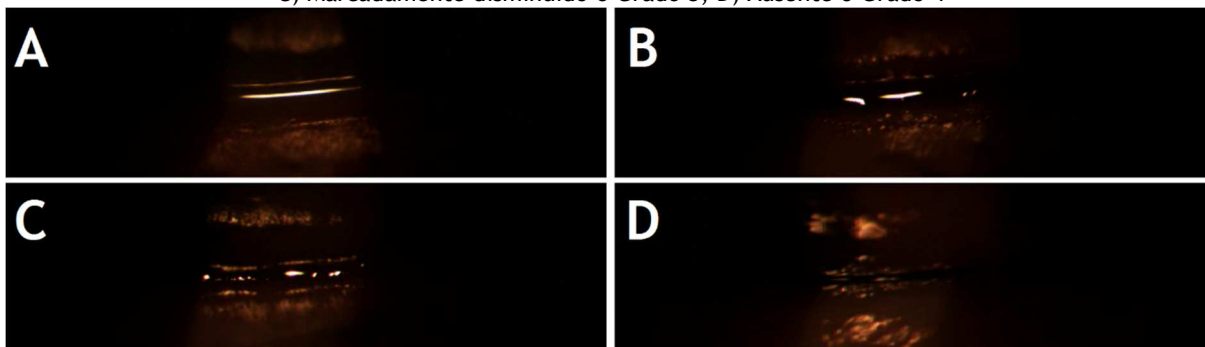
3.2.3.3 Evaluación del Grado Subjetiva del menisco lagrimal

Posteriormente al cálculo del menisco, y de menara enmascara al valor de altura, se dio un valor subjetivo de regularidad o el aspecto del menisco lagrimal en la imágenes extraídas. Siguiendo indicaciones de la literatura[24, 57, 179], este valor se dio acorde a la Tabla 3.1, representada gráficamente en la Figura 3.15, asumiendo que los grados 1 y 2 representan meniscos sanos o normales mientras los grados 3 y 4 representan meniscos patológicos o anormales. Como indica la literatura, esta evaluación se realizó en las imágenes extraídas de las grabaciones mediante la iluminación con lámpara de hendidura, por tanto, es importante mencionar que esta regularidad era en referencia a la pequeña franja de luz utilizada en dicho protocolo para evitar el lagrimeo reflejo (3 mm de ancho y 5 mm de alto, Figura 3.12; Figura 3.15).

Tabla 3.1. Clasificación subjetiva del menisco lagrimal propuesta por Khurana et al. [179], y modificada por Garcia-Resua et al. [57]. Grados 1 y 2 representan meniscos sanos, mientras que los grados 3 y 4 representan meniscos anormales

Grado	Grupo	Descripción	Gravedad
1	Intacto	Menisco de altura variable con una forma regular. Ausencia de debris.	Sanos o normales
2	Ligeramente disminuido	Un menisco regular pero menos visible que el grado anterior. Ausencia de debris	
3	Marcadamente disminuido o discontinuo	Marcadamente disminuido o de forma discontinua/irregular. Presencia de debris.	Patológicos o anormales
4	Ausente	Menisco invisible	

Figura 3.15. Clasificación subjetiva del menisco. A) Intacto o Grado 1; B) Ligeramente disminuido o Grado 2; C) Marcadamente disminuido o Grado 3; D) Ausente o Grado 4



3.2.4 Valoración de la osmolaridad lagrimal

Para la medida de la osmolaridad/osmolalidad, se utilizaron dos aparatos diferentes: el Osmómetro Fiske 110 (un osmómetro de laboratorio basado en el descenso del punto de congelación) y el Osmómetro TearLab (osmómetro específico para la medida de la osmolaridad lagrimal basado en el principio de conductividad eléctrica).

3.2.4.1 Técnica basada en la medida del descenso del punto de congelación (Fiske 110)

El osmómetro Fiske 110 (Advanced Instruments Inc., Norwood, MA, USA) (Figura 3.16) basado en el descenso del punto de congelación (similar al osmómetro de referencia Clifton y al 3100 Tear Osmometer, Figura 2.10), fue utilizado para la medida de osmolalidad tanto lagrimal como de ciertas soluciones de mantenimiento de lentes de contacto o estándar. Este osmómetro provee sus resultados en milliosmoles por kilo (mOsm/kg, Osmolalidad), con un rango de medida entre 0 y 2000 mOsm/kg H₂O. En todas las medidas, se siguió el procedimiento indicado por el fabricante: la muestra se introduce en el vial específico o “Probe” (Figura 3.16, zona inferior derecha) para ser depositada dentro del osmómetro; este se cerraba y en aproximadamente 90 segundos el propio aparato nos da la medida. Tras la medida el vial es retirado y desechado, utilizando los “Probe cleaners” (Figura 3.16, zona inferior derecha) para la limpieza del sensor de medida.

Figura 3.16. Osmómetro Fiske 110 (Advanced Instruments Inc., Norwood, MA, USA)

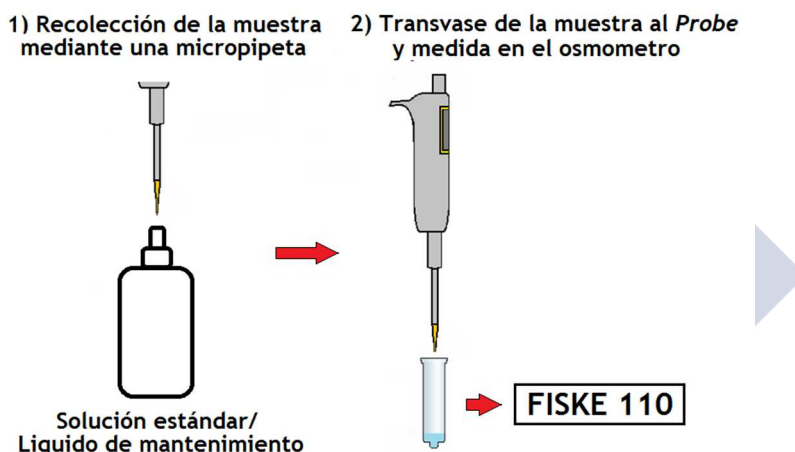


Este osmómetro requiere de una muestra de 20 µl para hacer la medida, lo que obliga a realizar ciertos pasos adicionales en ocasiones donde se dispone de un volumen de muestras menor. A continuación se detallan que protocolos se siguieron para medir cada uno de los compuestos estudiados: 1) protocolo para el análisis en soluciones no diluidas (aplicada en soluciones de mantenimiento y líquidos de mantenimiento de lentes de contacto); 2) protocolo para el análisis en soluciones estándar diluidas (aplicada en soluciones estándar); y finalmente 3) el protocolo para el análisis de la osmolaridad lagrimal.

3.2.4.1.1 Análisis en soluciones estándar no diluidas y líquidos de mantenimiento de lentes de contacto

Un total de 20 µl de la solución estándar de valor conocido fueron cogidos del contenedor de la propia solución mediante el una micropipeta, y medidos en el osmómetro siguiendo las instrucciones del fabricante previamente detalladas (Figura 3.17). Este proceso se repitió 20 veces en cada muestra, siendo el valor medio de estas medidas el considerado como resultado. El procedimiento fue similar en las soluciones de mantenimiento de lentes de contacto, realizándose en este caso únicamente 10 medidas en cada solución.

Figura 3.17. Proceso de recolección, dilución y medida de diluciones con el osmómetro Fiske 110

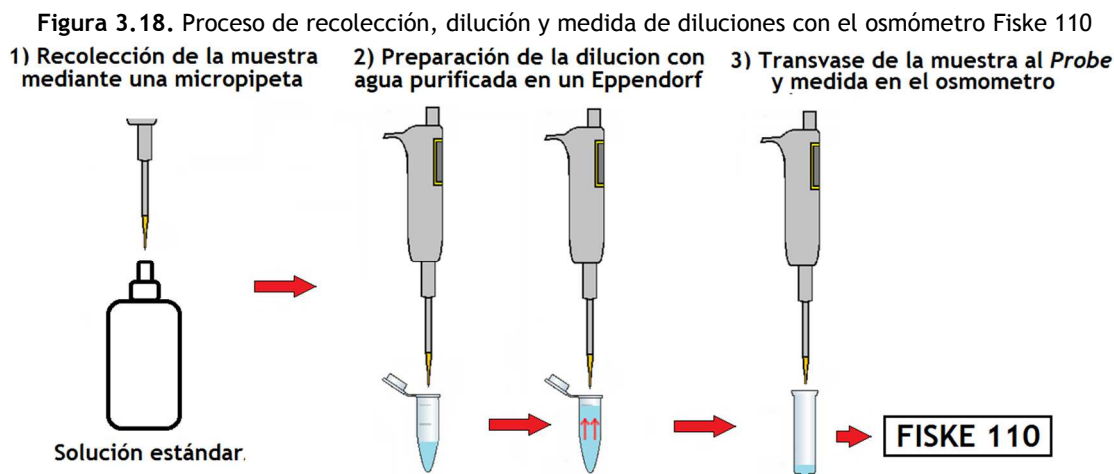


3.2.4.1.2 Análisis en soluciones estándar diluidas

Se preparó un set de muestras diluyendo un volumen de 2, 4 o 10 µl de cada muestra en agua purificada (B. Braun Medical, S.A Rubí, Barcelona) para obtener un volumen de 20 µl, volumen necesario para poder hacer la medida en el Fiske. En todos los casos las diluciones preparadas fueron 1:9, 1:4 y 1:1 (Tabla 3.2). Se realizó cada dilución en un Eppendorf (Eppendorf Ibérica, S.L.) que posteriormente fue vortexeado. Como se hiciera con las muestras sin diluir, se realizó un total de 20 medidas en cada ocasión (Figura 3.18). Los resultados obtenidos para las diluciones 1:9, 1:4 y 1:1 fueron multiplicados por 10, 5 y 2 respectivamente para obtener los valores corregidos de cada muestra.

Tabla 3.2. Diluciones usadas en el osmómetro Fiske 110

Dilución	Volumen de muestra (µl)	Volumen de agua purificada (µl)
1:1	10	10
1:4	4	16
1:9	2	18



3.2.4.1.3 Análisis de la osmolaridad lagrimal en pacientes

Como se comentó, el osmómetro Fiske 110 requiere de un volumen de 20 μl para poder realizar la medida. Debido al bajo volumen lagrimal existente en pacientes, las muestras de lágrima tomadas fueron igualmente diluidas en agua purificada según el mismo procedimiento explicado para la medida de soluciones estándar ligeramente modificado (Figura 3.18; Figura 3.19). Para la recolección de lágrimas del menisco lagrimal inferior, se utilizaron los capilares Microcap (Drummond Scientific Company)[247-249] (Tabla 3.2) de volúmenes de 2 μl y 4 μl , cuyo error es de $\pm 1\%$ [250]. Con el paciente sentado con la vista hacia el techo y la barbilla ligeramente elevada, la lágrima basal fue recogida mediante la acción capilar de la cánula colocada horizontalmente al borde palpebral y con su boca en contacto con el menisco, siempre con cuidado de no tocar la superficie corneal o conjuntival[249]. No se utilizó ningún tipo de anestésico en este proceso[251]. Las muestras de lágrima fueron diluidas utilizando los mismos principios que los usados en diluciones de muestras estándar (Tabla 3.3; Figura 3.19).

Tabla 3.3. Características de los diferentes capilares utilizados (Microcap, Drummond Scientific Company)

Número en el catalogo	Capacidad (μl)	Longitud (mm) [L]	Diámetros (mm)	
			Externo [\varnothing_{ext}]	Interno [\varnothing_{int}]
1-000-0020	2	3,2	0,76	0,28
1-000-0040	4	3,2	0,86	0,40
1-000-0100	10	4,1	0,80	0,56

\varnothing_{ext} [L] \varnothing_{int}

Figura 3.19. Proceso de recolección, dilución y medida de la lágrima con el osmómetro Fiske 110



3.2.4.2 Técnica basada en la medida de impedancia eléctrica (TearLab™)

El osmómetro TearLab (TearLab™ Corp., San Diego, CA, USA) (Figura 3.20a) basado en el principio de conductividad eléctrica fue utilizado para medir la osmolaridad lagrimal en pacientes [24, 52, 65, 69, 78, 97, 152, 182, 186, 187]. Este aparato provee sus resultados en milliosmoles por litro (mOsm/l, osmolaridad), siendo su rango de medida de 275 a 400 mOsm/l. Para comprobar su correcto funcionamiento, el dispositivo viene con un chip de comprobación (con un valor de 334 mOsm/l). Una vez por día, según la guía del producto, el chip era colocado para comprobar que su medida estaba dentro de valores normales (334 ± 4 mOsm/l)¹⁹. Los fabricantes afirman que el instrumento tiene un porcentaje CV (coeficiente de variación) de aproximadamente 1,5% que se traduce en una variación de análisis estándar de ± 5 mOsm/l [52, 69, 188].

Este aparato requiere únicamente de un volumen de 0,05 μ l, siendo su toma *in situ*. Con el paciente sentado con la vista hacia el techo y la barbilla ligeramente elevada, el microchip situado en el cabezal del aparato (de carácter desechable, un solo uso por paciente), es situado tocando el menisco lagrimal inferior, hasta que un pitido nos indica que la muestra ha sido recogida (Figura 3.20b). Posteriormente, el cabezal se colocaba en la base del aparato, y el resultado de osmolaridad se mostraba en su pantalla en aproximadamente 10 segundos (Figura 3.20c).

Figura 3.20. TearLab™ Osmometer. A) Dispositivo en reposo; B) Medida con el cabezal; C) Dispositivo tras la medida

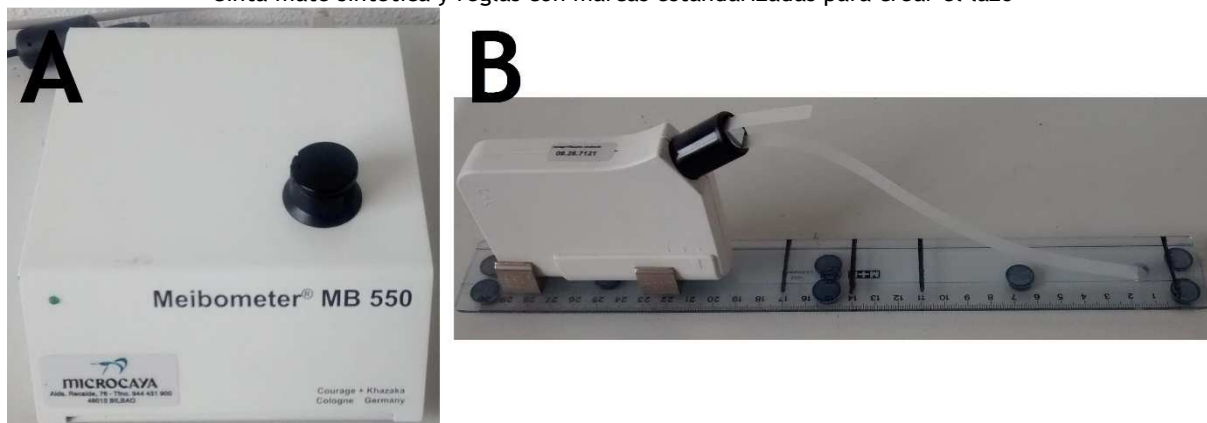


3.2.5 Meibometría (Meibometer 550)

La Meibometría fue llevada a cabo mediante el uso de Meibometer® MB550 (Courage-Khazaka electronic GmbH, 50829, Cologne, Germany) [189, 193-199]. El Meibometer se compone de dos partes: una unidad fotométrica conectada un ordenador (Figura 3.21a), y una cinta mate sintética usada para recoger la muestra de lípido. Esta última, es utilizada siempre en un lazo de medidas estándar para garantizar una forma constante en todas las medidas (17cm de largo y marcas a los 3 y 6cm) (Figura 3.21b).

¹⁹En caso de que el TearLab no se encontrase calibrado, el usuario no se dispone de ningún medio de calibrado, por lo que el aparato debería ser referido a fábrica para el ajuste.

Figura 3.21. Dispositivos para la Meibometría. A) Meibometer® MB550 (Courage-Khazaka electronic GmbH); B) Cinta mate sintética y reglas con marcas estandarizadas para crear el lazo



Con la porción central del párpado inferior del paciente retraído, la cinta era presionada durante 10 segundos en la región central con una fuerza constante y necesaria para provocar la salida de la grasa lipídica de las glándulas (15g, según comunicados personales de Courage-Khazaka)[193-195, 197, 198]. Esta presión provocaba la aparición de una línea de contacto a lo largo del ancho del lazo de cinta. En caso de que el paciente parpadeara, la medida era repetida. Posteriormente, la cinta era secada al aire durante 1 minuto a temperatura de laboratorio para permitir la evaporación del componente acuoso de la película lagrimal.

Tras el proceso de secado, la cinta era insertada y escaneada en la unidad fotométrica, donde una célula fotoeléctrica mide el cambio producido por la transmitancia lumínica mediante el movimiento leve de un lado a otro de la cinta. Las medidas marcaran mayores valores en las zonas donde se encuentre la mayor impregnación de lípido, y valores de cero en aquellas donde este encuentre ausente[196]. Los resultados de esta medida son mostrados en el ordenador en forma de curvas y suministrados en un archivo de Excel en Unidades Meibométricas (UM)[196-199]. En cada cinta, se realizaron un total de 5 curvas, siempre por el mismo investigador para reducir la posible variabilidad de los resultados[198].

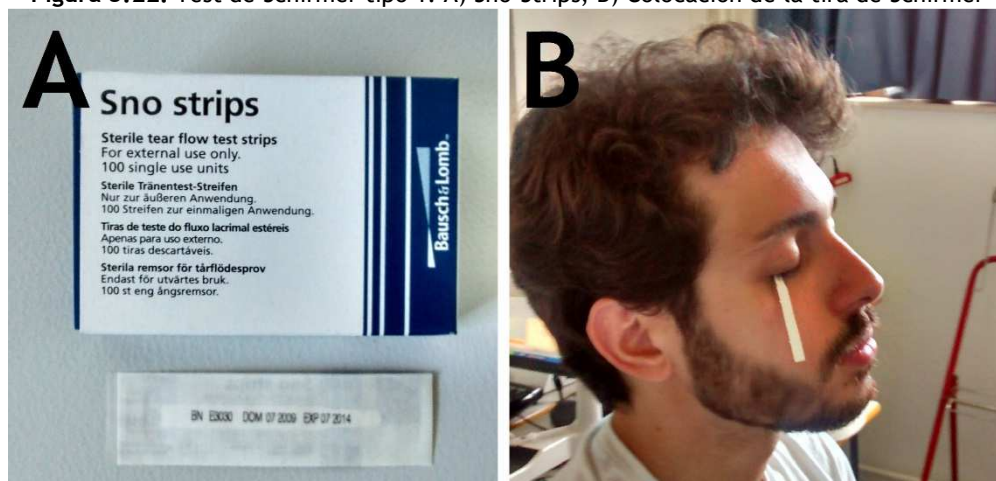
3.2.6 Otros test

En esta sección se incluye la explicación de cómo se realizaron otros test que no se encuentran formando parte de los protocolos principales, pero si han sido usados durante la realización del presente trabajo de tesis, destacándose especialmente como criterios de corte en las inclusiones o pruebas descriptivas de la muestra.

3.2.6.1 Test de Schirmer

El test de Schirmer tipo I (Sno-Strips, Bausch & Lomb Incorporated) (Figura 3.22a) fue realizado sin anestesia según las instrucciones del fabricante [1, 47, 50-52]. Con el extremo de la tira doblado por la muesca indicada en la propia tira, el extremo superior del papel de fieltro fue insertado en el fórnix del tercio externo del párpado inferior, siempre con cuidado de no hacer contacto con la superficie corneal (Figura 3.22b). Pasados 5 minutos, la tira era retirada, y la parte humedecida medida. El criterio de corte diagnóstico utilizado en esta prueba fue de 10 mm (valores inferiores, eran considerados pacientes patológicos) [1, 50-52].

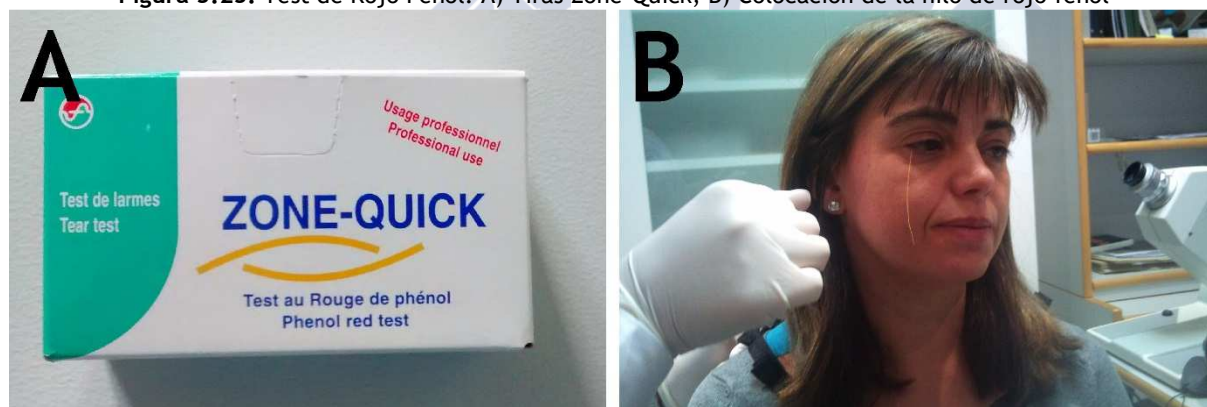
Figura 3.22. Test de Schirmer tipo 1. A) Sno-Strips; B) Colocación de la tira de Schirmer



3.2.6.2 Test de Rojo Fenol

El test de Rojo Fenol (Zone-Quick, Menicon América, Inc.) (Figura 3.23) fue realizado sin anestesia según las instrucciones del fabricante [1, 47-52]. Este test se realiza con un hilo de color amarillo que se vuelve de color rojo cuando entra en contacto con el fluido lagrimal (se trata de un indicador de pH basado en el cambio de color de la fenolftaleína ante soluciones básicas). Con el extremo del hilo ligeramente doblado, el extremo superior del hilo fue insertado en el fórnix inferior del tercio externo del párpado inferior, siempre con cuidado de no hacer contacto con la superficie corneal. Pasados 15 segundos, la tira era retirada, y la parte humedecida era medida. El criterio de corte diagnóstico utilizado en esta prueba fue de 10 mm (valores inferiores, eran considerados pacientes patológicos)[1, 48-52].

Figura 3.23. Test de Rojo Fenol. A) Tiras Zone-Quick; B) Colocación de la hilo de rojo fenol

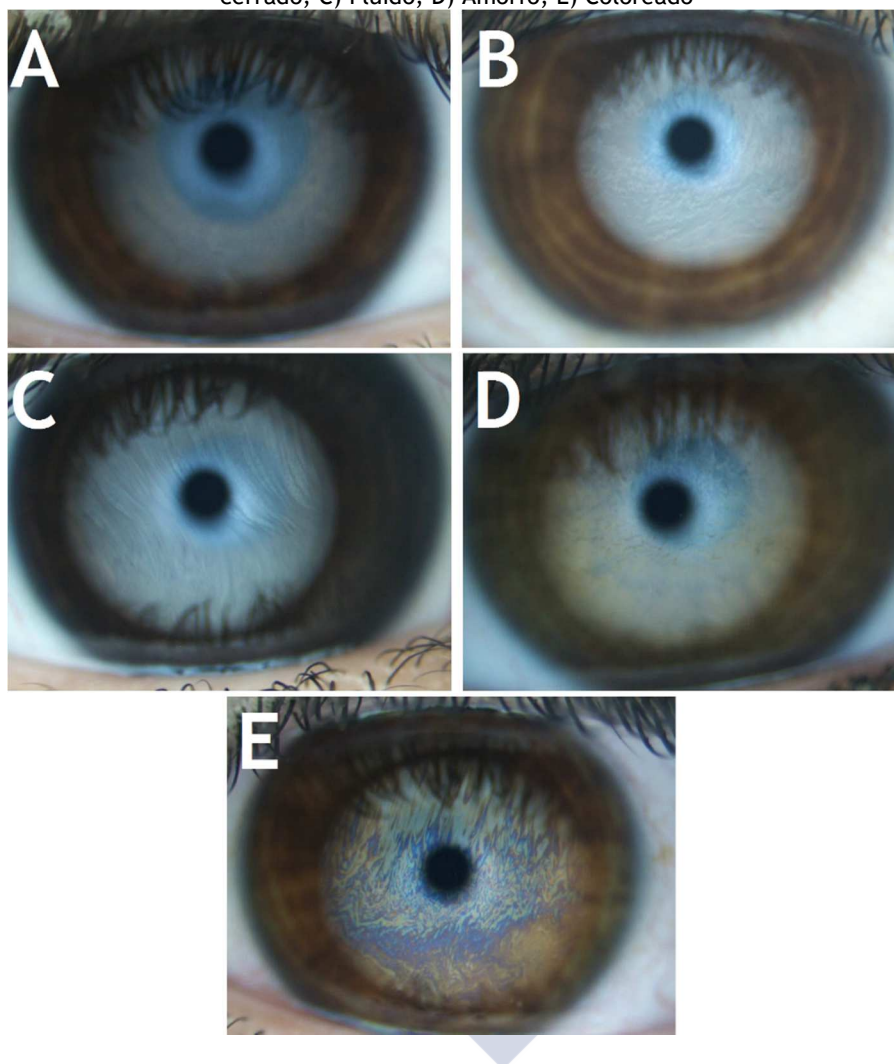


3.2.6.3 Patrones lipídicos interferenciales

La categorización de los patrones lipídicos interferenciales es, al igual que el TBUT, una técnica utilizada para medir la dinámica y estabilidad de la película lagrimal. Para la grabación se utilizó el Tearscope (Figura 3.11a) acoplado a una lámpara de hendidura Topcon SL-D4 a x200 (objetivo x16, ocular x12.5) (Figura 3.11b). Se instruyó al paciente para parpadear normal y mantener su fija en un punto tras el investigador, y a través de una cámara digital Topcon DV-3 integrada en la lámpara de hendidura, el patrón lipídico interferencial era guardado en el ordenador con el programa Topcon IMAGENet i-base en espacio de color RGB y una resolución de 1024x768.

La clasificación de los patrones se realizó en relación al esquema de Guillon [102, 166, 170, 171, 175] (siguiendo un orden de menor a mayor espesor lagrimal) (Figura 3.24): Marmóreo Abierto, Marmóreo Cerrado, Fluido, Amorfo y Coloreado. Esta clasificación fue siempre realizada por evaluadores expertos[170].

Figura 3.24. Clasificación de Guillon para patrones lipídicos interferencias. A) Marmóreo Abierto; B) Marmóreo cerrado; C) Fluido; D) Amorfo; E) Coloreado

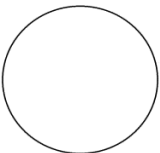
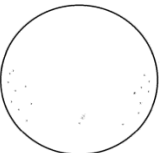
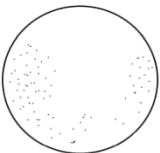

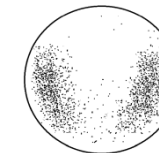



3.2.6.4 Tinciones corneales

El proceso de grabación de las tinciones corneales fue similar al del TBUT. Se instilaron 2 μ l de fluoresceína sódica al 2% sin conservantes en la conjuntiva temporal bulbar inferior con una micropipeta. Tras pedir al paciente que parpadease tres o cuatro veces de forma normal, la superficie ocular fue grabada con el programa FWCapture (Figura 3.1), a través de una lámpara de hendidura Topcon SL-D4 con una videocámara DV-3 integrada bajo x200 (objetivo x16, ocular x12.5) aumentos usando un filtro amarillo Wratten 12 y uno azul cobalto[32-36, 200]. En las ocasiones que fue necesario, el parpado superior fue ligeramente elevado manualmente para permitir la observación total de la superficie corneal [13].

Posteriormente, la severidad de la tinción corneal fue clasificada según el Esquema de clasificación Oxford[13, 200, 210-212]. Este sistema utiliza una escala que va del 0 al 5 para determinar la severidad de la tinción, siendo el 0 ausencia de la misma y el 5 el estado de mayor gravedad (Figura 3.25).

Figura 3.25. Esquema de clasificación Oxford para la gradación de tinciones corneales

Grado	0 (Ausente)	I (Mínimo)	II (Lleve)	III (Moderado)	IV (Marcado)	V (Severo)
Criterio	Ausencia de tinción	Tinción igual o menor que la imagen B	Tinción igual o menor que la imagen C, pero mayor que B	Tinción igual o menor que la imagen D, pero mayor que C	Tinción igual o menor que la imagen D, pero mayor que D	Tinción mayor que E
Panel						

3.2.7 Tratamiento estadístico

Todos los estudios estadísticos fueron realizando con el software SPSS v.19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). La significancia fue fijada en $p \leq 0,05$ para todos los test estadísticos realizados [252]²⁰.

Previamente a la aplicación de test estadísticos, se analizó la distribución de normalidad de los datos para cada variable mediante el test de Kolmogorov–Smirnov: valores en la distribución con una $p > 0,05$ indicaban normalidad, por lo que eran aplicados test paramétricos; valores en la distribución con una $p \leq 0,05$ indicaban una distribución no normal, por lo que eran aplicados test no paramétricos [252]. En todos los estudios fueron dados los estadísticos descriptivos, siendo media y Desviación Estándar (DE) para datos paramétricos y mediana y Rango Intercuartil (IQR)²¹ para no paramétricos, así como máximos y mínimos en todas las situaciones [252].

Las diferencias entre pares de variables fueron analizadas usando un t-test para variables paramétricas y el test de Wilcoxon para variables no paramétrica [252, 253]. Adicionalmente para los t-test, los intervalos del 95% confianza fueron calculados (IC del 95%: Diferencia media $\pm 1.96 \times DE$)[252]. En los casos en los que se estudió la concordancia entre mediciones, se utilizó el *Método de Bland y Altman*, el cual describe la correlación o similitud entre dos variables en un gráfico de los valores medios frente a las diferencias [214, 252, 254]. Las diferencias entre grupos de variables paramétricas fueron analizados usando un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA)²². En los casos donde se detectaron diferencias generales mediante el ANOVA, las diferencias entre pares fueron analizadas con el *post-hoc* de Tukey[252].

Los valores de correlación entre las diferentes variables fueron obtenidos usando la *Correlación de Pearson* para datos paramétricos y la *Rho de Spearman* para datos no paramétricos. En ambos casos, las correlaciones fueron descritas según su valor como inexistentes (0,00 – 0,20), débiles (0,20 – 0,40), moderadas (0,40 – 0,60), sustanciales (0,60 – 0,80), y casi perfectas (0,80 – 1,00)[24, 31, 214, 255].

Para la comparación entre las valoraciones clínicas de diferentes evaluadores, se usó el coeficiente de correlación interclase (ICC)²³, que describe la variaron total entre grupos[256,

²⁰Existen excepciones en los casos donde se utilizaron múltiples comparaciones pareadas, detallado el valor determinado en el propio protocolo.

²¹ IQR: Interquartile range.

²²ANOVA: One-way analysis of variance.

²³ICC: Interclass coefficient.

257]. Para los casos donde se trabajó con variables de carácter categórico, el acuerdo entre evaluadores se calculó mediante el test de *Cohen's kappa* [216, 258]. En ambos casos, el grado de acuerdo descrito como leve (0,00 – 0,20), regular (0,20 – 0,40), moderado (0,40 – 0,60), sustancial (0,60 – 0,80), y perfecto (0,80 – 1,00) [214, 216, 256-258].

3.3 MÉTODO: PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Los dos componentes claves en el buen funcionamiento de la dinámica lagrimal son la estabilidad y el volumen [77-79]. Actualmente, los principales test de en el diagnóstico del SOS, son los que analizan la estabilidad lagrimal [93, 94], por lo que el presente trabajo ahonda primeramente en su análisis, significancia clínica y primeros pasos en la automatización diagnóstica. En segundo lugar, el volumen total de la lágrima se encuentra estrechamente relacionado con el menisco lagrimal [77, 79-81], centrándose la segunda parte de este trabajo en una mayor objetivación y precisión en su medida. Finalmente, se sabe que la osmolaridad se encuentra fuertemente relacionada con los procesos evaporativos de la lágrima [93-95], siendo uno de los mecanismos centrales en la patogénesis del SOS [65, 66, 85]. Pese a que se considera la técnica de descenso del punto de congelación como el “Gold Standard” en su medida, su uso en la clínica está comprometido por el aparataje. La tercera y última parte de este trabajo busca analizar el funcionamiento de un osmómetro de laboratorio aplicado a la clínica.

3.3.1 Estudios de la estabilidad de la película lagrimal

Debido a su importancia clínica, uno de los principales objetivos del presente trabajo fue ahondar en la significancia diagnóstica de la estabilidad lagrimal desde un punto de vista lo más objetivo posible. Para ello, se realizaron tres estudios: 1) un análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video; 2) un análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral; 3) un estudio sobre como el tamaño y la velocidad en el incremento de la ruptura lagrimal se encuentra relacionado con el tiempo de ruptura y la osmolaridad lagrimal; y finalmente 4) un estudio piloto para validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color.

3.3.1.1 Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video

Muchas variables fisiológicas lagrimales oscilan a lo largo del día: la presión intraocular [259], la sensibilidad corneal [260], la topográfica corneal [261], el pH [122], e incluso los síntomas de sequedad lagrimal [163]. Debido a la importancia clínica de las variaciones diurnas de la estabilidad lagrimal, varios trabajos la han estudiado, con resultados contradictorios entre ellos [224, 262-265]. El objetivo de este primer estudio fue analizar la variación de dicha estabilidad mediante un procedimiento optimizado con software, así como la correlación del TBUT y del MBI. Adicionalmente, se utilizó el alto *pool* de videos obtenido para examinar la repetibilidad en la interpretación del TBUT por varios clínicos.

3.3.1.1.1 Población y procedimiento

En este estudio se incluyeron pacientes con un buen entrenamiento e higiene palpebral y hábitos adecuados de cuidado ocular. Previa inclusión, se realizó una batería de test diagnósticos, y los pacientes eran excluidos si fallaban dos de los siguientes seis criterios [1]: un valor de OSDI < 13 [23, 26, 27], un McMonnies < 10 [30, 31], un valor en el Schirmer

tipo 1 y rojo fenol $< 14,5$ mm [1, 50-52], un valor de tinción corneal con un Grado en la Escala Oxford > 1 [1, 200] y una altura de menisco central $\leq 0,20$ mm [54, 56, 266]. En este estudio participaron un total de 26²⁴ pacientes (16 mujeres, 10 hombres), con una edad de $21,6 \pm 3,43$ años (edades comprendidas entre 19 y 30 años).

Distribuidas a lo largo del mismo día, se realizaron tres grabaciones de la película lagrimal siguiendo los procedimientos detallados en la sección “3.2.4.1. Video-captura de la película lagrimal”, en cuatro sesiones (generando 12 videos por paciente): 9:30am, 12:30pm, 3:30pm y 6:30pm. A todos los pacientes se les solicitó que llevaran en pie un mínimo de una hora y un máximo de dos. Todas las medidas se realizaron en el periodo de un mes para evitar los cambios estacionales.

Posteriormente los videos fueron evaluados por los procedimientos explicados en la sección “3.2.2.2. Determinación del tiempo de ruptura lagrimal (TBUT) y del intervalo máximo de parpadeo (MBI)” por tres clínicos. El Clínico 1 fue utilizado como clínico de referencia, mientras que las evaluaciones de los otros dos se utilizaron para el estudio de la repetibilidad en la interpretación.

3.3.1.1.2 Tratamiento estadístico

Tanto las medidas de TBUT como de MBI mostraron una distribución no normal (Kolmogorov-Smirnov test; $p < 0,05$); a pesar de que por tanto se usaron análisis para datos no paramétricos, las medias y DE son mostrados para poder compararlos con otros estudios. Para reducir la variabilidad, ambas variables fueron usadas promediadas de dos maneras diferentes: (1) usando el valor medio de las tres medidas realizadas en cada sesión (3_TBUT and 3_MBI)[36, 39, 50, 267, 268] y (2) usando el valor medio de las dos medidas más similares en cada sesión (2_TBUT and 2_MBI) [36, 39, 50, 267].

Se utilizó un test de Wilcoxon para establecer las diferencias entre los pares de diferentes sesiones del día (9:30am, 12:30pm, 3:30pm y 6:30pm). Para evitar la aparición del error de tipo 1 (falsos positivos) que puede ocurrir cuando se hacen múltiples análisis de comparación, la significancia fue dividida por el número de comparaciones, por lo que se estableció en $p \leq 0,008$.

Las correlaciones entre TBUT y MBI se calcularon mediante la Rho de Spearman. Esta correlación se realizó entre promediado equivalentes (3_TBUT vs. 3_MBI; 2_TBUT vs. 2_MBI).

Se utilizó el ICC para analizar la similitud entre los valores de medida dados por los tres clínicos. La representación gráfica de estas comparaciones se realizó mediante el método de Bland y Altman.

3.3.1.2 Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral

Un balance correcto en la producción de la película lagrimal es necesario para que esta cumpla las numerosas funciones para una buena salud ocular. La capa lipídica lagrimal proviene principalmente de las Glándulas de Meibomio [269, 270]. Como se comentó, la

²⁴Debido a la dificultad de obtener pacientes para un protocolo temporalmente tan largo como el aquí detallado, el número de pacientes de este estudio es bajo en comparación con los restos presentes en este trabajo. Pese a ello, su número es bastante superior a cualquiera de los estudios previamente realizados en la materia.

principal función de esta capa es mantener la estabilidad del resto de la lágrima y promover evitar la evaporación de la capa acuosa [269-271]. El objetivo de este segundo estudio de la estabilidad lagrimal fue analizar la relación del TBUT y el MBI con los niveles de secreción meibomiana, así como la influencia de los síntomas sobre esta relación.

3.3.1.2.1 Población y procedimiento

En este estudio participaron un total de 145 pacientes (81 mujeres, 64 hombres), con una edad de $23,7 \pm 4,72$ años (edades comprendidas entre 18 y 54 años). Pacientes que utilizaran cualquier tipo de lágrima artificial o medicaciones generales fueron excluidas para evitar la interferencia de estos factores en el análisis.

Se realizó la Meibometría mediante el Meibómetro MB550 a todos los pacientes aplicando diferentes métodos de promediado de los valores, y se midieron TBUT y MBI promediándolos así mismo de dos maneras diferentes. Adicionalmente, para estudiar la influencia de la sintomatología en esta relación, se utilizó un cuestionario de OSDI para estratificar la muestra.

3.3.1.2.2 Tratamiento estadístico

Los valores obtenidos por el Meibometer siguieron una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov; $p > 0,05$), mientras que los de OSDI, TBUT y MBI fueron de naturaleza no continua (Kolmogorov-Smirnov test; $p < 0,05$). Pese a haberse usado análisis para datos no paramétricos con el TBUT y MBI, los valores medios y de Desviación Estándar son reportados para poder compararlos con otros estudios.

La revisión bibliográfica mostró que no existe convenio en cómo deben ser promediados o escogidos los valores de cada curva generados por el Meibómetro [193-195, 197-199]. Por ello, en el presente trabajo se utilizaron tres tipos de promediado de las 5 curvas obtenidas en cada paciente diferentes: (1) usando solo los valores más altos de cada curva (Mebio_1); (2) promediando los ocho valores centrales de cada curva (Meibo_8); y finalmente (3) promediando los quince valores centrales de cada curva (Mebo_15). Los valores de TBUT y MBI fueron así mismo promediados de dos maneras diferentes para reducir la variabilidad: (1) usando el valor medio de las tres medidas realizadas en cada sesión (3_TBUT and 3_MBI) [36, 39, 50, 267, 268] y (2) usando el valor medio de las dos medidas más similares en cada sesión (2_TBUT and 2_MBI [36, 39, 50, 267]).

Las diferencias entre los diferentes métodos de promediados de Meibómetro (Meibo_1, Meibo_8 y Meibo_15) fueron analizados usando un ANOVA y un *post-hoc* de Tukey para las diferencias por pares. Las diferencias entre ambos métodos usados para promediar TBUT y MBI fueron analizadas usando un test de Wilcoxon.

Las correlaciones entre los métodos de promediados de Meibómetro y los de TBUT y MBI se calcularon usando la Rho de Spearman. Para analizar los efectos de los síntomas en la correlaciones, estas se realizaron en dos clusters de datos diferentes: (1) Usando la población completa sin ningún tipo de estratificación, y (2) Estratificando según los resultados de OSDI como sujetos sanos (Subgrupo 1, OSDI ≤ 13), sujetos con síntomas moderados (Subgrupo 2, OSDI entre 13 y 23) y sujetos con síntomas severos (Subgrupo 3, OSDI ≤ 23) [23-27].

3.3.1.3 Análisis de la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el TBUT y la osmolaridad lagrimal

Una de las principales limitaciones del TBUT, es que solo tiene en cuenta la primera ruptura de la película lagrimal, independientemente de su tamaño, forma, localización o progresión. En estudios previos, estas características post-TBUT fueron estudiadas mediante el “*Starring Tear Break-Up Dynamics*” (S-TBUD) [74, 75]. Este test es una extensión del TBUT, que utiliza análisis de imagen para determinar la extensión y localización de la ruptura a lo largo del tiempo, dando un análisis sobre la estabilidad lagrimal más objetivo y mayor de datos gracias al uso de técnicas de captura y análisis de imagen [36, 95]. Por otro lado y como ya se dijo, la osmolaridad se define como el número de partículas disueltas en un kilogramos de solución, independiente de su tamaño, forma, densidad, configuración o carga [78]. De esta definición se extrae que la hiperosmolaridad ocurre como resultado de un incremento en la evaporación o una reducción de la secreción acuosa. Altos ratios de evaporación tendrán por tanto a su vez un impacto considerable en la estabilidad, dinámica y osmolaridad de la película lagrimal [78, 93-95, 126, 127]. A pesar de que las teorías actuales predicen un incremento en la osmolaridad lagrimal durante la inestabilidad lagrimal [6], existen pocos estudios que analicen esta relación [127]. Este estudio buscaba analizar la relación existente entre la extensión de ruptura de la película lagrimal y la velocidad de la misma con el TBUT clásico y la osmolaridad lagrimal.

3.3.1.3.1 Población y procedimiento

En este estudio participaron un total de 110 pacientes (61 mujeres, 49 hombres), con una edad de $31,7 \pm 15,3$ años (edades comprendidas entre 18 y 65 años). Tomando un criterio de corte para el TBUT de 5 segundos [1, 32, 33, 37, 41], pacientes con un valor mayor ($n = 60$) y un valor menor ($n = 50$) de esta cifra fueron incluidos.

A todos los pacientes se les realizó la video captura y análisis de los parámetros de estabilidad lagrimal tal y como se indica en la sección “3.2.2 *Parámetros de estabilidad de la película lagrimal*”. Adicionalmente, previamente a la instilación de fluoresceína, se realizó una toma de osmolaridad a todos los pacientes del estudio con el osmómetro TearLab.

3.3.1.3.2 Tratamiento estadístico

Se calculó el porcentaje de área de ruptura de la película lagrimal (AB) que representaba la suma en píxeles de todas las áreas de ruptura medidas con respecto al total de la superficie corneal expuesta [73-75]. Se tomó la velocidad del incremento en la ruptura de la película lagrimal (SB) como la diferencia entre la ruptura inicial y el primer segundo posterior (SB_s1) y la diferencia entre el primer segundo y el siguiente (SB_s2). Se usaron los valores de TBUT, AB, y SB como la media de las tres medidas realizadas en cada sujeto [36, 39, 50, 267, 268].

El análisis de distribución mostró que los datos de AB, SB y osmolaridad seguía una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov test; $p > 0,05$), mientras que el TBUT no (Kolmogorov-Smirnov; $p < 0,05$). Como en procedimientos anteriores, pese a utilizar test no paramétricos en los análisis en los que se usó el TBUT, media y DE son presentados para la comparación con la literatura.

Las correlaciones entre diferentes parámetros calculados de AB y SB con el TBUT se calcularon mediante la Rho de Spearman, mientras que se usó la correlación de Pearson para la osmolaridad.

Para calcular la influencia de los diferentes criterios usados para el TBUT y la osmolaridad en los resultados de AB y SB, se usó un ANOVA y un *post-hoc* de Tukey para las diferencias por pares en dos clúster diferentes. Los dos clúster realizados fueron: (1) estratificando según los resultados de TBUT como sujetos sanos (Subgrupo 1, TBUT \geq 10 segundos), moderados (Subgrupo 2, TBUT entre 5 y 10 segundos) y severos (Subgrupo 3, TBUT \leq 5 segundos) [1, 32, 33, 37, 41]; y (2) estratificando según los resultados de osmolaridad como sujetos sanos (Subgrupo 1, osmolaridad \leq 307mOsm/), moderados (Subgrupo 2, osmolaridad entre 308 y 316 mOsm/l) y severos (Subgrupo 3, osmolaridad \leq 317 mOsm/l) [24, 65, 69, 70, 78].

3.3.1.4 Estudio piloto para la validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color

A la vista de la heterogeneidad de las pruebas para el diagnóstico del síndrome de ojo seco, de la subjetividad de las evaluaciones de los test de lágrima y la falta de repetibilidad de dichos tests, análisis automáticos son necesarios. Los presentes autores trabajan en el desarrollo de una metodología de procesamiento de vídeo que permita medir de forma rápida y objetiva el tiempo de ruptura de la película lagrimal así como caracterizar la forma, área, evolución y posición de la ruptura [228, 242-245]. La evaluación automática del TBUT es una herramienta de apoyo al diagnóstico del SOS orientada a la práctica clínica. Este estudio piloto buscaba comparar los resultados iniciales de dicha aplicación con las medidas de evaluadores expertos, con el primer objetivo de validarla.

3.3.1.4.1 Muestra utilizada y validación de la técnica.

Para este protocolo fueron seleccionados por un investigador ajeno al mismo un total de 264 videos de forma aleatoria de la base de datos de pacientes. Previo análisis por los clínicos o el software, los videos fueron etiquetados bajo un código para enmascararlos. Posteriormente fueron subidos a la base de datos y evaluados siguiendo los protocolos descritos en la sección “3.2.2.4 Medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color” por dos Clínicos expertos y por el Software de medida.

3.3.1.4.2 Tratamiento estadístico

El análisis de distribución mostró que los datos de TBUT no seguían una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov test; $p < 0,05$). Como en procedimientos anteriores, pese a utilizar tests no paramétricos en los análisis en los que se usó el TBUT, media y DE son presentados para la comparación con la literatura.

Se utilizó el ICC para analizar la similitud entre los valores de medida dados por los clínicos y el programa. Se utilizó un test de Wilcoxon para establecer las diferencias entre los pares de clínicos/software. La representación gráfica de estas comparaciones se realizó mediante el método de Bland y Altman. Para evitar la aparición del error de tipo 1 (falsos positivos) que puede ocurrir cuando se hacen múltiples análisis de comparación, la significancia fue dividida por el número de comparaciones, por lo que se estableció en $p \leq 0,02$.

3.3.2 Estudio del menisco lagrimal: Validación de un software de código abierto para la medida de la altura del menisco

La asistencia y procesado por software para la medida de imágenes y videos digitales se está convirtiendo en una herramienta cada vez más recurrida en la clínica debido a que permiten aumentar la resolución y repetitividad de los resultados [216, 272]. En la actualidad, existen multitud de programas de código abierto, programas que no requieren de pago para su

uso y que pueden ser modificados libremente por usuarios con conocimientos en la materia. Uno de estos programas, promovido por el National Institutes of Health (NIH) y de amplio uso en las ciencias médicas es el ImageJ [101, 216]. El objetivo de este estudio fue validar la aplicación de dicho software a la medida del menisco lagrimal.

3.3.2.1 Población y procedimiento

En este estudio participaron un total de 176 pacientes (97 mujeres, 79 hombres), con una edad de $30,1 \pm 14,96$ años (edades comprendidas entre 18 y 65 años). Usuarios de lentes de contacto, o pacientes que utilizasen cualquier tipo de lágrima artificial o medicaciones generales fueron excluidos para evitar la interferencia de problemas provocados por estos factores en el análisis [24, 60, 215, 216].

Dos clínicos midieron una batería de imágenes de capturas de menisco lagrimal inferior mediante dos técnicas diferentes (lámpara de hendidura y Tearscope) siguiendo las indicaciones dada en la sección “3.2.3.2. *Evaluación de la altura lagrimal*”. Posteriormente, ambos clínicos asignaron a cada imagen un grado de menisco subjetivo (Figura 3.15 y Tabla 3.1). Estas imágenes fueron medidas en dos sesiones diferentes separadas por un mes, mostradas en ambas ocasiones en orden aleatorio y diferente del anterior, enmascarado respecto al valor de TMH previamente asignado. De esta manera se perseguía: 1) analizar la variabilidad entre clínicos en medidas del TMH mediante ImageJ, y 2) Compara los resultados con un método subjetivo de evaluación existente.

3.3.2.2 Tratamiento estadístico

Los resultados TMH-SL y TMH-Tc medidos mostraron una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov test; $p > 0,05$ para ambos parámetros). Las diferencias entre las medidas del TMH de ambos clínicos en ambas técnicas de iluminación fueron analizadas mediante un t-test para muestras relacionadas, y comparados gráficamente mediante el método de Bland y Altman.

El acuerdo entre la evaluación subjetiva entre ambos clínicos, fue medida mediante el coeficiente Cohen's kappa para establecer un clínico de referencia. Tomando como referencia la evaluación subjetiva del clínico de referencia para evaluar los efectos de la visualización o severidad, se volvieron a analizar mediante un t-test y el método de Bland y Altman, las diferencias entre las medidas de ambos clínicos del TMH en ambas técnicas de iluminación por pares en cada uno de los grados subjetivos. Posteriormente, las diferencias entre los valores de altura de los diferentes grupos creados por cada grado fueron analizadas con un ANOVA en ambas técnicas. En un paso final, el análisis de diferencias bajo criterios subjetivos se realizó dividiendo la muestra únicamente en pacientes sanos o normales (agrupando grados 1 y 2) y pacientes patológicos o anormales (agrupado grados 3 y 4) y analizando la diferencia entre ellos.

3.3.3 Estudio de la osmolaridad: precisión de un osmómetro basado en el descenso del punto de congelación (Fiske 110)

La medida de la osmolaridad de la película lagrimal se ha postulado como el medio más prometedor para valorar en un solo parámetro el estado del sistema lagrimal [1, 6, 65, 66, 69, 78, 85]. El desarrollo de nuevos instrumentos para su medición, con potencial para la aplicación clínica, es necesario para el diagnóstico diferencial de SOS [13, 65, 69]. El objetivo de este estudio fue analizar la precisión de un osmómetro de laboratorio basado en el

principio de congelación, el Osmómetro Fiske 110, con el objetivo general de determinar sus posibles aplicaciones en el ámbito de la película lagrimal.

3.3.3.1 Procedimientos y muestras analizadas

El estudio fue dividido en tres partes siguiendo los procedimientos explicados en la sección “3.2.4.1 Osmómetro Fiske 110” del presente trabajo: 1) Estudio de medidas en soluciones estándar de valor conocido no diluidas y diluidas; 2) Estudio de medidas en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto para su comparación con estudios previos similares; y finalmente 3) Estudio piloto *in vivo* para comparar los resultados obtenidos en pacientes del Fiske 110 frente a un osmómetro de nueva generación utilizado habitualmente en la clínica (Osmómetro TearLab).

3.3.3.1.1 Soluciones estándar

Para el estudio de muestras no diluidas y diluidas fueron analizadas 5 soluciones diferentes (Tabla 3.4): dos soluciones que simulaban valores normales de osmolaridad lagrimal (Clinitrol 290 Reference Solution y 297 mOsm/l H₂O Normal Osmolarity Control Solution); una soluciones simulando un valor de osmolaridad lagrimal anormal (338 mOsm/l H₂O High Osmolarity Control Solution); y dos soluciones de valores extremos (50 mOsm/kg H₂O y 850 mOsm/kg H₂O Advanced® Calibration Standards) [159, 183, 236].

Todas estas soluciones están preparadas a partir de una mezcla de sales junto con *Dowcide A* (Antimicrobial) al 0,01% a modo de preservativo. Los componentes se ajustan a los niveles indicados en cada uno de las ampollas. Los valores nominales y los correspondientes parámetros esperados para las muestras, suponiendo un funcionamiento correcto, oscilan en una pequeña franja de valores y no en un único valor (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Variables proporcionadas por el fabricante de las muestras de mantenimiento

Solución Estándar	Fabricante	Osmolaridad ²⁵	Rango esperado
Advanced® Calibration Standards 50 mOsm/kg H ₂ O	Advanced Instruments, Inc.	50 mOsm/kg	± 2 mOsm/kg
Advanced® Clinitrol™ 290 mOsm/kg H ₂ O Reference Solution	Advanced Instruments, Inc.	290 mOsm/kg	± 2 mOsm/kg
Normal Osmolarity Control Solution	TearLab Corp.	297 mOsm/l	± 15 mOsm/l
High Osmolarity Control Solution	TearLab Corp.	338 mOsm/l	± 15 mOsm/l
Advanced® Calibration Standards 850 mOsm/kg H ₂ O	Advanced Instruments, Inc.	850 mOsm/kg	± 4,25 mOsm/kg

3.3.3.1.2 Soluciones de mantenimiento para lentes de contacto

En el análisis de soluciones de mantenimiento, se utilizaron tres tipos de productos diferentes (Tabla 3.5): una solución salina (Softwear Saline, Ciba Vision Corporation, Duluth, GA); cuatro soluciones multipropósito (Solo Care Aqua®, Ciba Vision Corporation; Opti-Free Express, Alcon Laboratories Inc.; Renu Multiplus, Bausch & Lomb Inc.; Renu Sensitive Eyes MPS, Bausch & Lomb Inc.); y un peróxido de hidrogeno sin neutralizar y neutralizado (AOSept, Ciba Vision Corporation).

²⁵Unidades (mOsm/kg o mOsm/l) citadas según la guía del producto.

Tabla 3.5. Componentes principales de las soluciones usadas. MAPD: dimetilamina miristamidopropil; HPMC: hidroxipropil de metilcelulosa [181, 273]

Nombre comercial	Fabricante	Preservativo (%)	Buffers, surfactantes y conservantes
Softwear Saline	CIBA Vision	Peróxido de hidrógeno al (0,006%)	Cloruro de sodio; borato de sodio; ácido bórico; perborato de sodio; ácido fosfónico
SoloCare Aqua	CIBA Vision	0,0001% polyhexanida	Trometamina; sorbitol; 0,025% de EDTA; dexpantenol (provitamina B5); F127 Pluronic (poloxámero 407)
Opti-Free Express	Alcon	Polyquaternium-1 (Polyquad) al 0,001% MAPD (Aldox) al 0,0005%	Ácido bórico; sorbitol; citrato (ácido cítrico); 0,05% de EDTA; poloxamina (Tetronic 1304)
ReNu Multiplus	Bausch & Lomb	Polyhexanida al 0,0001%	Ácido bórico; borato de sodio; Hydroxialcalinofosfato (Hydranate) 0,1% de EDTA
ReNu Sensitive Eyes MPS	Bausch & Lomb	Polyhexanida al 0,00005%	Edetato disódico; ácido bórico; cloruro de sodio; borato de sodio
AOsept	CIBA Vision	Peróxido de hidrógeno (3%)	Fosfatos. Disco de platino como agente neutralizante

3.3.3.1.3 Población y procedimiento

En este estudio participaron un total de 60 pacientes (33 mujeres, 27 hombres), con una edad de $22,05 \pm 3,06$ años (edades comprendidas entre 18 y 34 años). Para evitar la interferencia de problemas de sequedad en el análisis, fueron excluidos pacientes con un valor de OSDI mayor de 13, que utilizasen cualquier tipo de lágrima artificial o medicaciones generales [1, 23-27].

La muestra fue dividida en dos grupos de forma aleatoria para realizar las comparaciones: 1) Fiske 110 (2 μ l) vs. TearLab; y 2) Fiske 110 (4 μ l) vs. TearLab. En todos los sujetos, la medida siempre se realizó en el mismo orden: primero con el TearLab y diez minutos más tarde el Fiske 110. Este orden fue seguido debido a la baja invasividad del TearLab (que recolecta un volumen lagrimal muy bajo).

3.3.3.2 Tratamiento estadístico

Todas las variables de este estudio se distribuyeron de manera normal (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$). Los resultados de las soluciones estándar no diluidas y diluidas fueron comparados con el valor real proporcionado por el fabricante usando un t-test. Los resultados medios obtenidos en las soluciones de mantenimiento fueron únicamente comparados con los resultados proporcionados por la literatura [181, 273]. Para el análisis de concordancia entre osmómetros, las diferencias entre resultados fueron analizadas mediante un t-test para muestras relacionadas, y comparados gráficamente mediante el método de Bland y Altman.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIOS DE LA ESTABILIDAD DE LA PELÍCULA LAGRIMAL

Con el objetivo general de analizar y ahondar en la significancia diagnóstica de la estabilidad lagrimal y testar nuevos protocolos de medida automática, tal y como ya se comentó, este primer estudio fue dividido en cuatro partes: 1) Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video; 2) Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral; 3) Estudio de la relación del área y la velocidad de la ruptura de la película lagrimal con el TBUT y con la osmolaridad lagrimal; y finalmente 4) Estudio piloto para validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color.

4.1.1 Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video

La Tabla 4.1 muestra los estadísticos descriptivos de los resultados de TBUT y MBI en las diferentes horas del día y procedimientos de promediado. Como se menciona en la sección de estadística, se proporcionan los parámetros característicos de variables no paramétricas (Mediana e IQR) así como media y DE para la comparación con otros estudios.

Tabla 4.1. Estadísticos descriptivos obtenidos en el TBUT y MBI en cada uno de los métodos de promediado y sesiones del día. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; DE = Desviación Estándar; IQR = Rango Intercuartil

Variable	Promediado	Hora (am/pm)	Media	DE	Mediana	IQR	Mínimo	Máximo
TBUT (s)	3_TBUT	9:30	7,72	8,07	5,33	3,48 - 7,63	2,29	38,38
		12:30	7,01	6,03	5,66	4,00 - 7,21	2,18	30,73
		3:30	7,11	5,97	4,68	3,91 - 7,25	1,98	25,69
		6:30	7,86	5,38	6,19	4,35 - 9,20	2,11	24,27
	2_TBUT	9:30	7,82	9,64	5,17	3,06 - 7,78	1,67	48,67
		12:30	6,81	6,58	5,04	3,95 - 6,58	1,83	32,90
		3:30	7,35	6,27	5,45	4,38 - 8,18	2,43	33,87
		6:30	7,36	6,39	5,40	3,92 - 8,87	2,23	32,83
MBI (s)	3_MBI	9:30	16,97	14,95	10,82	8,06 - 23,99	4,96	72,91
		12:30	16,38	11,82	12,18	7,69 - 23,14	6,38	49,64
		3:30	14,30	15,11	9,51	7,18 - 12,91	4,73	75,56
		6:30	21,70	22,72	11,56	7,52 - 30,03	5,18	111,33
	2_MBI	9:30	14,77	14,51	9,59	7,53 - 15,36	5,13	69,80
		12:30	16,74	12,74	12,25	8,30 - 18,14	5,90	52,67
		3:30	14,31	16,75	8,99	7,59 - 10,78	5,37	81,67
		6:30	22,16	25,18	10,07	7,59 - 28,53	5,40	123,80

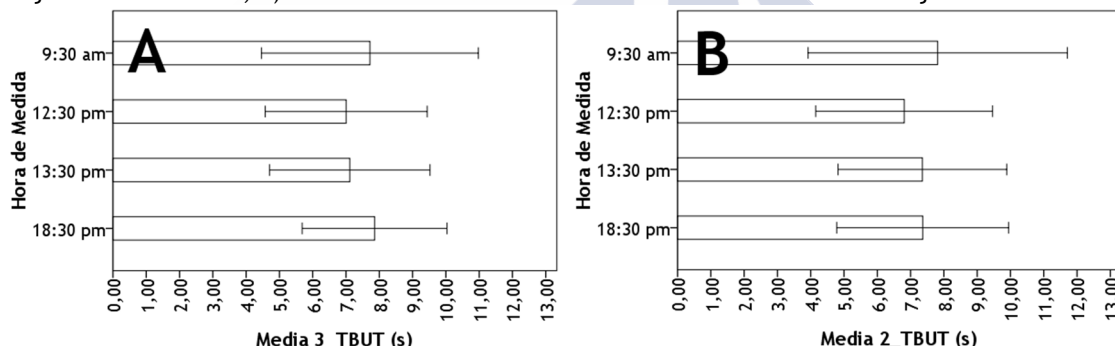
4.1.1.1 Variaciones diurnas en la ruptura de la película lagrimal

La Tabla 4.2 muestra el análisis de las diferencias por pares (Wilcoxon test) entre las diferentes medidas de TBUT obtenidas en las diferentes sesiones para ambos procedimientos de promediado. No se observaron diferencias significativas cuando se calculaba la diferencia entre sesiones al promediar las tres medidas de TBUT (Wilcoxon test; $p \geq 0,19$), o las dos más cercanas (Wilcoxon test; $p \geq 0,39$) (Tabla 4.2; Figura 4.1).

Tabla 4.2. Diferencias medias (Wilcoxon test) por pares de sesiones para el TBUT. n = 26. 3_TBUT = Media de los tres valores de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT = Media de los dos valores más cercanos de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; DE = Desviación estándar

Hora (am/pm)	3_TBUT (s)			2_TBUT (s)		
	Diferencia media	DE	p	Diferencia media	DE	p
9:30 vs. 12:30	0,71	7,28	0,90	1,00	9,97	0,95
9:30 vs. 3:30	0,60	4,97	0,52	0,46	8,57	0,57
9:30 vs. 6:30	- 0,14	7,62	0,32	0,45	10,46	0,68
12:30 vs. 3:30	- 0,11	5,65	0,41	- 0,54	4,84	0,39
12:30 vs. 6:30	- 0,85	7,01	0,38	- 0,55	8,69	0,65
3:30 vs. 6:30	- 0,74	5,27	0,19	- 0,01	6,59	0,96

Figura 4.1. Medidas de TBUT obtenidas en cada uno de las sesiones (9.30am, 12.30pm, 3.30pm y 6.30pm). Las barras de error indican el IC del 95% en cada sesión. n = 26. 3_TBUT = Media de los tres valores de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT = Media de los dos valores más cercanos de TBUT determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia. A) Media de los tres valores de TBUT de cada sujeto en cada sesión; B) Media de los dos valores más cercanos de TBUT de cada sujeto en cada sesión



4.1.1.2 Correlación entre TBUT y MBI

La Tabla 4.3 muestra los estudios de correlación entre el TBUT y el MBI utilizando los dos metodos de promediado. En ambos casos, se encontró una correlación positiva entre los valores de TBUT y MBI (Spearman Rho test; $p \leq 0,006$), con la única excepción de los valores obtenidos en la sesión de las 12:30pm (Spearman Rho test; $p \leq 0,38$) (Tabla 4.9). Por lo tanto, en general, a mayor tiempo de ruptura lagrimal, mayor era el intervalo máximo de parpadeo.

Tabla 4.3. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de TBUT y MBI. n = 26. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones por el Clínico de Referencia; DE = Desviación estándar

	Hora (am/pm)			
	9:30	12:30	3:30	6:30
3_TBUT - 3_MBI	r = 0,61 p < 0,001*	r = 0,36 p = 0,36	r = 0,65 p < 0,001*	r = 0,74 p < 0,001*
2_TBUT - 2_MBI	r = 0,49 p = 0,006*	r = 0,05 p = 0,38	r = 0,67 p < 0,001*	r = 0,56 p = 0,001*

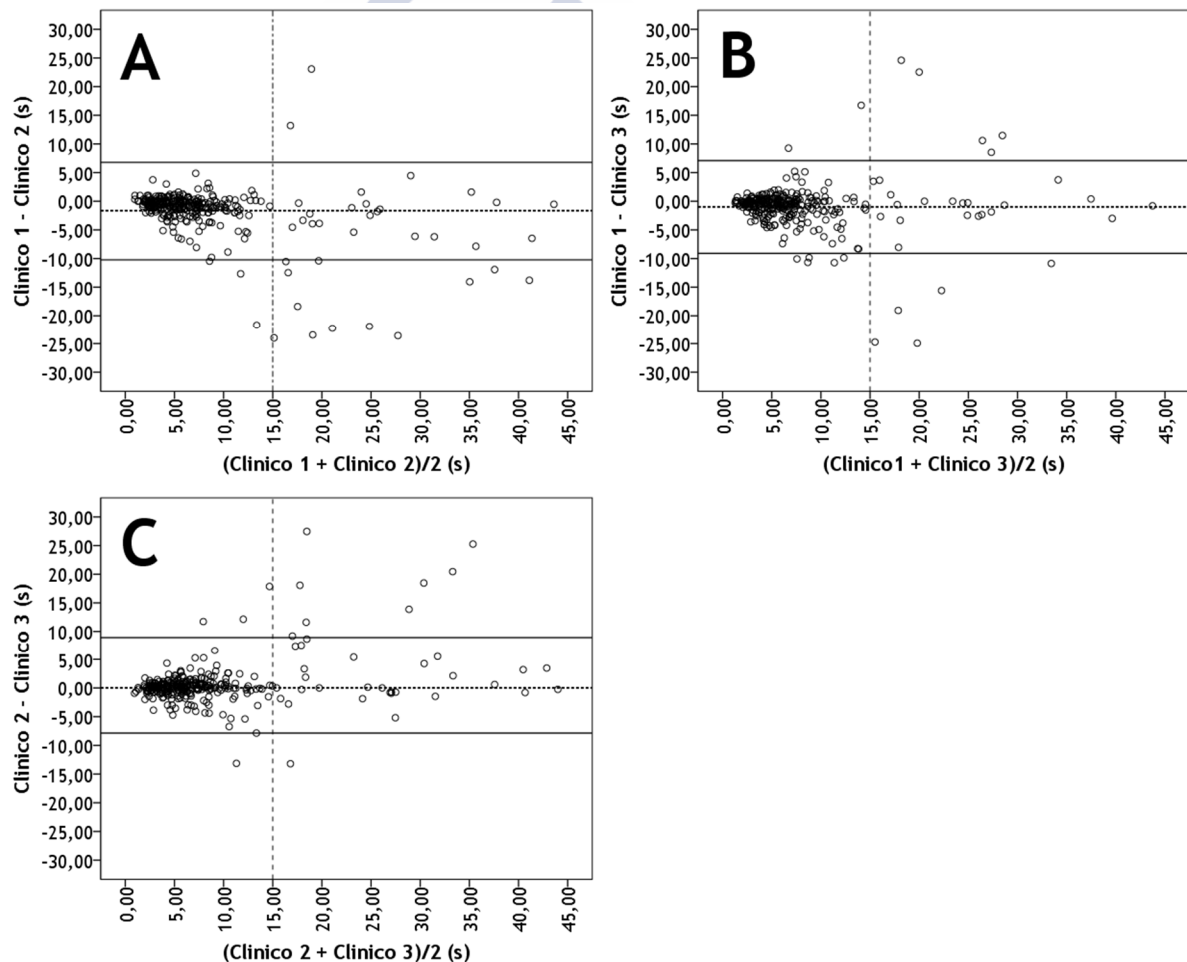
4.1.1.3 Repetibilidad entre Clínicos

El coeficiente de concordancia interclase mostró un acuerdo casi perfecto entre los Clínicos (ICC = 0,81, $p < 0,001$). La Tabla 4.4 muestra las diferencias por pares de Clínicos en los 312 videos de TBUT medidos. No hay una diferencia significativa entre los resultados comparados de los Clínicos 2 y 3 (Wilcoxon test; $p = 0,20$), pero sí de ambos con el Clínico 1 (Wilcoxon test; $p < 0,001$ para ambas comparaciones). Estos resultados por pares de Clínicos se muestran en la Figura 4.2 mediante el método de Bland y Altman.

Tabla 4.4. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares de Clínicos para la muestra. $n = 312$. DE = Desviación estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%

	Diferencia media (s)	DE (s)	P	IC 95% (s)	
				Mínimo	Máximo
Clinico 1 vs. Clínico 2	-1,65	4,38	< 0,001*	- 10,23	6,93
Clinico 1 vs. Clínico 3	-0,92	4,19	< 0,001*	- 9,11	7,21
Clinico 2 vs. Clínico 3	0,58	4,18	0,20	- 7,78	8,94

Figura 4.2. Media frente a la diferencia media (Bland y Altman) en medidas de TBUT en las grabaciones para cada par de Clínicos. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas sólidas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza del 95%. La línea punteada vertical se encuentra señalando los 15 segundos. $n = 312$. A) Clínico 1 vs. Clínico 2; B) Clínico 1 vs. Clínico 3; C) Clínico 2 vs. Clínico 3. DE = Desviación Estándar



Como se puede ver en el análisis de Bland y Altman, el mayor rango de acuerdo se encuentra en valores por debajo de 15 segundos (Figura 4.2, *línea vertical discontinua*). Basándonos en estos resultados y en los estudios de Cho y Brown[39], la variabilidad entre

Clínicos fue recalculada considerando únicamente aquellos valores de TBUT cuya media se encontraba por debajo de los 15 segundos (Tabla 4.5). El coeficiente de concordancia interclase mostró un acuerdo sustancial entre los Clínicos (ICC = 0,733, $p < 0,001$). Se obtuvieron niveles de significancia similares a los obtenidos en la situación anterior (Wilcoxon test; Clínico 1 vs. Clínico 2 y Clínico 1 vs. Clínico 3, $p < 0,001$ en ambos casos; Clínico 2 vs. Clínico 3, $p = 0,40$). Sin embargo, los Intervalos de Confianza del 95% sufrieron una disminución considerable, así como las diferencias medias y las DE.

Tabla 4.5. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares de Clínicos considerando únicamente los valores de TBUT bajo 15 segundos. $n = 272$. DE = Desviación estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%

	Diferencia media (s)	DE (s)	p	IC 95% (s)	
				Minimo	Maximo
Clinico 1 vs. Clinico 2	- 1,05	2,39	< 0,001*	- 5,73	3,63
Clinico 1 vs. Clinico 3	- 0,91	2,60	< 0,001*	- 6,00	4,18
Clinico 2 vs. Clinico 3	0,10	2,40	0,40	- 4,60	4,80

4.1.2 Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral

El análisis de esta correlación entre TBUT y MBI con los niveles de secreción meibomiana se realizó en dos pasos diferentes: 1) en una muestra no estratificada, y 2) en una muestra estratificada por síntomas según el valor de OSDI.

4.1.2.1. Correlación en una muestra no estratificada

La Tabla 4.6 muestra los estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos en las diferentes promediaciones de Meibómetro, TBUT y MBI en la población completa del estudio. Se observaron valores significativamente mayores para Meibo_1, seguido de Meibo_8 y finalmente de Meibo_15 (ANOVA, Tukey's *post-hoc*; $p \leq 0,05$ en todos los análisis). Igualmente, se observaron diferencias significativas entre 3_TBUT vs. 2_TBUT, y 3_MBI vs. 2_MBI, siendo menores los valores cuando en la promediación se usaban las 3 medidas realizadas (Wilcoxon test; $p \leq 0,05$ en todos los análisis).

Tabla 4.6. Estadísticos descriptivos para los resultados de OSDI, Meibómetro, TBUT y MBI. $n = 145$. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones; DE = Desviación estándar; IQR = Rango Inter cuartil

		Media	DE	Mediana	IQR	Mínimo	Máximo
Puntuación OSDI		-	-	8,33	4,17 - 14,58	0,00	56,25
Meibómetro (UM)	Meibo_1	393,46	160,91	-	-	27,20	712,20
	Meibo_8	342,62	147,93	-	-	19,50	680,43
	Meibo_15	267,80	127,45	-	-	10,80	589,20
TBUT (s)	3_TBUT	8,63	6,74	6,54	4,46 - 10,41	1,19	33,16
	2_TBUT	10,08	7,97	7,80	5,04 - 12,05	1,28	45,17
MBI (s)	3_MBI	14,02	9,76	10,73	8,08 - 16,51	1,86	52,84
	2_MBI	15,92	11,31	11,73	8,82 - 18,02	3,93	61,40

Desde la Figura 4.3 a la Figura 4.6 se muestra la correlación entre cada uno de los métodos de promediado de la Meibometría con los de TBUT y MBI. Independientemente del método usado para promediar las curvas generadas por el Meibómetro, fue observada una correlación significativa positiva leve con ambos métodos de promediado de TBUT (Spearman Rho test; de $r = 0,213$ a $r = 0,285$; $p \leq 0,005$ para todos los análisis; Figura 4.3; Figura 4.4) y MBI (Spearman Rho test; de $r = 0,224$ a $r = 0,296$; $p \leq 0,003$ para todos los análisis; Figura 4.5; Figura 4.6).

Figura 4.3. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 3_TBUT en la población completa. $n = 145$. 3_TBUT = Media de los tres valores de TBUT en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 3_TBUT, B) Correlación entre Meibo_8 y 3_TBUT, C) Correlación entre Meibo_15 y 3_TBUT

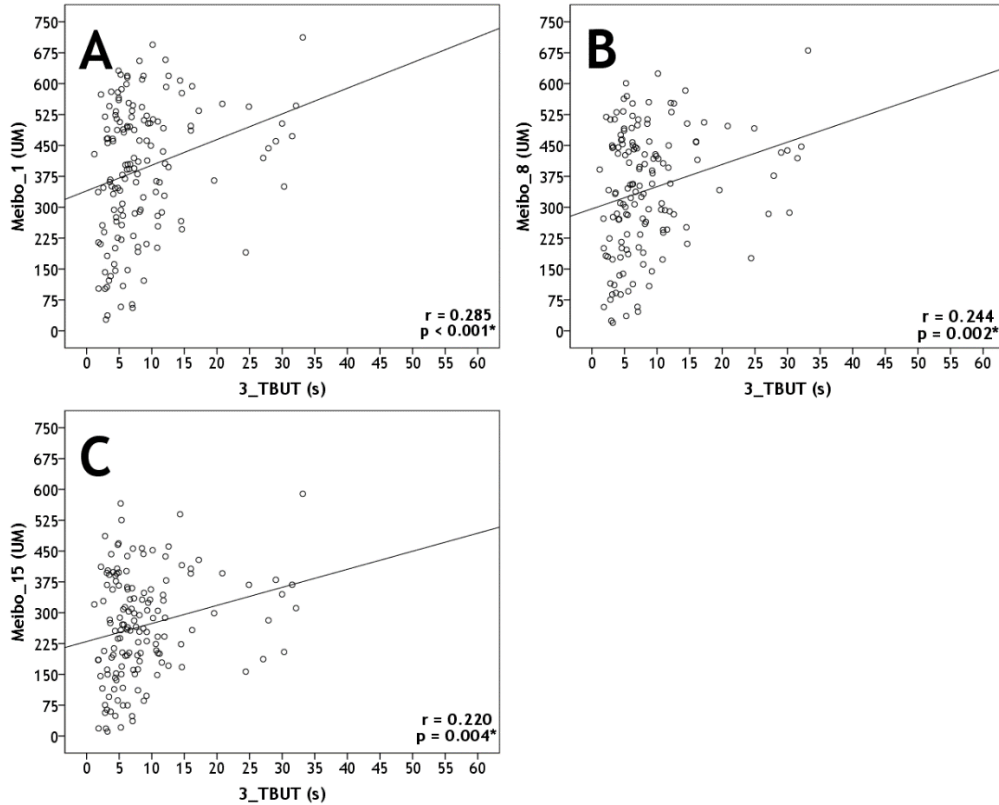


Figura 4.4. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 2_TBUT en la población completa. $n = 145$. 2_TBUT = Media de los dos valores más cercanos de TBUT en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 2_TBUT; B) Correlación entre Meibo_8 y 2_TBUT; C) Correlación entre Meibo_15 y 2_TBUT

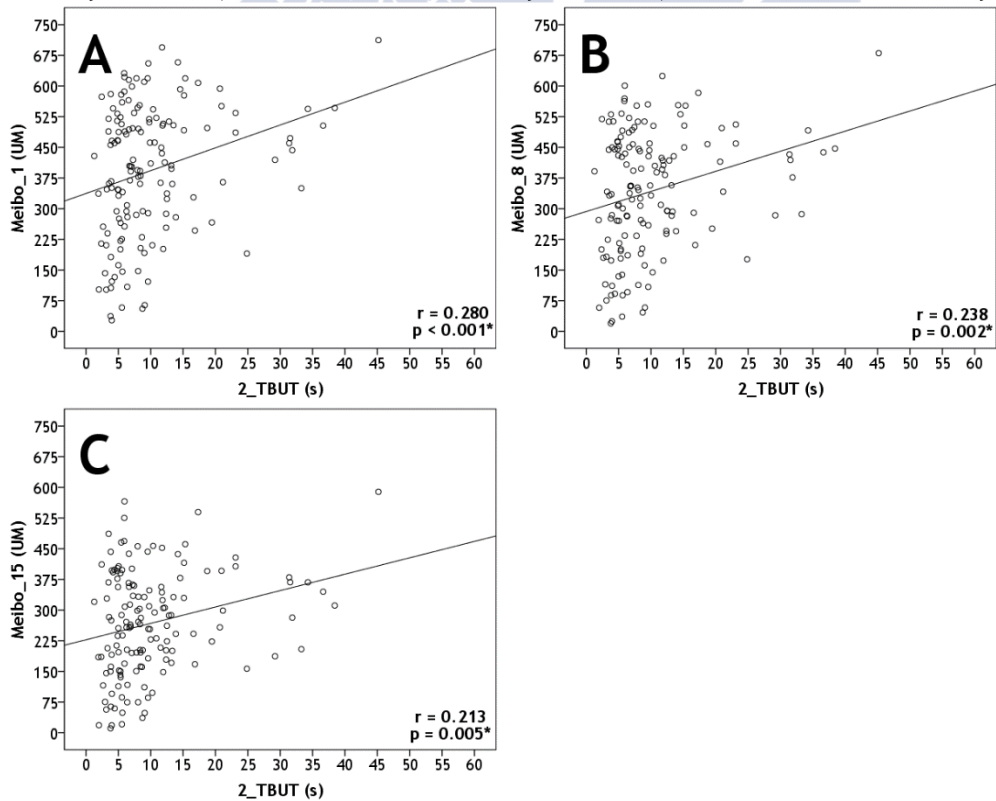


Figura 4.5. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 3_MBI en la población completa. n = 145. 3_MBI = Media de los tres valores de MBI en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 3_MBI; B) Correlación entre Meibo_8 y 3_MBI; C) Correlación entre Meibo_15 y 3_MBI

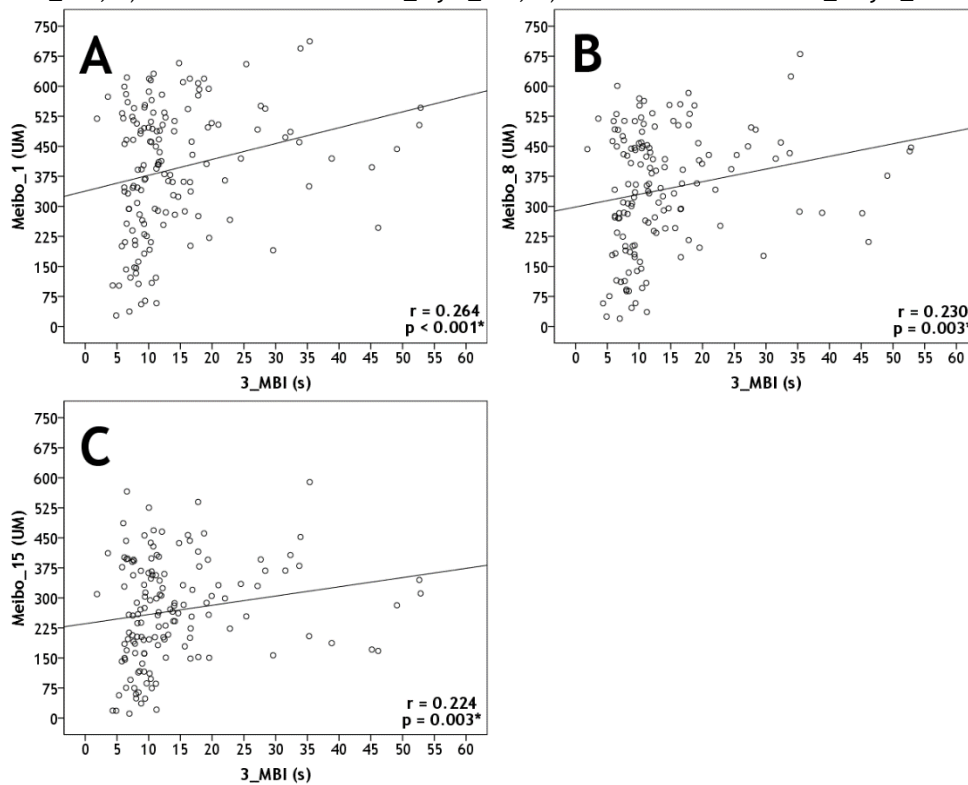
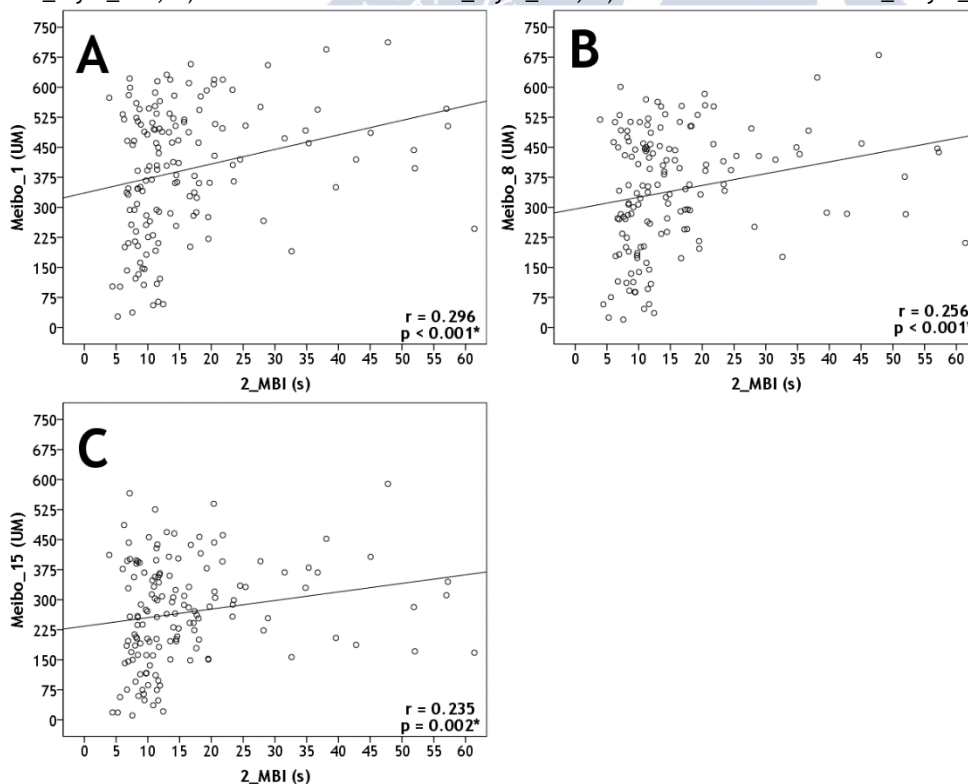


Figura 4.6. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibometro y 2_TBUT en la población completa. n = 145. 2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de MBI en grabaciones. A) Correlación entre Meibo_1 y 2_MBI; B) Correlación entre Meibo_8 y 2_MBI; C) Correlación entre Meibo_15 y 2_MBI



4.3.2.2 Correlación en una muestra estratificada por síntomas según OSDI

La Tabla 4.7 muestra los estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos en las diferentes promediaciones de la Meibometría, TBUT y MBI en la población estratificada según su valor de OSDI. Como ocurrió en la situación anterior, se observaron valores significativamente mayores para Meibo_1, seguido de Meibo_8 y finalmente de Meibo_15 (ANOVA, Tukey's *post-hoc*; $p \leq 0,05$ en todos los análisis). Igualmente, se observaron diferencias significativas entre 3_TBUT vs. 2_TBUT, y 3_MBI vs. 2_MBI, siendo menores los valores cuando en la promediación se usaban las 3 medidas realizadas (Wilcoxon test; $p \leq 0,05$ en todos los análisis).

Tabla 4.7. Estadísticos descriptivos en la muestra agrupada por síntomas. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones. DE = Desviación estándar; IQR = Rango Intercuartil

		Subgrupo 1: Normal [OSDI ≤ 13] n = 94		Subgrupo 2: Moderado [OSDI 13 - 23] n = 36		Subgrupo 3: Severo [OSDI ≥ 23] n = 15	
		Media \pm DE	Mediana (IQR)	Media \pm DE	Mediana (IQR)	Media \pm DE	Mediana (IQR)
Puntuación OSDI		-	6,25 (4,17-8,33)	-	14,62 (14,58-16,67)	-	25 (23,92-33,33)
Edad (años)		20,5 \pm 2,61		23,6 \pm 4,08		31,5 \pm 7,28	
Meibómetro (UM)	Meibo_1	419,90 \pm 144,37	-	346,21 \pm 181,00	-	341,27 \pm 180,49	-
	Meibo_8	366,88 \pm 135,32	-	296,70 \pm 159,16	-	300,76 \pm 169,95	-
	Meibo_15	287,76 \pm 118,93	-	227,29 \pm 130,53	-	239,98 \pm 151,02	-
TBUT (s)	3_TBUT	9,18 \pm 7,01	7,15 (4,88-10,69)	7,31 \pm 5,91	5,57 (3,46-8,23)	8,39 \pm 6,82	5,88 (3,84-10,93)
	2_TBUT	10,71 \pm 8,52	8,09 (5,49-12,41)	8,55 \pm 6,48	6,39 (4,48-9,72)	9,84 \pm 7,60	6,80 (3,97-12,17)
MBI (s)	3_MBI	15,05 \pm 10,76	11,26 (8,61-16,54)	12,05 \pm 7,43	10,06 (6,56-15,94)	12,23 \pm 7,24	9,49 (8,19-13,89)
	2_MBI	17,01 \pm 12,64	12,08 (9,17-18,17)	14,08 \pm 8,33	11,40 (7,96-16,61)	13,48 \pm 7,60	10,85 (8,80-16,60)

La Tabla 4.8 resume todas las correlaciones calculadas entre los diferentes métodos de promediado de TBUT, MBI y Meibómetro en los diferentes grupos sintomáticos generados.

En el grupo de pacientes no sintomáticos (Subgrupo 1) no se encontraron Correlación es significativas entre los valores de Meibómetro con el TBUT o el MBI, excepto en las entre Meibo_1 y TBUT (Spearman Rho test; $r = 0,196$, $p = 0,029$ para Meibo_1 vs. 3_TBUT; $r = 0,196$, $p = 0,029$ para Meibo_1 vs. 2_TBUT).

En pacientes con síntomas moderados (Subgrupo 2), todas las correlaciones fueron significativas (Spearman Rho test; $p \leq 0,047$ en todos los casos) y ligeramente más altas que las encontradas en pacientes no sintomáticos. Sin importar el método de promediación, Meibómetro y TBUT presentaron correlaciones débiles, con una tendencia creciente cuantos menos valores de Meibómetro eran usados para la promediación (Spearman Rho test; desde $r = 0,283$ para Meibo_15 vs. 3_TBUT hasta $r = 0,358$ para Meibo_1 vs. 2_TBUT). Las correlaciones de Meibómetro y MBI iban desde débiles para todas las correlaciones con Meibo_15 (Spearman Rho test; $r = 0,344$ en 3_MBI, y $r = 0,388$ en 2_MBI), a débiles y moderadas con Meibo_1 (Spearman Rho test; $r = 0,345$ en 3_MBI, y $r = 0,440$ en 2_MBI).

Finalmente, cuando solo se consideraron pacientes con sintomatología elevada (Subgrupo 3), los valores de correlación fueron más altos respecto a aquellos obtenidos tanto en pacientes sanos como moderados en síntomas. Cuanto se analizaron las correlaciones entre Meibómetro y TBUT, todas fueron significativas (Spearman Rho test; $p \leq 0,049$ en todos los análisis), variando desde moderadas (Spearman Rho test; $r = 0,443$ para Meibo_15 vs 3_TBUT) hasta casi sustanciales (Spearman Rho test; $r = 0,568$ para Meibo_1 vs. 2_TBUT). Las correlaciones entre Meibómetro y MBI fueron igualmente significativas (Spearman Rho test; $p \leq 0,003$ en todos los análisis), siendo todas ellas de carácter sustancial (Spearman Rho test; desde $r = 0,679$ a $r = 0,721$).

Tabla 4.8. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de Meibómetro y TBUT/MBI en en la muestra agrupada por síntomas. 3_TBUT/3_MBI = Media de los tres valores de TBUT/MBI determinados en grabaciones; 2_TBUT/2_MBI = Media de los dos valores más cercanos de TBUT/MBI determinados en grabaciones

Subgrupo	Meibómetro	TBUT		MBI	
		3_TBUT	2_TBUT	3_MBI	2_MBI
Subgrupo 1: Normal [OSDI \leq 13] n = 94	Meibo_1	r = 0,196 p = 0,029*	r = 0,197 p = 0,029*	r = 0,122 p = 0,121	r = 0,142 p = 0,087
	Meibo_8	r = 0,128 p = 0,110	r = 0,129 p = 0,107	r = 0,070 p = 0,250	r = 0,089 p = 0,197
	Meibo_15	r = 0,102 p = 0,165	r = 0,106 p = 0,155	r = 0,054 p = 0,302	r = 0,073 p = 0,241
Subgrupo 2: Moderado [OSDI 13 - 23] n = 36	Meibo_1	r = 0,357 p = 0,016*	r = 0,358 p = 0,016*	r = 0,345 p = 0,020*	r = 0,440 p = 0,004*
	Meibo_8	r = 0,295 p = 0,041*	r = 0,300 p = 0,038*	r = 0,311 p = 0,033*	r = 0,388 p = 0,010*
	Meibo_15	r = 0,283 p = 0,047*	r = 0,285 p = 0,046*	r = 0,344 p = 0,020*	r = 0,388 p = 0,010*
Subgrupo 3: Severo [OSDI \geq 23] n = 15	Meibo_1	r = 0,532 p = 0,021*	r = 0,568 p = 0,014*	r = 0,721 p < 0,001*	r = 0,693 p = 0,002*
	Meibo_8	r = 0,450 p = 0,046*	r = 0,486 p = 0,033*	r = 0,693 p = 0,002*	r = 0,679 p = 0,003*
	Meibo_15	r = 0,443 p = 0,049*	r = 0,471 p = 0,038*	r = 0,686 p = 0,002*	r = 0,679 p = 0,003*

4.1.3 Análisis de la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el TBUT y la osmolaridad lagrimal

Las relaciones del área y velocidad de ruptura fueron realizado en dos pasos: 1) Análisis de la relación del TBUT con el área y velocidad de ruptura; y 2) Análisis de la relación de la osmolaridad con el área y velocidad de ruptura.

La Tabla 4.9 muestra los estadísticos descriptivos de los resultados obtenidos en TBUT y los diferentes parámetros de AB y SB para la población completa del estudio.

Tabla 4.9. Estadísticos descriptivos del TBUT, AB, SB y osmolaridad. n = 110. TBUT = Tiempo de ruptura lagrimal; AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal; DE = Desviación Estándar; IQR = Rango Intercuartil

Variable	Media	DE	Mediana	IQR	Mínimo	Máximo	
TBUT (s)	6,16	5,48	5,52	3,76 - 7,65	0,82	29,03	
Área de ruptura lagrimal (%área/s)	AB_0	0,23	0,23	-	-	0,01	1,52
	AB_1	0,70	0,56	-	-	0,02	2,40
	AB_2	1,54	1,43	-	-	0,05	6,65
	AB_F	3,50	4,02	-	-	0,08	18,46
Velocidad de ruptura lagrimal (%área/s)	SB_s1	0,46	0,47	-	-	0,01	2,13
	SB_s2	0,84	0,97	-	-	0,01	4,32
Osmolarity (mOsm/l)	309,1	18,48	-	-	277	381	

4.1.3.1 Relación del TBUT con AB y SB

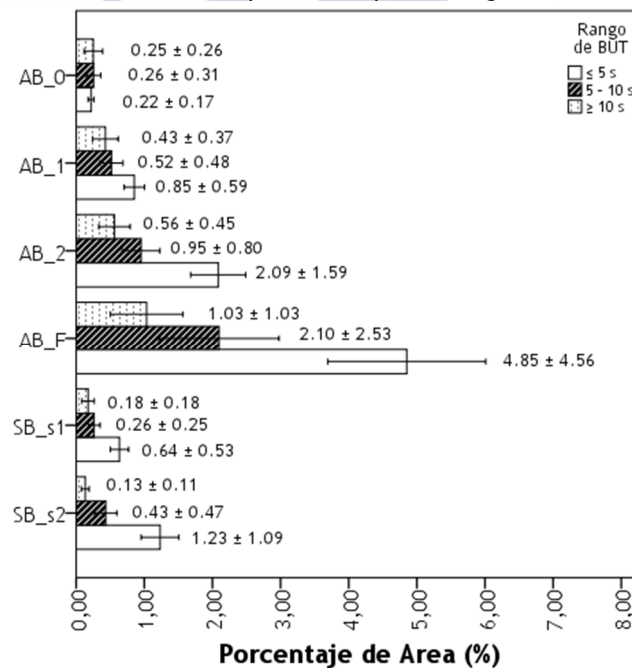
La Tabla 4.10 muestra las correlaciones entre los parámetros de área y velocidad de ruptura con el TBUT. Todos mostraron una tendencia significativa (Spearman Rho test; $p \leq 0,013$) de carácter negativo. Entre el TBUT y AB el grado de correlación aumenta desde débil (Spearman Rho test; $r = -0,212$ para AB_0) a casi sustancial (Spearman Rho test; $r = -0,509$ para AB_F) según avanzamos en el punto temporal de medida. En su correlación con la SB, el TBUT mostró un grado moderado (Spearman Rho test; $r = -0,590$ para SB_s1) o sustancial (Spearman Rho test; $r = -0,657$ para SB_s2).

Tabla 4.10. Correlación (Spearman Rho test) entre los valores de TBUT y AB/SB. $n = 110$. TBUT = Tiempo de ruptura lagrimal; AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal

TBUT	Áreas de ruptura				Velocidades de ruptura	
	AB_0	AB_1	AB_2	AB_F	SB_S1	SB_S2
	$r = -0,212$ $p = 0,013^*$	$r = -0,462$ $p < 0,001^*$	$r = -0,592$ $p < 0,001^*$	$r = -0,594$ $p < 0,001^*$	$r = -0,590$ $p < 0,001^*$	$r = -0,657$ $p < 0,001^*$

La Figura 4.7 muestra los valores medios y DE para todos los parámetros de AB y SB obtenidos en cada subgrupo generado por los criterios de corte de TBUT.

Figura 4.7. Media (\pm DE) de los valores de AB/SB obtenidos en cada rango de TBUT. Las barras de Error indican el Intervalo de Confianza del 95%. Los datos de AB se encuentran en porcentaje (%), mientras que los de SB en porcentajes de área por segundo (%área/s). TBUT = Tiempo de ruptura lagrimal; AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal; DE = Desviación Estándar



Todos los parámetros presentaron una diferencia significativa entre los subgrupos de TBUT (ANOVA; $p \leq 0,002$ para todos los análisis), a excepción de AB_0 (ANOVA; $p = 0,723$). En todos los otros casos, mayores valores de AB y SB estaban relacionados con menores valores de TBUT. Cuando se analizaron las diferencias intergrupo por pares, se observaron diferencias significativas entre los pacientes con un TBUT igual o menor de 5 segundos y los otros dos subgrupos (Tukey's *post-hoc* test; $p \leq 0,019$ para todos los análisis). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas cuando se correlacionaron los parámetros de AB y SB entre los pacientes con un TBUT entre 5 y 10 segundos y aquellos que tenían uno mayor de 10 segundos (Tukey's *post-hoc* test; $p \geq 0,504$ para todos los análisis).

4.1.3.2 Relación de la osmolaridad con AB y SB

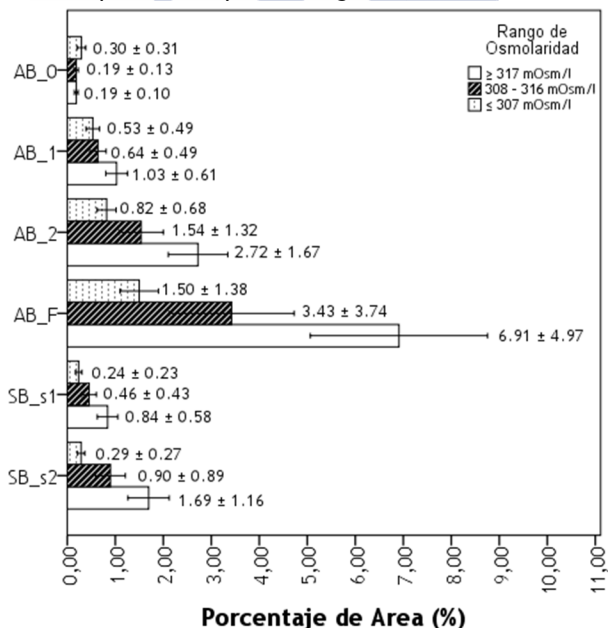
La Tabla 4.11 muestra las correlaciones entre los parámetros de área y velocidad de ruptura con la osmolaridad. Todos presentaron una tendencia significativa (Pearson test; $p \leq 0,015$ para todos los análisis) de carácter positivo. Entre osmolaridad y AB el grado de correlación aumenta desde débil (Pearson test; $r = 0,206$ para AB_0) a casi sustancial (Pearson test; $r = 0,549$ para AB_F) según avanzamos en el punto temporal de medida, mientras que muestra una correlación de grado moderado con los parámetros de velocidad de ruptura (Pearson test; $r = 0,485$ para SB_s1 y $r = 0,565$ para SB_s2).

Tabla 4.11. Correlación (Pearson test) entre los valores de osmolaridad y AB/SB. $n = 110$. AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal

Osmolaridad	Áreas de ruptura				Velocidades de ruptura	
	AB_0	AB_1	AB_2	AB_F	SB_S1	SB_S2
	$r = 0,206$ $p = 0,015^*$	$r = 0,324$ $p < 0,001^*$	$r = 0,511$ $p < 0,001^*$	$r = 0,549$ $p < 0,001^*$	$r = 0,485$ $p < 0,001^*$	$r = 0,565$ $p < 0,001^*$

La Figura 4.8 muestra los valores medios y DE para todos los parámetros de AB y SB obtenidos en cada subgrupo generado por los criterios de corte de osmolalidad.

Figura 4.8. Media (\pm DE) de los valores de AB/SB obtenidos en cada rango de osmolaridad. Las barras de Error indican el Intervalo de Confianza del 95%. Los datos de AB se encuentran en porcentaje (%), mientras que los de SB en porcentajes de área por segundo ($\%$ área/s). AB = área de ruptura de la película lagrimal; SB = velocidad de ruptura de la película lagrimal; DE = Desviación Estándar



Todos los parámetros mostraron una diferencia significativa entre los subgrupos de TBUT (ANOVA; $p \leq 0,001$ para todos los análisis), a excepción de AB_0 (ANOVA; $p = 0,089$). En todos los otros casos, mayores valores de AB y SB estaban relacionados con mayores valores de osmolaridad. Cuando se analizaron las diferencias intergrupo por pares, se observaron diferencias significativas entre todos los grupos generados con los criterios en todos los parámetros de AB y SB, (Tukey's *post-hoc* test; $p \leq 0,040$ para todos los análisis), excepto en el caso de AB_1 cuando se comparaban pacientes con una osmolaridad menor de 307 mOsm/l con aquellos que la tenían entre 308-316 mOsm/l rango (Tukey's *post-hoc* test; $p = 0,645$).

4.1.4 Estudio piloto para validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color

La Tabla 4.12 muestra los estadísticos descriptivos de los resultados de TBUT por los evaluadores. Como se menciona en la sección de estadística, se proporcionan los parámetros característicos de variables no paramétricas (Mediana e IQR) así como media y DE para la comparación con otros estudios.

Tabla 4.12. Estadísticos descriptivos obtenidos en el TBUT por cada Clínico/Software. DE = Desviación Estándar; IQR = Rango Intercuartil

	Media (s)	DE (s)	Mediana	IQR	Minimo	Maximo
Clínico 1	4,764	3,752	3,629	2,516 - 5,619	0,92	29,65
Clínico 2	4,449	3,813	3,257	2,159 - 5,583	0,48	30,09
Software	4,644	4,090	3,188	2,122 - 5,477	0,97	35,51

El coeficiente de concordancia interclase mostró un acuerdo sustancial entre los evaluadores (ICC = 0,752, $p < 0,001$). La Tabla 4.13 muestra las diferencias por pares de evaluadores en los 264 videos de TBUT medidos. No hay una diferencia significativa entre los resultados comparados de los Clínicos 1 y 2 con el Software (Wilcoxon test; $p \geq 0,211$ para ambas comparaciones), pero sí entre ambos Clínicos (Wilcoxon test; $p < 0,001$). Estos resultados por pares de Clínicos se muestran en la Figura 4.9 mediante el método de Bland y Altman.

Figura 4.9. Media frente a la diferencia media (Bland y Altman) en medidas de TBUT para cada par. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas sólidas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza de 95%. La línea punteada vertical se encuentra señalando los 15 segundos. $n = 264$. A) Clínico 1 vs. Clínico 2; B) Clínico 1 vs. Clínico 3; C) Clínico 2 vs. Clínico 3. DE = Desviación Estándar

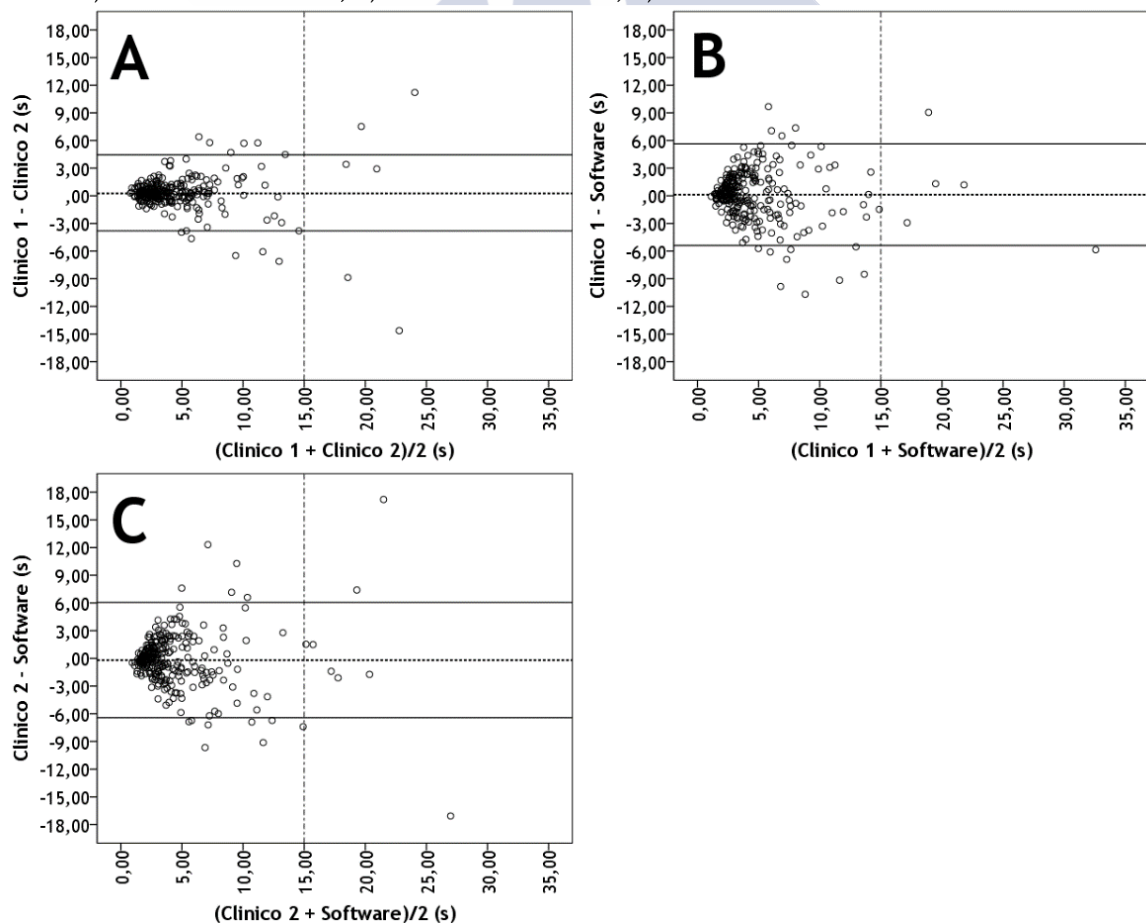


Tabla 4.13. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares para la muestra de estudio completa. n = 264.
DE = Desviación estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%

	Diferencia media (s)	DE (s)	p	IC 95% (s)	
				Minimo	Maximo
Clinico 1 vs. Clinico 2	0,315	2,103	< 0,001*	- 3,806	4,436
Clinico 1 vs. Software	0,119	2,809	0,211	- 5,386	5,634
Clinico 2 vs. Software	- 0,195	3,180	0,261	- 6,428	6,047

Como se puede ver en el análisis de Bland y Altman, el mayor rango de acuerdo se encuentra en valores por debajo de 15 segundos (Figura 4.9). Basándonos en estos resultados y en los estudios de Cho y Brown[39], la variabilidad entre Clínicos fue recalculada considerando únicamente aquellos valores de TBUT cuya media se encontraba por debajo de los 15 segundos (Tabla 4.14). De nuevo, el coeficiente de concordancia interclase mostró un acuerdo sustancial entre los Clínicos (ICC = 0,657, $p < 0,001$). Se obtuvieron niveles de significancia similares a los obtenidos en la situación anterior (Wilcoxon test; Clínico 1 vs. Software y Clínico 2 vs. Clínico 3, $\geq 0,080$ en ambos casos; Clínico 1 vs. Clínico 2, $p < 0,001$). Sin embargo, los Intervalos de Confianza del 95% sufrieron una disminución considerable, así como las diferencias medias y las DE.

Tabla 4.14. Diferencia medias (Wilcoxon test) entre pares de Clínicos considerando únicamente los valores de TBUT bajo 15 segundos. n = 253. DE = Desviación estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%

	Diferencia media (s)	DE (s)	p	IC 95% (s)	
				Minimo	Maximo
Clinico 1 vs Clinico 2	0,298	1,848	< 0,001*	- 3,326	3,919
Clinico 1 vs. Sftware	0,245	2,679	0,080	- 5,006	5,495
Clinico 2 vs. Sftware	- 0,052	2,891	0,507	5,719	5,615

4.2 ESTUDIO DEL MENISCO LAGRIMAL: VALIDACIÓN DE UN SOFTWARE DE CÓDIGO ABIERTO PARA LA MEDIDA DE LA ALTURA DEL MENISCO

Con el objetivo de analizar la variabilidad en las medidas del TMH con el ImageJ en dos técnicas de iluminación diferentes y para validarlos, el análisis fue dividido en dos partes: 1) Análisis de la repetibilidad entre las medidas de dos clínicos en una muestra no estratificada; y 2) tras estratificar la muestra según los criterios de apariencia subjetiva: a) se calcula la diferencia en las medidas dentro de cada grado, y b) las diferencias entre los valores obtenidos en los diferentes grados subjetivos.

4.2.1 Análisis de la repetibilidad entre dos clínicos

La Tabla 4.14 muestra los estadísticos descriptivos para las medidas de la altura del menisco lagrimal hechas con el ImageJ en cada técnica de iluminación por cada uno de los Clínicos en la muestra completa.

Tabla 4.15. Estadísticos descriptivos de las medidas de TMH para cada Clínico en ambas técnicas. n = 176.
TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope. DE = Desviación Estándar

		Media	DE	Minimo	Máximo
Clínico 1	TMH-SL (mm)	0,199	0,066	0,06	0,50
	TMH-Tc (mm)	0,127	0,054	0,05	0,41
Clínico 2	TMH-SL (mm)	0,198	0,064	0,07	0,52
	TMH-Tc (mm)	0,128	0,053	0,06	0,40

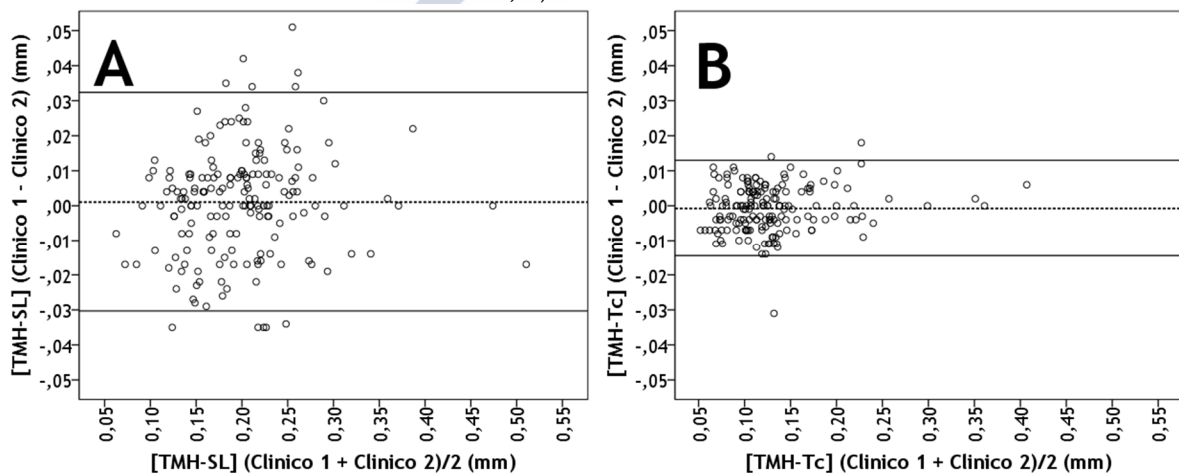
Para comprobar la repetibilidad de la técnica, se compararon las medidas de los dos Clínicos (t-test para muestras pareadas) en cada una de las técnicas. No se encontró diferencia

significativa entre ellos ni en las medidas realizadas en las imágenes tomadas con la iluminación de la lámpara de hendidura (t-test; $p = 0,382$) ni con la del Tearscope (t-test; $p = 0,138$) (Tabla 4.16). La Figura 4.10 representa estos resultados gráficamente mediante un análisis de Bland y Altman.

Tabla 4.16. Diferencias medias (t-test para muestras relacionadas) obtenidas para las diferencias entre las medidas realizadas por cada Clínico en cada técnica. $n = 176$. TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope; DE = Desviación Estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%

Clínico 1 vs. Clínico 2	Diferencia media	DE	P	IC 95%	
				Mínimo	Máximo
TMH-SL (mm)	0,00104	0,016	0,382	- 0,0303	0,0324
TMH-Tc (mm)	- 0,00076	0,007	0,136	- 0,0145	0,0130

Figura 4.10. Media frente a la diferencia (Bland y Altman) entre los valores obtenidos en pacientes por cada Clínico. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas sólidas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza del 95%. $n = 176$. TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope. A) Medidas de TMH-SL del Clínico 1 frente al Clínico 2; B) Medidas de TMH-Tc del Clínico 1 frente al Clínico 2

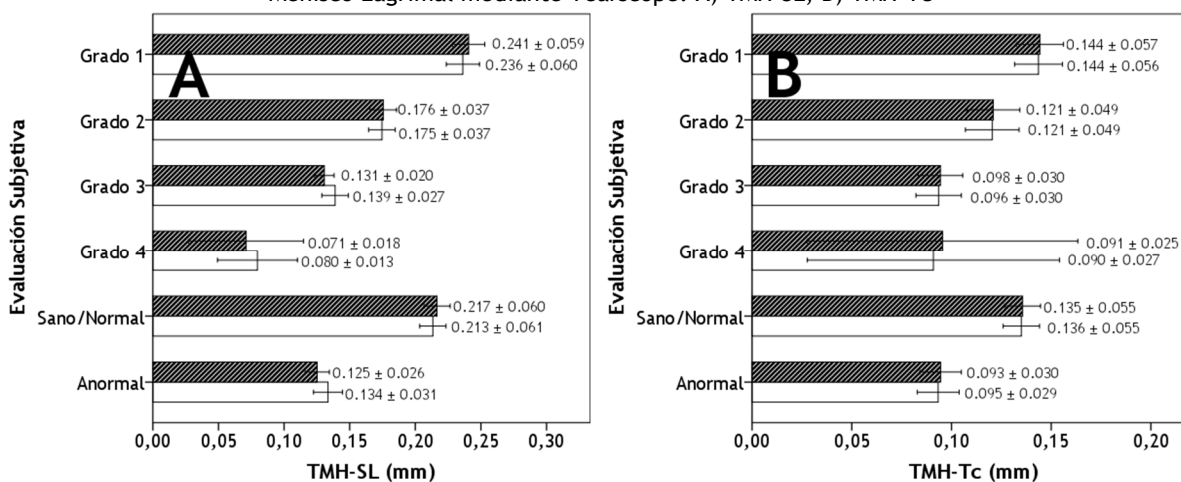


4.2.2 Comparación de las medidas de TMH con la muestra estratificada según los criterios de apariencia subjetiva

Cada uno de los Clínicos clasificó la apariencia del menisco siguiendo literatura previa (Tabla 3.1; Figura 3.15)[24, 57, 179].

El estadístico Cohen's kappa mostró una fiabilidad sustancial en la evaluación entre Clínicos ($\kappa = 0,630$), por lo la evaluación del grado subjetivo realizada por el Clínico 1 fue utilizada como "Clínico de Referencia". En la muestra de 176 pacientes, 90 presentaron un menisco lagrimal intacto (51,13% de los pacientes con Grado 1), 53 un menisco lagrimal ligeramente disminuido (30,11% de los pacientes con Grado 2), 30 un menisco lagrimal marcadamente disminuido (17,05% de los pacientes con Grado 3) y 3 un menisco ausente (1,71% de los pacientes con Grado 4). La Figura 4.11 muestra los valores de TMH (Media \pm DE) para cada Clínico y técnica de iluminación en cada uno de los cuatro grados subjetivos, así como la estratificación sanos o normales y patológicos o anormales según la evaluación del Clínico de Referencia.

Figura 4.11. Valores de TMH (Media \pm DE) de los dos Clínicos en cada uno de los grados subjetivos generados por el Clínico de Referencia. Las barras de error indican los Intervalos de Confianza del 95% para cada parámetro. TMH-SL = Altura del Menisco Lagrimal mediante Lámpara de Hendidura; TMH-Tc = Altura del Menisco Lagrimal mediante Tearscope. A) TMH-SL; B) TMH-Tc



4.2.2.1 Análisis de la repetibilidad entre dos Clínicos

Para evaluar como la repetibilidad entre Clínicos se ve afectada por la gravedad o visibilidad de menisco, las mediciones realizadas por los dos investigadores se compararon par por par en cada uno de los grupos generada por la evaluación del Clínico de Referencia. En los conjuntos de datos de la lámpara de hendidura, no se detectaron diferencias significativas entre Clínicos en las mediciones obtenidas en el Grado 1 o 2 (t-test; ambos $p \geq 0,339$) (Figura 4.11), sin embargo, se encontraron diferencias significativa entre las evaluaciones realizadas tanto en las imágenes de Grado 3 (t-test; $p = 0,009$) como de Grado 4 (t-test; $p = 0,003$) (Figura 4.11a). Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre las mediciones realizadas por los Clínicos en las imágenes de Tearscope en ninguno de los grados subjetivos (t-test; $p \geq 0,185$) (Figura 4.11b).

4.2.2.2 Análisis de las diferencias de los valores de TMH entre los diferentes grupos subjetivos

Para evaluar la relación entre la apariencia subjetiva del menisco y la medición del TMH, se calcularon las diferencias entre los cuatro subgrupos para cada parámetro TMH. Todos los parámetros mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos, con independencia técnica de iluminación (ANOVA; $p \leq 0,001$ para todos los parámetros).

Como se vio en la Tabla 3.1, los Grados 1 y 2 pueden ser agrupados bajo el término de menisco sano o normal, mientras que los Grados 3 y 4 implican un menisco patológico o anormal. Siguiendo este principio, se realizó un estudio de diferencias similar al anterior agrupando a los pacientes bajo estos dos macrogrupos. Nuevamente, en todos los casos se encontraron diferencias significativas en los valores de meniscos creados por la clasificación subjetiva (ANOVA; $p \leq 0,045$ para todos los parámetros), independientemente de la técnica de iluminación utilizada.

4.3 ESTUDIO DE LA OSMOLARIDAD: PRECISIÓN DE UN OSMÓMETRO BASADO EN EL DESCENSO DEL PUNTO DE CONGELACIÓN (FISKE 110)

Con el objetivo de determinar las posibles aplicaciones del osmómetro Fiske 110 en el ámbito de la película lagrimal, el estudio fue dividido en tres partes: 1) Estudio de medidas en soluciones estándar de valor conocido no diluidas y diluidas; 2) Estudio de medidas en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto para su comparación con estudios previos similares; y finalmente 3) Estudio piloto *in vivo* para comparar los resultados obtenidos en pacientes del Fiske 110 frente al Osmómetro TearLab.

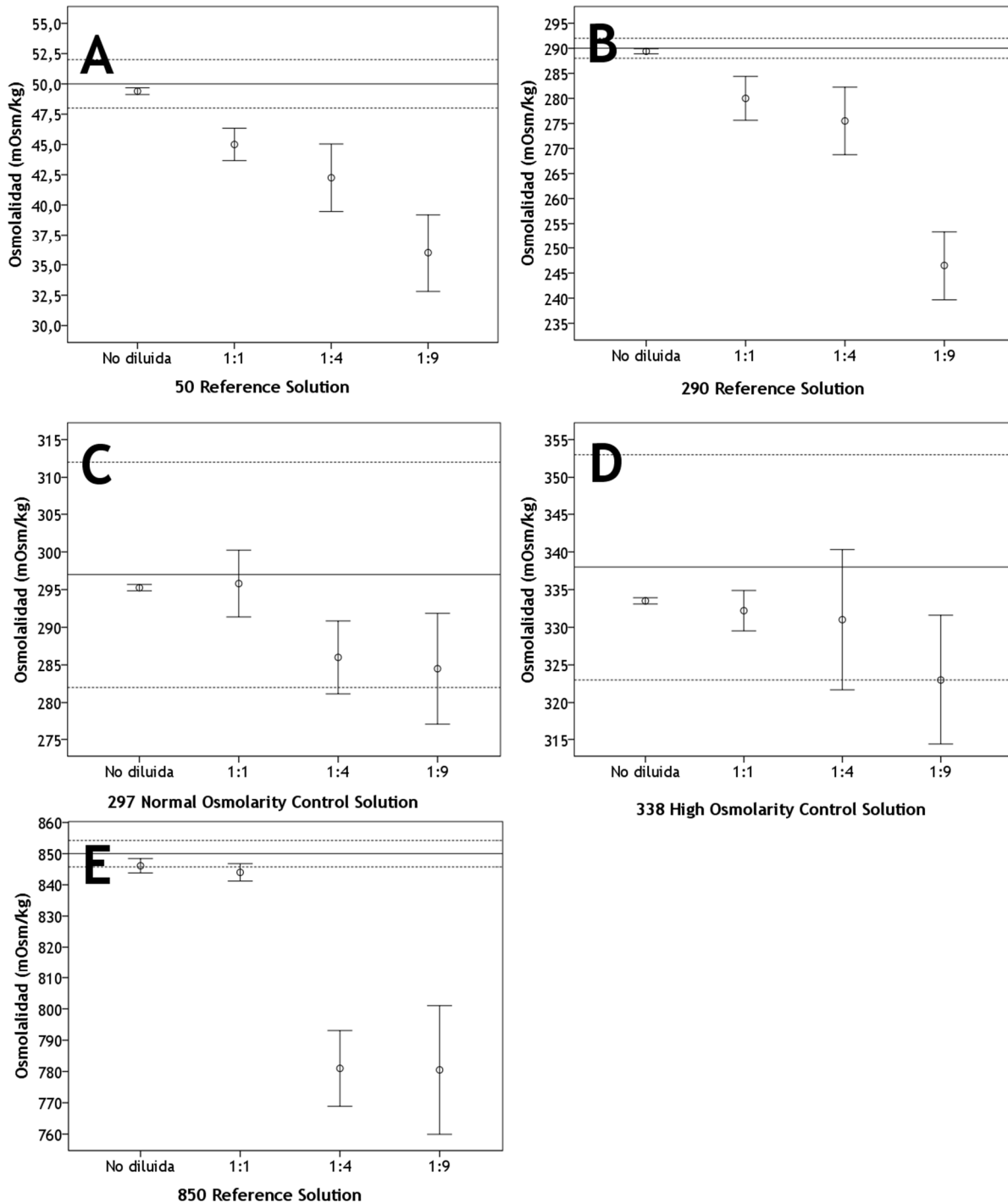
4.3.1 Resultados en soluciones estándar

Los estadísticos descriptivos y las diferencias (t-test para una muestra) obtenidos en soluciones diluidas y no diluidas se muestran en la Tabla 4.17. La columna de la izquierda muestra el valor real que el fabricante atribuye a cada solución, mientras que el valor de diferencia media y significancia (p) se refieren a la diferencia entre los valores obtenidos en el estudio y este valor real. Estos resultados se encuentran ilustrados en la Figura 4.12, que adicionalmente muestra el valor esperado y los rangos de tolerancia para cada una de las soluciones.

Tabla 4.17. Estadísticos descriptivos y diferencia (t-test de una muestra) para las medidas del Fiske 110 en soluciones estándar no diluidas y diluidas. n = 20 medidas. DE = Desviación Estándar

Osm.	Volumen de Muestra (µl) [Dilución]	Media (mOsm/kg)	DE (mOsm/kg)	Mínimo (mOsm/kg)	Máximo (mOsm/kg)	Diferencia Media (mOsm/kg)	P
50	20 (No diluida)	49,40	0,60	49,00	51,00	- 0,60	< 0,001*
	10 (1:1)	45,00	2,87	40,00	50,00	- 5,00	< 0,001*
	4 (1:4)	42,25	5,95	35,00	50,00	- 7,75	< 0,001*
	2 (1:9)	36,00	6,81	30,00	50,00	- 14,00	< 0,001*
290	20 (No diluida)	289,40	0,83	288,00	292,00	- 0,60	0,024*
	10 (1:1)	280,00	9,38	258,00	298,00	- 10,00	< 0,001*
	4 (1:4)	275,50	14,41	250,00	295,00	- 14,50	< 0,001*
	2 (1:9)	246,50	14,61	230,00	280,00	- 43,50	< 0,001*
297	20 (No diluida)	295,25	0,91	293,00	296,00	- 1,75	< 0,001*
	10 (1:1)	295,80	9,47	270,00	310,00	- 1,20	0,577
	4 (1:4)	286,00	10,34	265,00	305,00	- 11,00	< 0,001*
	2 (1:9)	284,50	15,72	260,00	310,00	- 12,50	0,002*
338	20 (No diluida)	333,50	0,89	332,00	335,00	- 4,50	< 0,001*
	10 (1:1)	332,20	5,75	323,00	347,00	- 5,80	< 0,001*
	4 (1:4)	331,00	19,87	281,00	356,00	- 7,00	0,132
	2 (1:9)	323,00	18,38	280,00	360,00	- 15,00	0,002*
850	20 (No diluida)	846,10	4,90	839,00	856,00	- 3,90	0,002*
	10 (1:1)	844,00	5,98	836,00	856,00	- 6,00	< 0,001*
	4 (1:4)	781,00	25,83	730,00	820,00	- 69,00	< 0,001*
	2 (1:9)	780,50	43,95	700,00	860,00	- 69,50	< 0,001*

Figura 4.12. Diagrama mostrando las medidas realizadas en soluciones estándar con el Fiske 110. Las líneas verticales continuas representa el Intervalo de Confianza del 95% en cada dilución. Las líneas horizontales continuas indican el valor real de osmolaridad/osmolalidad de la solución. Las líneas horizontales discontinuas indican el rango de tolerancia facilitado por la compañía fabricante de cada solución. El eje horizontal indica el tiempo de solución empleada (no diluida, 1:1, 1:4 y 1:9). n = 20 medidas. A) Advanced® Calibration Standard 50mOsm/kg; B) Clinitrol™ 290 Reference Solution; C) 297 Normal Osmolarity Control Solution; D) 338 High Osmolarity Control Solution; E) Advanced® Calibration Standard 850mOsm/kg



4.3.1.1 Precisión en la medida de soluciones estándar no diluidas

A pesar de que en el estudio de las diferencias se vio que todas las soluciones no diluidas muestran diferencia con el valor teórico (t-tests; $p \leq 0,024$ para todos los análisis), los resultados obtenidos se encuentran dentro de los rangos de tolerancia propuestos por el fabricante (Tabla 3.4; Tabla 4.17; Figura 4.12), con la única excepción de las medidas en la solución Advanced Calibration Standard 850mOsm/kg H₂O (Tabla 4.17; Figura 4.12e).

4.3.1.2 Precisión en la medida de soluciones estándar diluidas

Todos los resultados mostraron diferencia significativa con el valor teórico de las soluciones (t-tests; $p \leq 0,002$ para todos los análisis), excepto en las solución de 297 mOsm/l usando la dilución de 10 μ l (1:1) (t-tests; $p = 0,577$) y 338 mOsm/l usando la dilución de 4 μ l (1:4) (t-tests; $p = 0,132$). Todas las diluciones de las tres soluciones de la compañía Advanced Instrumentes (50, 290, 850mOsm/kg) mostraron valores fuera de los rangos de tolerancia permitidos (Tabla 3.4; Tabla 4.17; Figura 4.12a, Figura 4.12b; Figura 4.12e). Por el contrario, las diferencias medias y mínimos en el caso de las soluciones de la compañía TearLab Corp. (297 y 338 mOsm/l) estaban dentro de los rangos de tolerancia dados por el fabricante, con la excepción de las diluciones 1:4 y 1:9 (Tabla 3.4; Tabla 4.17; Figura 4.12c; Figura 4.12d). Además, como se puede ver en la Figura 4.12, cuanto más diluida se encuentra la muestra, mayores son los Intervalos de Confianza del 95%, por lo que, a mayor dilución de la muestra mayor es el error resultante.

4.3.2 Resultados en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto

La Tabla 4.18 muestra los estadísticos descriptivos de las medidas realizadas en soluciones salinas, multipropósito y el peróxido neutralizado y sin neutralizar. Se proporciona además lo resultados obtenidos en estudios similares por Dalton et al. [181] y Abengozar-Vela et al. [273].

Tabla 4.18. Estadísticos descriptivos para las medidas del Fiske 110 en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto y resultados obtenidos en estudios previos. n = 10 medidas. DE = Desviación Estándar

Nombre comercial	Estudio actual (mOsm/kg)	Dalton et al. [181] (mOsm/kg)	Abengozar-Vela et al. [273] (mOsm/kg)
	<i>Media \pm DE</i>	<i>Media \pm DE</i>	<i>Media \pm DE</i>
Softwear Saline	300,30 \pm 0,82	303,50 \pm 1,52	-
SoloCare Aqua	309,10 \pm 2,33	310,00 \pm 1,26	310,90 \pm 0,43
Opti-Free Express	224,40 \pm 1,51	225,00 \pm 1,79	233,70 \pm 0,31
ReNu Multiplus	293,40 \pm 1,17	286,20 \pm 2,23	299,57 \pm 0,27
ReNu Sensitive Eyes MPS	293,50 \pm 0,71	286,70 \pm 3,61	-
AOsept (neutralizado)	297,30 \pm 0,67	290,70 \pm 2,94	293,27 \pm 0,25
AOsept (sin neutralizar)	1320,80 \pm 2,35	1325,20 \pm 4,75	-

Según los resultados, las soluciones se agrupan en tres grupos diferenciados: ReNu Multiplus, ReNu Sensitive Eyes MPS y AOsept neutralizado, con valores entre 293 y 297mOsm/kg que los hacen ligeramente hiposmóticos con respecto a la lágrima humana; Softwear Saline y SoloCare Aqua, que oscilan de 300 a 309mOsm/kg, muy similares a la lagrima; y Opti-Free Express, cuyo valor de 225mOsm/kg lo hace bastante diferente del valor lagrimal (Tabla 4.18). Por otro lado, el peróxido no neutralizado muestra propiedades físicas muy diferentes al resto de las soluciones (Tabla 4.18).

4.3.3 Concordancia en las medidas in vivo entre el osmómetro Fiske 110 y el osmómetro TearLab

La Tabla 4.19 muestra los estadísticos descriptivos de las medidas obtenidas en cada grupo de 60 pacientes. Como se explicó en material y métodos, en cada paciente se realizó

una medida de TearLab y posteriormente una de Fiske 110 usando la cánula de 2 o de 4 μ l (pero no ambas).

Tabla 4.19. Estadísticos descriptivos para las medidas en pacientes de los protocolos TearLab vs. Fiske 110 (4 μ l) y TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l). n = 60. DE = Desviación Estándar

Protocolo	Instrumento	Media	DE	Mínimo	Máximo
TearLab vs. Fiske 110 (4 μ l)	TearLab (mOsm/l)	300,02	10,18	277,00	315,00
	Fiske 110 (4 μ l) (mOsm/kg)	286,53	16,54	235,00	319,00
TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l)	TearLab (mOsm/l)	305,58	11,71	284,00	330,00
	Fiske 110 (2 μ l) (mOsm/kg)	268,80	30,53	220,00	350,00

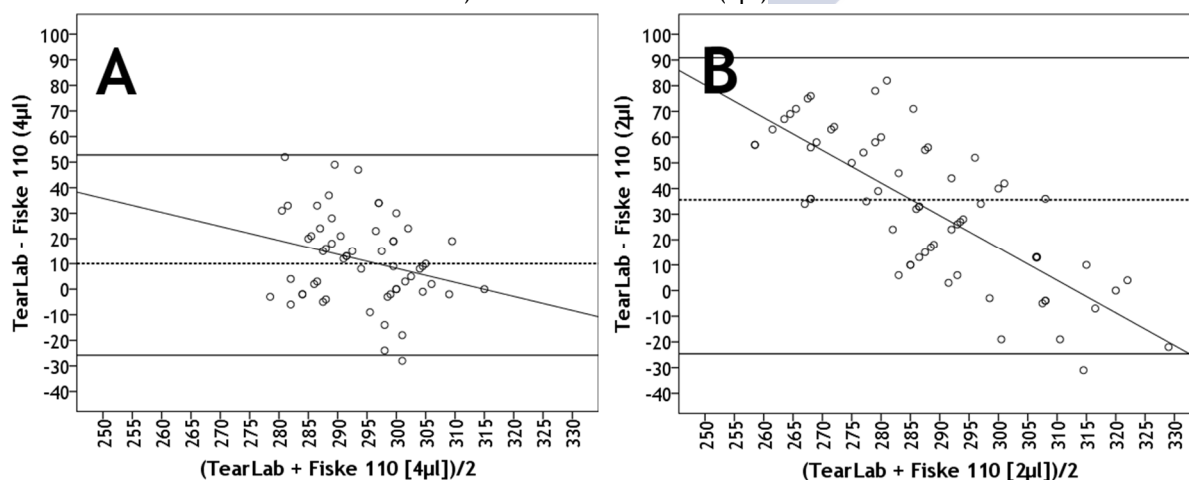
La Tabla 4.19 muestra los resultados de t-test para muestras relacionadas entre los dos osmómetros para cada grupo: 1) TearLab vs. Fiske 110 (4 μ l); y 2) TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l). En ambos casos, se detectó una diferencia significativa entre ambos osmómetros ($p < 0,001$), siendo las diferencias menores en la relación TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l) (Tabla 4.20).

Tabla 4.20. Diferencias medias (t-test para muestras relacionadas) de osmolaridad obtenidas entre las medidas usando TearLab vs. Fiske 110 (4 μ l) y TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l). n = 60. DE = Desviación Estándar; IC 95% = Intervalo de Confianza del 95%

Protocolo	Diferencia media	DE	P	IC 95%	
				Mínimo	Máximo
TearLab vs. Fiske 110 (4 μ l)	13,49	20,06	< 0,001*	- 25,83	52,81
TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l)	35,61	30,76	< 0,001*	- 24,64	95,80

La Figura 4.13 muestra el análisis de Bland y Altman de las medias frente a las diferencias entre ambos osmómetros en cada grupo. Esta figura ilustra que el error es menor cuando utilizamos la cánula de 4 μ l. Además, puede verse que el osmómetro Fiske 110 comparado con el TearLab, infraestima los valores de baja osmolaridad, mientras sobreestima los de alta. Esta tendencia se ve estadísticamente confirmada por el análisis de correlación entre medias y diferencias (TearLab – Fiske 110 (4 μ l), media vs. diferencia; $r = - 0,40$ $p < 0,001$; TearLab – Fiske 110 (2 μ l), media vs. diferencia; $r = - 0,76$ $p < 0,001$).

Figura 4.13. Media frente a la diferencia media (Bland y Altman) de los valores obtenidos entre ambos osmómetros en sujetos. La línea punteada horizontal representa el valor de diferencia media. Las líneas sólidas horizontales representan los valores del Intervalo de Confianza del 95%. n = 60. A) TearLab vs. Fiske 110 (4 μ l); B) TearLab vs. Fiske 110 (2 μ l)



5. DISCUSIÓN

Mantener la estructura y función de la película lagrimal, es esencial para que pueda existir una correcta visión y confort ocular. El SOS es una enfermedad de la SO cuya prevalencia ha aumentado en los últimos años hasta afectar a un 10-35% de la población, influyendo a la calidad visual y por tanto a la calidad de vida de las personas[1-5]. El envejecimiento de la población, los hábitos derivados del uso de pantallas electrónicas, la cada vez mayor exposición al Síndrome del Edificio Enfermo, el aumento creciente de la contaminación ambiental, el aumento en la incidencia de patologías oculares y sistémicas con repercusión en la lágrima, el mayor consumo de fármacos, etc., hace que la prevalencia del SOS sea creciente. Se trata de una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la UFL, con síntomas de disconfort ocular, alteraciones visuales, inestabilidad de la película lagrimal y daño de la SO[1, 6-9]. Para intentar llegar a un consenso se emitieron los informes del *DEWS* de 2007[1, 6, 10-13] y del taller internacional sobre la DGM en 2010[14-22]. Entre sus conclusiones se destaca que los tests clínicos de diagnóstico presentan una variabilidad importante, debido principalmente a la subjetividad de las pruebas diagnósticas; todos estos hechos son responsables también de la amplia variabilidad de los estudios epidemiológicos.

Debido a la gran variabilidad de los tests [96-100] y la naturaleza multifactorial de SOS, el diagnóstico de esta enfermedad es controvertido, requiriendo la combinación de test clínicos y cuestionarios de síntomas[13]. Además, parece existir una baja correlación entre ellos [148], e incluso en lo referente a síntomas y signos [13, 51]. Actualmente, las técnicas de grabado permiten una evaluación a posteriori más objetiva y exacta por parte del clínico [36, 95]. El uso de software de grabación permite que las pruebas sean menos subjetivas y más reproducibles. Debido a esto, el software de asistencia clínica está ganando relevancia en el área de las ciencias de la visión [37, 38, 102-107]. Se destaca especialmente, el uso de software de análisis basados en código libre, que ya han tenido aplicación en numerosos campos de la ciencia [101].

El campo que parece mostrar resultados prometedores en el diagnóstico del SOS, es el análisis de pruebas de estabilidad y volumen lagrimal[93, 94]. Tasas de evaporación más altas tienen un impacto considerable en la dinámica de la película lagrimal, la estabilidad y la osmolaridad [78, 93-95, 126, 127]. La evaporación lagrimal es una explicación física consistente para la aparición de rupturas o anomalías en la película lagrimal entre parpadeos. Habitualmente, este proceso se estudia mediante pruebas como el TBUT. Pese a la buena repetibilidad y sensibilidad diagnóstica de esta prueba, siguen existiendo incongruencias que no pueden explicarse. Una de sus grandes limitaciones es que no se entiende plenamente su significado. Además, la forma clásica de esta prueba se encuentra limitada por no estudiar los efectos que se producen tras la primera ruptura [74, 75].

Por otro lado, se sabe que la osmolaridad se encuentra fuertemente relacionada con los procesos evaporativos de la lagrimal [93-95], siendo uno de los mecanismos centrales en la patogénesis del SOS [65, 66, 85]. Los pacientes con SOS presentan hiperosmolaridad, la cual desencadena una cascada de eventos inflamatorios en las células epiteliales de la córnea y conjuntiva aumentando la producción de citoquinas [89-92] y produciendo inflamación de la SO. El principal inconveniente que presenta esta prueba a pesar de su objetividad, es su gran variabilidad y acceso limitado a profesionales clínicos por ser una prueba generalmente de laboratorio.

Técnicamente, la osmolaridad se define como el número de partículas de soluto disueltas en un kilogramo de solución, independientemente de la forma, el tamaño, la densidad, configuración o carga de las mismas [78]. El aumento de la concentración de proteínas y electrolitos provoca una reducción en el volumen de lágrima que irrita inicialmente la superficie ocular, y que va a causar inflamación y daño, induciendo un adelgazamiento de la capa lipídica que permite un aumento de la evaporación [78, 93-95, 126, 127]. Aunque las teorías actuales predicen aumentos en la osmolaridad de la película lagrimal [6], existen pocos estudios que han analizado esta relación.[79, 127].

5.1 ESTUDIOS DE LA ESTABILIDAD DE LA PELÍCULA LAGRIMAL

La producción de la película lagrimal es un proceso muy complejo [40, 78, 268, 274]. Un buen equilibrio en su producción, distribución y eliminación es de vital importancia para la para que la película lágrima pueda cumplir sus numerosas funciones y para la salud de la SO.

Como se ha comentado, actualmente el test más utilizado para analizar la estabilidad lagrimal es el TBUT [1, 6-8, 32-41, 71, 72, 74-76]. La sensibilidad y especificidad de este test para el diagnóstico del SOS es relativamente buena comparada con otros test según el informe *DEWS* del 2007 [13]. Además, los hallazgos indican que las pruebas comúnmente usadas en el diagnóstico de esta patología tienen baja repetibilidad, siendo el TBUT una de las que menos aquejan este problema [39, 50, 267]. Se ha descrito que para la reducir la variabilidad, el volumen de fluoresceína utilizado previo a su visualización debe ser estandarizado, por lo que en todos los protocolos llevados a cabo en el presente trabajo, se instilo una cantidad controlada de 2 µl mediante una micropipeta[1, 32-35]. Además, para mejorar la visibilidad de la fluoresceína sobre la córnea, las observaciones en lámpara se hicieron bajo x200 aumentos (objetivo x16, ocular x12.5) con un filtro azul cobalto y un amarillo Wratten 12 combinados [32].

Hasta la fecha existe un alto grado de controversia en cuál es el criterio diagnóstico más adecuado para el TBUT [1, 6, 33, 37, 39, 41]. Clásicamente (utilizando grandes cantidades no controladas de fluoresceína), se ha propuesto que un tiempo de ruptura menor o igual a 10 segundos indicaba un estado patológico, mientras que uno superior se tomaba como normal o sano [1, 37, 73, 75]. Para el método utilizado en el presente trabajo de investigación (instilando 2 µl de fluoresceína), el criterio de corte recomendado para el diagnóstico es un tiempo menor de 5 segundos [1, 6, 32, 33, 37, 41]. En concordancia con esta propuesta, en los resultados obtenidos en nuestros estudios puede verse que los valores de media/mediana se encuentran más cercanos a esta cifra que a los 10 segundos clásicamente propuestos (Tabla 4.1; Tabla 4.6; Tabla 4.9; Tabla 4.12).

Por otro lado, hay que señalar que el TBUT sólo examina la primera ruptura de la película lagrimal, sin controlar los acontecimientos posteriores. Por lo tanto, esta prueba podría ampliarse midiendo el área, la forma de la misma y su velocidad de ruptura, así como el tiempo que los sujetos son capaces de mantener los ojos abiertos o intervalo máximo de parpadeo (MBI); todo ello como indicador de la calidad de la película lagrimal [36, 74-76]. El MBI añade nueva información, ya que indica cuando la ruptura de la película lagrimal provoca malestar, por lo que se relaciona con la sensación subjetiva que obliga a una persona a parpadear [74, 75, 104]. La principal ventaja que presenta el uso y combinación de estos dos parámetros es su bajo costo y su fácil interpretación en la clínica.

Para mejorar la objetividad y la precisión, en el presente trabajo, todos los análisis de TBUT o MBI se realizaron en video-captura con un programa diseñado especialmente para ello (Figura 3.1; Figura 3.2). Cuando se determina en tiempo real, sólo hay una oportunidad, y la ruptura de la película lagrimal puede ocurrir a veces en una región corneal diferente al área bajo enfoque, alterando los resultados. Además, ambos parámetros se determinaron por clínicos expertos mediante asistencia por software para interpretar video-captura (Figura 3.3). Uno de los beneficios de utilizar software interno y especialmente diseñado es optimizar la visualización y captura de la imagen, mejorando la fiabilidad de las mediciones. Cabe señalar que en ningún estudio se utilizó cronometro. Como se mencionó en la sección de material y métodos, TBUT y MBI se determinaron contando fotogramas de vídeo (15 fotogramas = 1 segundo), aumentados así la resolución temporal. Además, el uso de un programa adicional diseñado para seleccionar los fotogramas de interés en las grabaciones la hace más rápida y sencilla.

Estudios previos de Nicholson et al. [50] y Cho et al. [74, 75] demostraron que la realización de una promediación en las medidas mejora la repetibilidad del TBUT. Estos estudios encontraron que la primera vez que se producía la ruptura era significativamente diferente a la segunda, mientras que la segunda y la tercera no eran diferentes entre ellas, por lo que tomándose el valor medio de dos o tres medidas se aumenta la repetibilidad. Siguiendo este principio, en todos nuestros trabajos se realiza la promediación de varias medidas como valor de referencia, llegándose incluso en algunos a utilizar más de un método de promediación para analizar cómo ello puede influir en los resultados [36, 39, 50, 267, 268]. Cuando se comparan los resultados de diferentes estudios, las discrepancias en los diferentes métodos de promediado usados para medir el TBUT o el MBI pueden causar problemas, especialmente cuando un paciente es referido a un clínico que utiliza un método de promedio diferente, o cuando un paciente es evaluado con diferentes métodos de promedio durante el seguimiento a largo plazo.

5.1.1 Análisis de la variación diurna del TBUT en pacientes sanos mediante software de apoyo para grabaciones digitales en video

5.1.1.1 Variaciones diurnas en la ruptura de la película lagrimal

Como se comentó, un correcto equilibrio en la producción, conservación y eliminación es de vital importancia para la película. Es conocido que la composición de lágrima varía durante el día [122, 163, 275]. A pesar de esto, las variaciones diurnas en la estabilidad de la película lagrimal no han sido claramente establecidas.

Diversos estudios han estudiado la variación diurna en la estabilidad de la película lagrimal [224, 262, 276, 277]. El primero de estos estudios fue el de Patel et al. [276], donde la estabilidad de la película lagrimal se examinó utilizando un queratómetro (sin instilación de

fluoresceína) en 10 sujetos jóvenes sanos en intervalos de 2 horas entre las 8am y las 8pm (9 veces por sesión) concluyendo que la estabilidad de la película lagrimal varía durante el día, siendo inferior en el comienzo pero estabilizándose rápidamente. En un estudio realizado por Walker et al. [262], se midió en dos sesiones separadas 6 horas el TBUT a 21 pacientes con SOS, encontrándose con que no había diferencias significativas entre las mediciones de la mañana y la tarde. Bitton et al. [277] encontraron resultados similares al medir el NIBUT a 15 sujetos sanos a las 10pm (medida de referencia), a las 7am (recién levantados), y luego cada hora hasta las 10am. Ambos estudios son consistentes con los resultados del presente estudio, salvo que en uno se realizó en pacientes sanos y otro en patológicos. Por otra parte, Lira et al. [224] encontraron una disminución en el TBUT entre la tarde (5 pm – 6 pm) y la mañana (9am - 10am) en 21 sujetos sanos, lo que difiere tanto del estudio actual como los de Walker et al. [262] y Bitton et al. [277]. Aunque como puede verse, hay mucha controversia sobre la estabilidad diurna de la película lagrimal, su importancia viene dada porque se ha observado que ésta parece ser diferente entre individuos sanos y patológicos [224, 276, 277].

Se ha propuesto que la variabilidad inherente a la decisión del punto de ruptura en el TBUT, es lo que provoca que no sea imposible determinar la verdadera variabilidad diurna, dando lugar a esta amalgama en los resultados [224, 262, 276, 277]. Para examinar una de las posibles fuentes de variabilidad, la variación diurna se analizó siguiendo dos métodos de promediación diferentes, tal y como se comentó anteriormente: usando el valor medio de las tres medidas realizadas en cada sesión (3_TBUT)[36, 39, 50, 267, 268] o el valor medio de las dos medidas más similares en cada sesión (2_TBUT) [36, 39, 50, 267]. Sin embargo, en ninguno de los dos casos se detectó la existencia de variación diurna (Tabla 4.2; Figura 4.1).

Es importante resaltar que una de las principales fortalezas de nuestro estudio respecto a los anteriores, fue la determinación del TBUT en cuatro sesiones repartidas a lo largo de un día con un método asistido por software utilizado por clínicos con experiencia en interpretar la estabilidad de la película lagrimal. De esta manera, la fiabilidad y la resolución temporal de nuestras mediciones fueron mayores que la de estudios previos.

5.1.1.2 Correlación entre TBUT y MBI

Los valores medios de MBI obtenidos en este estudio (Tabla 4.1) son inferiores a los obtenidos por Liu et al. [75] y Begley et al. [74]. Esta discrepancia podría reflejar la alta variación inherente al MBI, que se observa tanto en el presente trabajo (rango 4,73 a 111,33 segundos), como en los estudios realizado por Liu et al. (Media \pm DE = 36,1 \pm 37,6) o Begley et al. (Media \pm DE = 56,5 \pm 38,9). En estos estudios, los datos MBI mostraron un rango más amplio en los controles que en los sujetos con ojo seco [74, 75].

Se detectó una correlación mayormente sustancial entre el TBUT y el MBI (Tabla 4.3), en concordancia con los estudios previos [74, 169]. Esta correlación podría venir justificada por otros parámetros como el área de ruptura, tal y como Goto et al. [169] y Begley et [74] observaron en pacientes con SOS, donde grandes áreas de ruptura lagrimal presentaban períodos relativamente corto de MBI, mientras que sujetos control mostraban un área más pequeña de ruptura y un MBI mayor.

5.1.1.3 Variabilidad entre dos Clínicos

Para evaluar la repetibilidad entre clínicos, las grabaciones de TBUT realizadas en el estudio fueron interpretados por otros dos clínicos experimentados además del usado anteriormente de referencia. Aunque el ICC indicó estrecha concordancia entre ellos (ICC =

0,81, $p < 0,001$), el Intervalo de Confianza del 95% indicó un rango más amplio de lo deseado en todos los casos (Tabla 4.4). A pesar de las claras instrucciones dadas, la principal fuente de variabilidad entre Clínicos es probablemente debida a las diferencias en la interpretación. Esto sugiere que la definición de ruptura de la película lagrimal como el "tiempo hasta que apareció una mancha oscura" podría ser insuficiente. En nuestro estudio, la ruptura de la película lagrimal se tomó como el momento en el que el punto de ruptura "oscuro" era complemente "negro" en lugar de "verde oscuro", ya que este segundo color representa adelgazamiento de la película lagrimal y no puramente ruptura. A veces, la ruptura de la película lagrimal puede ser demasiado gradual, y es difícil establecer el punto exacto de ruptura. Además, la visualización de la ruptura de la película lagrimal se veía comprometida cuando se producía cerca del limbo o párpados, ya que estos se ven "oscuros" a través de la lámpara durante los protocolos con fluoresceína, y pueden falsear u ocultar la media en algunas ocasiones. Cabe destacar que la repetibilidad entre Clínicos mejoró en los valores menores de TBUT (Tabla 4.5; Figura 4.2). Esto sugiere beneficios al limitar la duración de la prueba a 15 segundos, valor mucho mayor que los valores de corte propuestos para el diagnóstico del SOS de 5 [1, 6, 32, 33, 37, 41] y 10 segundos [1, 37, 73, 75].

5.1.2 Análisis de la correlación entre la estabilidad de la película lagrimal y los lípidos meibomianos del margen palpebral

En esta sección del estudio se analizó la relación entre estabilidad lagrimal mediante el TBUT y el MBI, y la cantidad de lípidos producidos por las Glándulas de Meibomio en el parpado inferior medida mediante Meibometría. Este análisis se realizó en varias promediaciones. Se detectó una esperada relación estadísticamente significativa entre estabilidad lagrimal y la producción de grasa (Figura 4.3 a Figura 4.6); mayores valores de lípidos meibomianos se correlacionaban con mayores tiempos en el TBUT y el MBI (indicando una calidad mejor de la película lagrimal). Esta tendencia también fue observada cuando se hizo un clúster en la muestra en base a sus síntomas mediante el OSDI (Tabla 4.7), con una correlación más fuerte entre ambas pruebas en pacientes sintomáticamente moderados y aún mayor en pacientes con un valor que los clasificaba como severos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Versura et al. [193], que reportó correlaciones entre los resultados del Meibómetro y los valores de TBUT y OSDI, especialmente en pacientes patológicos.

En la película lagrimal, la capa lipídica es la encargada de evitar o minimizar los procesos evaporativos entre parpadeos, así como de dar estabilidad a toda la estructura lagrimal [269, 270]. Es necesaria la existencia de un parpadeo completo, ya que éste es encargado físico de distribuir a esta capa por toda la superficie [271]. Se ha detectado, que el cierre forzoso de los parpados aumenta la secreción meibomiana y con ello el grosor de la capa lipídica [40, 268, 271], por lo que las propiedades fisicoquímicas de los lípidos meibomianos y su correcta secreción son esenciales para una correcta estabilidad lagrimal[40].

El SOS y la Disfunción de las Glándulas de Meibomio (DGM) son condiciones comunes que causan síntomas de disconfort y distorsiones visuales que afectan a la calidad de vida [1, 6-8, 20, 21, 35, 149-151, 187, 278]. Las Glándulas de Meibomio juegan un papel fundamental en la producción lagrimal por la contribución lipídica que hacen para generar la capa lipídica [18, 189]. Se ha visto que su disfunción desestabiliza la producción lagrimal y genera la aparición de SOS de carácter evaporativo [1, 6-8, 18, 20-22, 149-151, 189]. La Meibometría es una técnica desarrollada para medir la producción basal de la grasa meibomiana en el

margen palpebral, los cuales han demostrado estar alterados en la DGM [194]. Siendo un test sencillo, el Meibometer MB550 (Figura 3.21) utiliza la fotometría para cuantificar los niveles de lípidos en este margen palpebral en el periodo entre parpadeo [189, 193-199]. En concordancia con el presente estudio (Tabla 4.8), la literatura previa ha mostrado diferencias en los resultados con este aparato entre pacientes control y aquellos patológicos con DGM o diferentes subclases de SOS [193, 194]. Es importante tener en cuenta que la relación significativa entre lípidos meibomianos y la estabilidad de la película lagrimal obtenidos en este estudio se encuentra en general para todos los métodos de promediación utilizados, tanto en valores TBUT como de MBI.

A pesar de los resultados, el Meibómetro muestra dos grandes deficiencias. En primer lugar, el movimiento del lazo de cinta a través de la unidad fotométrica se realiza manualmente, añadiendo una gran variabilidad a las curvas y creando diferencias entre investigadores [198]. Para minimizar la influencia de este efecto en el presente estudio todas las medidas fueron realizadas por un único clínico, y se realizaron diferentes métodos de promediado en las curvas obtenidas. En este sentido, se encontraron correlaciones más fuerte cuando se utilizaba la media de Meibómetro que recogía únicamente los valores más altos en las curvas (Meibo_1) (Figura 4.3a; Figura 4.3a; Figura 4.5a; Figura 4.6a). En segundo lugar, la línea de contacto que se hace con la cinta en el tercio central del párpado central es igualmente manual, dependiendo mucho de la pericia o cuidado del clínico. Es importante tener en cuenta que la DGM puede ser focal o difusa, haciendo que la Meibometría sea vulnerable a mediciones inconsistentes dentro de un párpado dependiendo del sitio de recolección del lípido[189, 194].

5.1.3 Análisis de la relación entre el área y velocidad de ruptura lagrimal con el TBUT y la osmolaridad lagrimal

En este estudio se utilizó una extensión del TBUT convencional [240] para obtener los valores del área y velocidad de ruptura lagrimal, y analizar su relación con el propio TBUT y la osmolaridad lagrimal. En ambos casos, se vio que existía una correlación entre estos test. La ruptura de la película lagrimal inducida por la evaporación es una explicación física consistente para la formación de líneas y puntos oscuros sobre la uniformidad de la película lagrimal durante los tiempos entre parpadeos[93, 94]. Como se comentó, normalmente el TBUT se toma como el tiempo entre el parpadeo y la aparición de la primera ruptura, sin prestar atención a eventos posteriores [74-76]. Este tipo de información generalmente omitida, podría ayudar a evaluar de manera más precisa la calidad de la película lagrimal, sobre todo en casos en los cuales los valores de TBUT no explican los síntomas de sequedad de un paciente o cuando valores bajos se observan en pacientes asintomáticos.

En este mismo trabajo se pudo ver que la principal fuente de variabilidad en el TBUT entre clínicos es la interpretación de imágenes, aun cuando se tienen instrucciones claras. La identificación de ruptura no es sencilla cuando se quiere hacer de manera detallada. Un estudio de Begley et al. [104] mostró que los valores en la intensidad de pixel podían afectar a las medidas y crear diferencias entre investigadores. Por ello, a la hora de hacer las medidas de este estudio, la intensidad de pixel fue controlada con el fin de mantener sus valores en los menores rangos posibles (de 0 a 10) [104].

El análisis de imágenes asistido por ordenador podría eludir el problema de la variabilidad entre medidas mediante el examen en el tiempo de la ruptura. Como una extensión de TBUT, el S-TBUD [74, 75, 127], además del tiempo de ruptura inicial, evalúa el

proceso de ruptura hasta el siguiente parpadeo. Un mayor número de puntos de medida confieren al método mayor objetividad y amplían la información proporcionada [95]. El protocolo utilizado aquí es una versión adaptada del S-TBUD mediante software de código abierto [240]. Además y como ya se comentó, en el presente estudio también se utiliza un programa especialmente diseñado para seleccionar los fotogramas de interés sin necesidad de utilizar el cronómetro: para determinar TBUT, SB y AB se contaban los fotogramas de vídeo (15 fotogramas = 1 segundo), lo que deja una resolución mayor que para las mediciones en tiempo real.

Los datos de ruptura indican que el AB es generalmente pequeño, con una media para la muestra total en su máxima extensión (correspondiente al punto AB_F) de $3,50 \pm 4,02\%$ del total de la córnea (Tabla 4.9). Este dato es similar al encontrada por Himebaugh et al. [73] ($2,13 \pm 3,99\%$ en pacientes control; $4,94 \pm 6,18\%$ en pacientes de SOS), pero más bajo que los resultados obtenidos por Begley et al. [74] ($13,7\% \pm 16,5$ en pacientes control; $24,5\% \pm 12,7$ en pacientes de SOS) y Liu et al. [75] ($16,1 \pm 9,2$ en pacientes control; $30,7 \pm 12,5$ en pacientes de SOS). Sin embargo, en estos últimos estudios se tomaba como referencia de ruptura las áreas “oscuras” y no únicamente aquellas completamente negras (que nosotros atribuimos a adelgazamientos y no a ruptura propiamente dicha). Además, las muestras utilizadas en estos estudios eran más pequeñas (10 sujetos control y 10 sujetos con SOS de ambos casos), y más estratificada que en el presente estudio (siguiendo la hipótesis con la que se trabaja en el presente trabajo, que pacientes con sequedad presentan áreas de rotura mayores, un mayor número proporcional de pacientes con sequedad ocular generaran medias generales de rotura mayores).

Por otro lado, los datos en la Tabla 4.9 indican que en vez de ser constante en su evolución, la velocidad de ruptura parece incrementarse con el tiempo. La velocidad de ruptura fue calculada únicamente para los segundos 1 y 2 después de la aparición de la ruptura y justo antes del parpadeo, debido a la limitación impuesta por algunos intervalos interparpadeo. Esta necesidad limita el tiempo que el paciente tiene su ojo abierto, y con el fin de evitar distintos tiempos de referencia entre pacientes, los puntos de medida tomadas estaban limitados a aquellos presentes en cada grabación y que por tanto podían ser analizada en referencia a cada paciente. En futuros trabajos, sería interesante determinar cómo varía la velocidad de ruptura a través de otros intervalos de tiempo.

En el análisis de correlación se observó que tiempos cortos de TBUT estaban correlacionados con áreas de ruptura más grandes y un incremento mayor en su evolución (Tabla 4.10). Como ya se comentó, en la metodología aquí utilizada (instilando $2 \mu\text{l}$ de fluoresceína), un tiempo igual o inferior a 5 segundos se considera el punto de corte para el diagnóstico del SOS [1, 6, 32, 33, 37, 41]. Se han propuesto diferentes valores para clasificar la gravedad de los pacientes, sin haber todavía un consenso. Behrens et al. [41], a través de su “*Panel de Delphi: Sistema de clasificación de gravedad del ojo seco*”, propone cuatro valores de TBUT diferentes para definir la gravedad de esta enfermedad (de menor a mayor gravedad: valores variables, ≥ 10 segundos, ≥ 5 segundos y valores inmediatos); criterios aceptados por el DEWS como uno de los más útiles [6]. Siguiendo este principio, se estratificó la muestra bajo diferentes criterios de corte para ver cómo ello podía influir en los resultados, [1, 32, 33, 37, 41]. Se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos generados (ANOVA para todos los parámetros $p \leq 0,002$, excepto AB_0: Figura 4.7). Ambos análisis, correlación y ANOVA, siguieron la misma tendencia: los valores de TBUT eran inversamente proporcional a los valores de AB y SB (Tabla 4.11).

La osmolaridad lagrimal mostró también una correlación significativa, en este caso positiva, con AB y SB (Correlación de Pearson $p \leq 0,015$, Tabla 4.11). Como ocurre con el TBUT, se han propuesto un gran número de criterios de corte diagnósticos para la osmolaridad: 307, 312, 316, 317 o incluso 323 mOsm/l [24, 65, 66, 69, 70, 78]; cada uno de ellos con diferente sensibilidad/especificidad. A pesar de que los valores de corte más utilizados son 316 y 317 mOsm/l, no existe un estándar diagnóstico plenamente aceptado. En el presente trabajo, cuando la muestra fue dividida según los criterios de corte escogidos [24, 65, 69, 70, 78, 279], se encontró una diferencia significativa entre todos los diferentes subgrupos en la mayoría de los parámetros (ANOVA; $p \leq 0,001$ para todos los análisis, excepto AB_0; Figura 4.8). Ambos análisis, el ANOVA y la correlación, muestran que un aumento de osmolaridad genera un incremento en las áreas de ruptura y la velocidad de formación.

Los resultados de estos dos análisis, se encuentran en concordancia con Begley et al. [74], Himebaugh et al. [73], and Liu et al. [75], donde se encontraron mayores valores de AB y SB en pacientes con SOS. Los autores de estos estudios sugieren que después de la ruptura inicial, la película lagrimal continúa creciendo en áreas grandes a lo largo de la córnea, como si la propia SO no pudiera soportar de manera correcta la estructura lagrimal [73-75, 95, 169].

Los eventos físicos y químicos dentro de un área de ruptura son desconocidos. La hipótesis de que la mala calidad de lágrima provoca un incremento en la superficie corneal expuesta que estimula el parpadeo, predice que justo después de este parpadeo, la película presenta signos de deterioro, incluso llegando a aparecer directamente “rota”[73, 76]. A pesar de que nunca ha sido demostrado de forma definitiva, se asume que las áreas de ruptura lagrimal representan una ausencia de la capa acuosa, siendo considerados “puntos secos” de la superficie corneal [74]. La ruptura lagrimal provocará puntos de disconfort que son los que finalmente llevan a este parpadeo [75, 76]. Estudios previos han encontrado que los sujetos con SOS son más tolerantes a este disconfort, lo que se relaciona con una desensibilización corneal que puede retrasar este estímulo de parpadeo [75].

Existe una controversia en cómo es la relación entre la estabilidad de la película lagrimal, estudia mediante el TBUT, y la osmolaridad lagrimal. Algunos estudios han encontrado que la osmolaridad posee una fuerte relación con el TBUT, que incluso se incrementa con la severidad del SOS[154], mientras que otros dicen que no existe correlación entre estos test [158]. Una limitación en la utilidad clínica del TBUT es que su medida ignora la mayoría de la información en el tiempo o el espacio de ruptura [95]. Esto puede provocar que dos pacientes con el mismo tiempo de ruptura, posean diferentes desarrollos en área de ruptura o posición de la misma, provocando diferentes severidades reales[95]. El presente estudio muestra que la evolución y extensión de esta área no se encuentra únicamente relacionada con el tiempo de ruptura, sino también con la osmolaridad. Como se dijo, las desecaciones locales se presuponen como “puntos secos”[74, 76], por lo que generaran un incremento rápido de las condiciones hiperosmóticas, que habitualmente se relacionan con SOS y daño de la superficie ocular[74], generando al final la susodicha estimulación celular. Por lo tanto, el estímulo para el dolor dentro de las áreas de ruptura podría ser el resultado de diversos mecanismos que incluyen la hiperosmolaridad [74]. El parpadeo y la secreción refleja lagrimal son procesos naturales que deberían tender a mitigar condiciones prolongadas de hiperosmolaridad local[127]. Es importante destacar el estudio de Bron et al. [280], quienes consideran que la osmolaridad a lo largo de la superficie corneal es mayor que aquella únicamente recogida en el menisco, especialmente debido a los efectos de la evaporación. La toma de muestra del

menisco podría, por tanto, infraestimar la osmolaridad con respecto a la que se encuentra lo largo de la superficie corneal [78, 280].

5.1.4 Estudio piloto para validar la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal utilizando análisis de textura y color

Este estudio tenía como objetivo realizar una primera validación de un programa para la medida automática del tiempo de ruptura lagrimal previamente descrito [228, 242-245] (Figura 3.8). La evaluación automática del TBUT es una herramienta de apoyo al diagnóstico del SOS orientada a la práctica clínica.

Evaluar la robustez de un algoritmo de detección de parámetros del film lagrimal es una tarea difícil, ya que las áreas de sequedad o el tiempo de ruptura, tienen un carácter subjetivo que dificulta su definición exacta. Como ya se comentó, la mayor fuente de variabilidad entre evaluadores a la hora de medir el TBUT es el “decidir” cuando se ha producido realmente la ruptura de la lágrima, y no únicamente un adelgazamiento. En muchas ocasiones, este criterio puede crear diferencias. Este dato puede verse confirmado por las Tabla 4.13 y Tabla 4.14, donde se observa que ambos clínicos presentan diferencias estadísticamente significativas entre sus evaluaciones (Wilcoxon test; $p \leq 0,001$ en todas las situaciones descritas). Asimismo, previamente en este trabajo de investigación, en las Tabla 4.4 y Tabla 4.5 se observó una situación similar, en que en un grupo de tres clínicos, uno de ellos difería significativamente de los demás (Wilcoxon test; $p \leq 0,001$ en todas las situaciones descritas).

Con el objetivo de evaluar el rendimiento del Software automático de medida, se analizaron sus medidas en relación a dos clínicos expertos, como si de otro clínico se tratase. El ICC mostró una correlación sustancial entre las evaluaciones de los tres “clínicos” (ICC = 0,752, $p < 0,001$), denotando un buen funcionamiento del Software. Por otro lado, como se hiciera anteriormente, cuando se analizaron las diferencias entre el Clínico 1 y el Clínico 2, pudo verse que estadísticamente no se podían distinguir los resultados del Software de ninguno de los dos clínicos (Tabla 4.13). Sin embargo, y pese a haber una diferencia media menor, el Intervalo de Confianza del 95% en ambas comparaciones fue mayor que el obtenido entre los dos Clínicos (Tabla 4.13). Es importante mencionar que la diferencia media obtenida en todas las comparaciones, es bastante baja si se ve desde un punto de vista diagnóstico (de $0,315 \pm 2,103$ segundos en Clínico 1 vs Clínico 2; a $-0,195 \pm 3,180$ segundos para Clínico 2 vs. Software); llegando a ser incluso más bajas que las obtenidas en el estudio similar realizado en este mismo trabajo (Tabla 4.4).

Como se hizo anteriormente en el estudio “4.1.1.3 Repetitividad entre Clínicos”, y siguiendo indicaciones de la literatura [36, 39], los análisis fueron nuevamente realizados tomando como muestra únicamente aquellos tiempos de TBUT que se encontraban por debajo de los 15 segundos. Cabe destacar, que los resultados fueron similares, tanto a nivel general (ICC = 0,657, $p < 0,001$, indicando una correlación sustancial entre clínicos) como en las diferencias por pares (Tabla 4.14); sin embargo, los indicadores estadísticos de la dispersión de los datos (Desviación Estándar e Intervalo de Confianza) disminuyeron en todos los casos. Nuevamente, este análisis indica beneficios al limitar la duración de la prueba a 15 segundos, valor mucho mayor que los valores de corte propuestos para el diagnóstico del SOS [1, 6, 32, 33, 37, 41, 73, 75].

Según nuestro conocimiento, la detección automática del tiempo o las áreas de ruptura es un tema poco o nada estudiado de manera profunda en la literatura científica. Uno de los

trabajos principales en la materia fue descrito por Yedidya et al. en diferentes etapas [281-283]. En una serie de trabajos, estos autores proponen dos métodos matemáticos diferentes para la evaluación de la ruptura lagrimal [282, 283], y comparan ambos con medidas de segmentación manual o valores de tiempo de ruptura dados por un clínico (sistema similar al utilizado en el presente trabajo de investigación; Figura 3.7). Dependiendo del estudio y la muestra utilizada, la diferencia media encontrada entre el clínico y el programa oscilaba entre 1.06 y 2.4 segundos [282, 283]. Si se tiene en cuenta que en los trabajos de estos investigadores se hacían las medidas en segundos, un error de 1-2 segundos puede considerarse aceptable. Sin embargo, estos resultados son peores que los presentados en el presente trabajo de investigación, donde se encontraron errores medios mucho menores entre $-0,195 \pm 3,180s$ (Clínico 2 vs. Software) y $0,315 \pm 2,103s$ (Clínico 1 vs. Software) (Tabla 4.13).

Recientemente han sido lanzados al mercado aparatos capaces de medir la estabilidad lagrimal de manera automática, de forma sencilla y no invasiva: el Oculus Keratograph 4 y Oculus Keratograph 5M (Oculus GmbH, Wetzlar, Alemania)[284-286]. Mediante un software llamado TF-Scan que incluye varios test para el análisis de parámetros lagrimales, la estabilidad lagrimal puede medirse por un test similar al NIBUT llamado NIKBUT²⁶. Sin embargo, el NIKBUT parece no presentar un buen acuerdo con protocolos clásicos de TBUT. En dos estudios diferentes, Abdelfattah et al. [284, 285] encontraron que entre un grupo amplio de pacientes patológicos y otro control, no existían diferencias significativas en los valores de NIKBUT, mientras que sí que las había en el método clásico con fluoresceína. Además, pese a lo sencillo de su uso, este protocolo requiere de una alta inversión económica en un aparato especializado para un test simple que se puede realizar de manera rutinaria. En la misma línea del NIKBUT, y tratando de medir la estabilidad lagrimal de manera no invasiva, siguiendo los principios del protocolo propuesto para medir de manera automática el TBUT, los autores del presente trabajo están desarrollando un software paralelo que sea capaz de medir el NIBUT de manera automática y precisa [287].

5.2 ESTUDIO DEL MENISCO LAGRIMAL: VALIDACIÓN DE UN SOFTWARE DE CÓDIGO ABIERTO PARA LA MEDIDA DE LA ALTURA DEL MENISCO

El valor de altura del menisco lagrimal (TMH)²⁷ ofrece una medida clínica útil en la evaluación de la película lagrimal al estar estrechamente relacionado con su volumen [77-81]. Sin embargo, hay una gran controversia en sus principios de medida, provocando a lo largo de la literatura multitud de valores diferentes, variando en ojos de pacientes sanos entre 0,14 y 0,46 mm [24, 53-58, 84, 172, 215, 241, 288-291]. Este amplio rango de valores está influenciado por dos factores principales: la técnica empleada y la propia definición del parámetro medido. En primer lugar, no hay una técnica o dispositivo "estándar" para medir este valor (en general la forma extendida es con la lámpara de hendidura [82, 83]), que implica que las mediciones pueden estar sobreestimadas/subestimados o ser más o menos repetible dependiendo del método utilizado [56, 57]. Ni siquiera existe un consenso en el ángulo utilizado en la observación de menisco con la propia lámpara de hendidura, ya sea con el sistema de iluminación fijado frontalmente al menisco lagrimal [288, 289] o colocada en un ángulo [31, 55, 84]. El segundo factor está relacionado con la definición, ya que no hay

²⁶NIK BUT: non-invasive-Keratograph-break-up time.

²⁷TMH: Tear meniscus height.

acuerdo perfecto entre los diferentes autores de cuáles son los límites reales del menisco [55, 57, 84]. Para solucionar esta gran variabilidad, estos dos factores deben ser estandarizados. Además, el uso de análisis de imagen asistida por ordenador puede mejorar los resultados. El estudio actual utiliza una herramienta semiobjetiva propuesta anteriormente [24, 59, 60, 101, 172, 216, 272, 292], el software ImageJ, para medir la TMH con dos técnicas de iluminación diferentes (Figura 3.14). Este software es de dominio público, basado en Java y fácil de usar, a disposición de todos los profesionales para obtener mediciones rápidas y repetibles.

Las medidas obtenidas en nuestro estudio del TMH en su porción central, fueron similares a los obtenidos en estudios anteriores [53, 56, 266, 288, 290], sin embargo, mediante el uso de ImageJ fue encontrada una Desviación Estándar más baja [53, 266] (Tabla 4.15). Por otro lado, los valores también fueron más bajos que los obtenidos anteriormente con un retículo [49, 266], OCT ([54, 291]) o mediante análisis de imagen [289] (Tabla 4.15). Como se comentó, estas diferencias emergen por las diferencias sistemáticas inter-evaluador en la interpretación del límite superior del menisco lagrimal, y el sistema de iluminación y observación del menisco [53]. En un estudio previo de García-Resua et al. [24], se utilizó la misma técnica de iluminación combinada con el mismo software en pacientes con una gama amplia de edades (rango de 18 a 65 años) y de gravedad de SOS, obteniéndose un valor de $0,20 \pm 0,06$ mm para el TMH-SL. Un valor similar de $0,20 \pm 0,04$ mm en la TMH fue encontrado por Bandlitz et al. [215] utilizando un meniscómetro portátil montado en la lámpara de hendidura combinado con el ImageJ en un grupo de pacientes con un rango de edades (rango de 20 a 67 años) y gravedad del SOS amplios. El valor de TMH medido mediante el uso del Tearscope (TMH-Tc) obtenido en este estudio fue ligeramente menor que el obtenida por Uchida et al. [172], donde también se usó el software ImageJ para medirlo. Las principales razones de estas diferencias entre sus datos y los presente estudio podría deberse a que en su estudio se utiliza una magnificación menor que aquí (12x vs. 40x en este estudio) y la falta de definición establecida de los límites superior e inferior en esta técnica de iluminación.

El análisis del acuerdo entre dos Clínicos en la misma base de datos de TMH, mostró que no existían diferencias entre las medidas realizadas por ambos (Tabla 4.16; Figura 4.10). De acuerdo con Bland y Altman [254], ésta es una de las características esenciales para considerar una técnica clínica aceptable y repetible. Estos resultados muestran que cualquier clínico podría obtener valores similares con la ayuda de este software, y por supuesto, con la misma guía de medición y criterios. Estudios futuros deberían centrarse ahora en analizar también cuanto puede llegar a variar las diferencias intra-evaluador. Sin embargo, cuando la muestra fue dividida en relación al grado subjetivo proporcionado por el clínico de referencia, parece existir una limitación cuando el análisis inter-evaluador se realiza en meniscos disminuidos o irregulares con la lámpara de hendidura. Estas diferencias en los grados 3 y 4 pueden venir debidas a la dificultad de decidir los límites del menisco inferior en situaciones de irregularidad, así como la falta de definición establecida en el límite superior e inferior. Es importante tener en cuenta que la iluminación del Tearscope (Figura 3.11) parece superar este problema.

Por último, cuando se realizó el análisis basado en la evaluación subjetiva del Clínico de Referencia, los resultados numéricos obtenidos con el ImageJ se relacionaron con la evaluación subjetiva, mostrando de manera significativa peores valores según el grado era mayor (Figura 4.11). Estos son los resultados esperados: cuando el menisco es peor, la disminución en el valor TMH es mayor. Además, cuando la muestra se dividía en los

macrogrupos de “meniscos sanos o normales” y “meniscos patológicos o anormales”, el primero mostró valores significativamente más altos que el segundo, independientemente de la técnica de iluminación (Figura 4.11). Una vez más, estos resultados están de acuerdo con la literatura [24, 57, 172, 179], y muestran una buena validación para este procedimiento de medición semiautomática en relación con la clasificación subjetiva.

Hoy en día la combinación de captura de vídeo digital y la asistencia de software abre nuevas posibilidades en el área clínica. Las técnicas de registro nos permiten evaluar imágenes de manera objetiva y precisa, sin pérdida en su calidad por el almacenamiento o reproducción (gracias a formatos tan ubicuos como el TIFF o PNG). En la clínica esto trae la posibilidad de medir los resultados a posteriori, y de detectar detalles que en primer lugar se omitieron o no se observaron. Esta asistencia por software comienza ya a asentarse en el campo del cuidado de la visión con protocolos como por ejemplo la clasificación de patrones de lipídicos [102, 103], la medida del enrojecimiento bulbar [106], la hiperemia conjuntival [105], o para cuantificar vasculatura retiniana [106, 293].

El principal inconveniente que presenta el software ImageJ es que puede consumir demasiado tiempo en el día a día de la práctica clínica. Paquetes informáticos comerciales como Adobe Photoshop, Matlab (Math-Works, Natick, MA) o las herramientas de imagen para Windows se han utilizado para el análisis de imágenes de fotografías oculares [106, 294]. Estos programas tienen una gran utilidad en el análisis de imágenes, sin embargo, todos requieren de una cuota de compra y están limitados por la necesidad de comprar nuevamente las actualizaciones. En contraste, el programa ImageJ (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD) [101] es totalmente gratuito y de código abierto, por lo que tiene muchos paquetes disponibles en continua evolución. El software ImageJ es una herramienta utilizada comúnmente en diversas áreas que van desde la ciencia de los materiales, la astronomía y la climatología, a la imagen médica o el recuento celular, por ejemplo. Además, este software está empezando a ser introducido en el área de la investigación ocular, por ejemplo, en asistencia para OCT [295], medidas en la linfangiogénesis corneal [296], el análisis de capas de la retina en la mácula [295], o en estudios de PIO para medir el canal de Schlemm [297].

Por otro lado, durante los últimos diez años, además del uso del biomicroscopio para su análisis, ha aumentado la aplicación de la tecnología OCT en el análisis de parámetros del menisco lagrimal [54, 61, 291]. Esta técnica ha demostrado una buena repetibilidad [61], sin embargo, su gran problema es que requiere del uso de equipo caro. Ya se comentó que recientemente han sido lanzados al mercado los dispositivos Oculus Keratograph 4 y 5M (Oculus GmbH, Wetzlar, Alemania), topógrafos corneales que incluyen software especializado para el análisis de la película lagrimal [284-286]. Además del NIKBUT ya comentado anteriormente, este aparato permite medir el TMH a lo largo del borde palpebral inferior mediante una regla integrada en el propio programa y varios aumentos, guardando los resultados en la ficha del propio paciente junto a las otras pruebas [286]. Este dispositivo es fácil de usar, sin embargo, presenta el mismo problema principal que la visualización mediante OCT: se requiere de un equipo caro y especializado para una medición rutinaria simple. Por otra parte, estudios recientes de Bandlitz et al. [59, 60, 215, 298] han diseñado un meniscómetro digital portátil (PDM)²⁸, basado en la técnica de meniscometría por reflexión introducida por Yokoi et al. [299, 300], para medir la TMH o el radio del meniscos lagrimal (TMR). El PDM utiliza una pantalla de iPod o iPhone para producir una “diana

²⁸PDM: Portable Digital Meniscometer.

iluminada” de bandas blancas y negras paralelas, que se proyectan en el menisco lagrimal inferior. La principal ventaja sobre sistemas anteriores es que las mediciones son precisas y fiables [59, 60] y de bajo coste gracias a basarse en dispositivos más comunes, y adecuado para su uso tanto en la investigación como en la práctica clínica [60].

5.3 ESTUDIO DE LA OSMOLARIDAD: PRECISIÓN DE UN OSMÓMETRO BASADO EN EL DESCENSO DEL PUNTO DE CONGELACIÓN (FISKE 110)

Como se viene comentado a lo largo de esta tesis, debido a la etiología multifactorial del SOS, su diagnóstico es muy complejo y requiere de la combinación de gran cantidad de pruebas. Todos los tipos de esta enfermedad parecen compartir una osmolaridad elevada en la película lagrimal [1, 6, 159, 301-303]. Siendo una medida cuantitativa de la cantidad de solutos disueltos en una solución, es una técnica relativamente nueva aplicada al campo de la lágrima.

Hasta hace poco, la elección principal para esta medida eran los osmómetros de micro-muestra, aunque en muchas ocasiones estos requerían una cantidad mínima de muestra que era de por sí mayor que la que podía obtenerse del volumen lagrimal [152, 159, 184, 186]. Por el contrario, aparatos como el osmómetro Clifton (Clifton Technical Physics, Hartford, NY) (Figura 2.10a), basado en el descenso del punto de congelación, necesitaban volúmenes muy bajos de muestra para hacer la medida (0,20 μ l) [66, 70, 86-88]. Este osmómetro ha sido considerado el de referencia diagnóstica, pero en este momento su compra no está disponible en Europa. Otra opción desarrollada fue el osmómetro Advanced 3100 Tear Osmometer (Advanced Instruments, Norwood, MA) (Figura 2.10b), también basado en el descenso de punto de congelación. Este osmómetro solo requería de un volumen de muestra de 0,50 μ l, sin embargo, cada medida duraba 9 minutos, y al igual que el Clifton, ha sido retirado del mercado europeo [152]. Para cubrir estas deficiencias, se han diseñado osmómetros como el TearLab (Figura 3.11), basados en el principio de impedancia eléctrica, requiriendo únicamente 0,05 μ l de muestra que se recoge de manera sencilla y directa. Pese a ello, este aparato sigue teniendo dos grandes problemas: los osmómetros basados en el principio de impedancia eléctrica son menos repetibles que aquellos basados en el descenso del punto de congelación, y cada una de las medidas es relativamente cara. Estudios como el de Khanal et al. [98] recomiendan un mínimo de 3 medidas para cubrir el primero de los problemas, pero esto solo magnifica el segundo, haciendo su uso efectivo más caro aún.

Por lo tanto, si se desea utilizar un método basado en el principio de congelación, considerado de referencia diagnóstica, es necesario recurrir a un micro-osmómetro no específico para la media de lágrima humana como el Fiske 110 (Advanced Instruments, Norwood, MA) (Figura 3.16). El principal inconveniente para su uso en este campo, es que requiere de 20 μ l para realizar la medida, volumen mucho mayor del que contiene la lágrima humana. Una manera para obtener este volumen necesario de medida es hacer diluciones con las muestras de lagrimal (Figura 3.19), tal y como se hace en otros protocolos de medición de biomarcadores lagrimales [248, 249]. Por otro lado, la propia recogida de lágrima (mediante tubos microcapilares como se ha descrito en otros estudios) [248, 249], puede ser una segunda fuente de error que únicamente se resuelve mediante entrenamiento. El principal objetivo de este estudio fue analizar si estas diluciones de muestra lagrimal pueden generar o no error en el uso de esta técnica en el diagnóstico del SOS.

5.3.1 Resultados en soluciones estándar

En esta parte del estudio se utilizaron un total de cinco soluciones estándar para investigar como varían sus valores diluidos y no diluidos en medidas con el Fiske 110. Se incluyeron tres soluciones con una osmolaridad muy cercana a la lágrima (290 mOsm/kg H₂O and 297 y 338 mOsm/l H₂O), de manera muy similar a las soluciones utilizadas por Yildiz et al. [159] (290, 304, 306 y 336 mOsm/kg H₂O) para probar el funcionamiento de Advanced Model 3100 Tear Osmometer (Figura 2.10), salvo que nosotros adicionalmente incluimos dos con valores extremos (50 y 850 mOsm/kg H₂O).

5.3.1.1 Precisión en la medida de soluciones estándar no diluidas

En un estudio reciente, Yoon et al. [182] utilizaron igualmente soluciones para medir el funcionamiento del osmómetro TearLab, donde tras dos medidas de cada solución, se evaluaba la repetitividad mediante un estudio de Bland and Altman. En nuestro estudio para ver la repetitividad del Fiske 110, se midió cada muestra 20 veces y se compararon los resultados mediante un t-test para saber si estas medidas difieren significativamente del valor de referencia (proporcionados por los propios fabricantes). Este criterio era muy estricto, ya que los propios fabricantes asumen cierto rango de error en la medida (Tabla 3.4). Cuando se tenía en cuenta el posible error que el fabricante asume, los resultados estaban siempre dentro de los rangos de tolerancia (Tabla 4.17; Figura 4.12a, Figura 4.12b, Figura 4.12c y Figura 4.12d), con la única excepción de la solución Advanced Calibration Standard 850mOsm/kg, en la cual era permitido un rango de tolerancia de 850 ± 4.25 mOsm/kg, y se obtuvo una media (\pm DE), máximo y mínimo de $846,10 \pm 4,90$, 839 y 856mOsm/kg, respectivamente (Tabla 4.17; Figura 4.12e). Estos resultados muestran un buen rendimiento del Fiske 110, especialmente en valores cercanos a la lágrima normal (297 mOsm/l) o patológica (338 mOsm/l).

5.3.1.2 Precisión en la medida de soluciones estándar diluidas

En la segunda parte del estudio, las soluciones estándar fueron medidas de manera diluida. Como ocurrió antes, los resultados del Fiske 110 difirieron significativamente de los valores de referencia dados por el fabricante, con dos excepciones: la dilución 1:1 en la solución de 297 mOsm/l H₂O y la dilución 1:4 en la solución de 338 mOsm/l H₂O (Tabla 4.17). Como puede verse en la Figura 4.12, estas excepciones vienen generadas por los altos Intervalos de Confianza, lo que indica resultados poco fiables. Cabe señalar que en las soluciones estándar cercanas a los valores comunes de osmolaridad lagrimal (297 y 338 mOsm/l) la mayoría de los Intervalos de Confianza cayeron dentro del rango de tolerancia de la solución (Figura 4.12c y Figura 4.12d).

Como ya se indicó, de nuestros resultados se puede extraer que a mayor volumen de dilución mayor era el error. Esto puede ser debido principalmente a dos factores. En primer lugar, el rango que ha sido calculado de los resultados arrastra un error indirecto producido por el factor de multiplicación utilizado para las muestras diluidas, de tal manera que cuanto mayor es la dilución de la muestra, mayor es el Intervalo de Confianza del 95% indirecto que se genera. En segundo lugar, las diferencias medias también se pueden ver afectadas por la propia técnica de dilución empleada (Figura 3.18), ya que cualquier pequeña pérdida de solución durante el procedimiento de preparación de la dilución tendrá un mayor efecto sobre la medición final tras ser calculada, ya que la muestra es varias veces más diluida. En un estudio similar donde la osmolaridad fue calculada para diferentes volúmenes medidos con el osmómetros de vapor Wescor 5520 (Wescor, Inc.) (Figura 2.10) en una solución con un valor conocido de 290mOsm/kg H₂O [183], se encontró que a menor volumen de muestra, peores y

menos precisos eran los resultados. Estos hallazgos son consistentes con nuestra observación de que al ser menor el volumen de la solución original en la dilución, peor es el rendimiento.

5.3.2 Resultados en soluciones de mantenimiento de lentes de contacto

Las propiedades físicas de las soluciones de manteniendo para lentes de contacto y de cuidado ocular pueden influenciar en el confort del paciente y por tanto en la preferencia por una u otra. Los estudios han demostrados que la osmolaridad juega un papel importante en la aparición de estos síntomas de disconfort, siendo mayores en pacientes con sequedad lagrimal [1, 66, 68, 125, 304, 305]. El osmómetro Fiske 110 presenta gran utilidad para la evaluación de la osmolaridad en productos de manteamiento de lentes de contacto o lagrimas artificiales.

Se estima que el valor de osmolaridad normal se encuentra sobre los $302 \pm 6,3$ mOsm/l [68, 302, 306], siendo más elevado en paciente con SOS [66, 67, 302, 306]. Nuestros resultados indican que la mayoría de las soluciones de mantenimiento tienen un carácter hiposmóticos con respecto a la lágrima humana (ReNu Multiplus, ReNu Sensitive Eyes MPS y ASept neutralizado), con valores que oscilando entre los 293 y los 297mOsm/kg (Tabla 4.18). Por otro lado, las soluciones Softwear Saline and SoloCare Aqua tuvieron valores muy similares a los de la lagrima, entre 300 y 309mOsm/kg (Tabla 4.18). La excepción más llamativa fue el Opti-Free Express, que con un valor 225mOsm/kg muy lejano al valor lagrimal, podría llegar a ser una fuente potencial de disconfort (Tabla 4.18). Otros autores han señalados que las soluciones con valores hiposmóticos podrían llegar a ser una fuente de disconfort para los pacientes [181, 273]. Sin embargo, es importante señalar que todas las soluciones con las que se han trabajado en este estudio tiene gran éxito comercial, y sus efectos sobre la SO necesitan de investigaciones más completas que incluyan otros parámetros importantes como el pH o la viscosidad [181, 273, 307, 308].

Los peróxidos de hidrógeno deben ser neutralizados previamente al porte de lentes de contacto para evitar la aparición de hiperemia o daño corneal. Existen peróxidos de neutralización en uno o dos pasos para la limpieza y desinfección de las lentes de contacto, siendo los primeros más sencillos y comunes por no necesitar más de un paso. Para el estudio se utilizó un peróxido en un paso (ASept), que utilizada un disco recubierto de platino para la neutralización. Este peróxido en su estado no neutralizado, presenta propiedades físicas muy diferentes al de resto de las soluciones analizadas (Tabla 4.18).

Nuestros resultados utilizando un osmómetro basado en el descenso del punto de congelación son comparables a los resultados de estudios anteriores utilizando la misma técnica. Dalton et al. [181] realizó seis mediciones con el osmómetro Advanced Micro-Osmometer 3320 (Advanced Instruments, Norwood, MA) (Figura 2.10c) en cada solución de mantenimiento (Opti-Free Express, ReNu Multiplus, Sensitive Eyes, ASept, SoloCare Aqua, and Softwear Saline) y Abengoza-Vela et al. [273] (con un objetivo diferente a nuestro estudio), llevó a cabo una compleja batería de mediciones con el osmómetro Fiske 210 (Advanced Instruments, Norwood, MA) en un conjunto similar de soluciones (Opti-Free Express, SoloCare Aqua, ReNu Multiplus, and ASept). En nuestro estudio hemos obtenido valores de Desviación Estándar más bajos que Dalton et al. [181] (con la excepción de SoloCare Aqua) y ligeramente superiores a los reportados por Abengoza-Vela et al. [273] (considerando como referencia su primer día de medida) (Tabla 4.15).

5.3.3 Concordancia en las medidas in vivo entre el osmómetro Fiske 110 y el osmómetro TearLab

Finalmente, se comparó directamente el rendimiento de Fiske 110 y TearLab en muestras de lágrima en dos grupos de sujetos ($n = 60$ cada uno) (Tabla 4.19). En un primero grupo se compararon en 60 sujetos los resultados de TearLab con el Fiske 110 utilizando la cánula de $4\mu\text{l}$, y un segundo grupo donde se compararon los resultados en 60 sujetos de TearLab y el Fiske 110 utilizando la cánula de $2\mu\text{l}$. Este experimento reveló diferencias significativas entre las mediciones obtenidas entre ambos osmómetros en ambos procedimientos (Tabla 4.20). La magnitud de estas diferencias dependía de los valores de media del Fiske 110 obtenidos en cada procedimiento (véase la Figura 4.13), aunque los resultados utilizando la cánula de $4\mu\text{l}$ fueron más cercanos a los resultados del TearLab que aquellos en los que se utilizaba la cánula de $2\mu\text{l}$ (Tabla 4.19; Tabla 4.20). Varios autores han evaluado el rendimiento del osmómetro TearLab en pacientes control y con SOS [1, 65, 66] y se han adoptado diferentes valores de corte para el diagnóstico de esta patología [52, 65, 70], sin embargo, ningún estudio anterior había investigado el uso de los osmómetros Fiske 110 para medir la osmolaridad de la película lagrimal. La varianza en las medidas entre diferentes osmómetros puede venir relacionada con los diferentes principios físicos de medida. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que la correlación entre los osmómetros basados en el principio de ebullición y de impedancia es mejor cuando se analiza en muestras de lágrima recogidas [236]. Actualmente se asume que los osmómetros basados en el descenso del punto de congelación son más fiables que los basados en la conductividad eléctrica [78]. Otros dos factores importantes en la diferencia entre medidas son los posibles errores en las técnicas de dilución (Figura 3.19), o los diferentes procedimientos de recogida entre ambos osmómetros.

La lágrima humana se produce en un volumen bajo ($7,0 \pm 2,0 \mu\text{l}$ en sujetos sanos, con un caudal $1,2 \mu\text{l}/\text{min}$, rango de $0,5$ a $2,2 \mu\text{l}/\text{min}$ [118, 119]), el cual puede verse afectado por diversos factores como enfermedades o edad [24, 53, 58]. La combinación entre su propio volumen fisiológico y estos factores dificultan la toma de muestras debido al bajo nivel de volumen del que un paciente puede disponer. Se han utilizado diferentes procedimientos de recogida de lágrima para resolver esta limitación. En el estudio de Lee et al. [309] se instiló solución salina tamponada con fosfato en el saco conjuntival, para posteriormente recogerse un volumen de $20 \mu\text{l}$ de lágrima y solución salina en el canto lateral mediante una micropipeta evitando cualquier reflejo lágrima adicional. En el caso de Lopilly Park et al. [310] se utilizó un tubo capilar de vidrio de $5\mu\text{l}$ para pacientes sanos, y de entre 2 y $1\mu\text{l}$ en los casos donde había un volumen lagrimal reducido. Por otro lado, el método de dilución utilizado en este estudio (Figura 3.19), fue similar al método usado por Lam et al. [249] para medir citoquinas lagrimales, donde el fluido lagrimal era recogido del menisco lagrimal inferior con un capilar de vidrio $0,5 \mu\text{l}$ para posteriormente ser diluido en un tubo Eppendorf que contenía $9\mu\text{l}$ de buffer para crear una dilución 1:10.

A pesar de su precisión [250], el uso de una cánula para la medida de lagrimal en el Fiske 110 requiere de las habilidades del clínico para evitar la estimulación del lagrimeo reflejo (muchos cambios patológicos no pueden ser detectados en lágrimas reflejas [66, 69]), haciendo el proceso de recolección más difícil que con el TearLab. Por otro lado, en el procedimiento con el Fiske 110, es el propio operador quien prepara y controla el volumen de muestra. En el caso del TearLab, la recolección de la muestra está más sujeta a efectos aleatorios, especialmente debidos a la pequeña cantidad de lágrima recogida, y por tanto menos representativa (menos de 2%) del volumen lagrimal total. Desafortunadamente, los

procesos de dilución y medición con Fiske 110 hacen que el tiempo de medida sea mayor que con el TearLab. Además, estos procesos podrían inducir errores significativos debido a diluciones incorrectas o pérdidas de pequeñas cantidades de la misma. Así, a pesar del hecho de que la técnica de Fiske 110 es mucho menos cara (cada medida cuesta aproximadamente un tercio que las realizadas con el TearLab), el proceso de recolección y dilución utilizado con Fiske 110 hacen que sea una posible alternativa a la medición de la osmolaridad, pero no un sustituto clínico.

En el estudio de Yoon et al. [182] se encontró un Intervalo de Confianza del 95% menor (de -5,3 mOsm/l hasta +4,8 mOsm/l) entre TearLab y el osmómetro Advanced Micro-Osmometer 3320 (basado en la depresión del punto de congelación), pero en su caso se realizaba la medida de soluciones salinas. Como se vio en la primera parte de este estudio, el uso de estas soluciones salinas evitaría la aparición de posibles variables que pueden afectar a la medida de la osmolaridad, como la inherente variabilidad biológica o la provocada por el proceso de recolección (como por ejemplo, el lagrimeo reflejo)[182].

En otro estudio Tomlinson et al. [70] observaron una buena concordancia en el análisis de la película lagrimal entre el osmómetro Clifton (basado también en el descenso del punto de congelación) y el TearLab. Teniendo en cuenta que estos dos instrumentos se basan en diferentes principios de medida (como ocurre en el análisis realizado en este trabajo), pero ambos utilizan volúmenes de muestra similares (0,20 μ l el Clifton, 0,05 μ l el TearLab), podríamos especular que las diferencias observadas entre el Fiske 110 y TearLab son probablemente generadas debido a los diferentes volúmenes de muestra necesarios y por lo tanto a la necesidad de dilución de la muestra.

Aunque la comparación entre TearLab y Fiske 110 mostró un Intervalo de Confianza amplio, se obtuvo un rendimiento mejor cuando se utilizó el osmómetro Fiske 110 con muestras de 4 μ l diluidas. En este caso, el coeficiente de acuerdo ($DE \times 1,96$) fue de 39 mOsm/l, que es similar al coeficiente de reproducibilidad (39 mOsm/l) y ligeramente mayor que la repetibilidad (33 mOsm/l) indicado para TearLab en lágrimas humanas [97]. En este sentido, Eperjesi et al. [97] concluyeron que 33 mOsm/l es el nivel de cambio en el tiempo que puede ser considerado clínicamente relevante en sujetos sanos; y cualquier cambio menor que este dato debe ser considerado ruido de la medición. Por lo tanto, a pesar de las diferencias significativas entre las mediciones obtenidas usando el TearLab y Fiske 110 en ambas diluciones lagrimales, el Fiske 110 mostró un rendimiento comparable a otros disponibles comercialmente. En futuros estudios, se debe tratar de optimizar la técnica de recolección de muestra lágrima para mejorar las lecturas del osmómetro Fiske 110.



6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

6.1 CONCLUSIONES

De todo lo expuesto anteriormente, las principales conclusiones que se pueden extraer del presente trabajo de tesis son las siguientes:

1. La estabilidad lagrimal en sujetos sanos y con un buen entrenamiento e higiene palpebral y hábitos adecuados de cuidado ocular, no varía a lo largo del día. Este hallazgo se observa independientemente del método de promedio utilizado para el TBUT.

2. El TBUT se correlaciona positivamente con el MBI; a mayor tiempo de ruptura lagrimal, mayor intervalo máximo de parpadeo. Esto implica que las personas con tiempos de ruptura lagrimal bajos tienen una necesidad mayor de parpadear.

3. Existe cierta discrepancia en la evaluación del TBUT entre diferentes clínicos. Se presenta por tanto una necesidad de definir con mayor rigor el concepto de TBUT para poder establecer instrucciones claras y mejorar la repetibilidad entre clínicos.

4. La mayor repetibilidad entre clínicos en la medida del TBUT se observa para valores de ruptura de hasta 15 segundos. Se considera adecuado, por tanto, limitar la duración de la prueba a éste periodo de tiempo, considerando que valores superiores serían indicativos de pacientes sanos.

5. La determinación del TBUT utilizando un software de análisis de imagen especializado mejora la fiabilidad y la resolución temporal de las mediciones. Se observa una alta concordancia entre las medidas automáticas y las evaluaciones de los clínicos expertos.

6. La implementación de un software de análisis de imagen especializado en la medida del TBUT, proporcionaría una mayor objetividad en el ámbito clínico y en el diagnóstico del SOS.

7. Una mayor estabilidad lagrimal determinada mediante el TBUT y un mayor intervalo de parpadeo se relacionan con valores más altos de grasa meibomiana. Esta relación se observa independientemente del método usado para promediar tanto las curvas generadas por el Meibómetro como el TBUT y el MBI.

8. La relación entre el TBUT y el intervalo de parpadeo con los lípidos generados por las Glándulas de Meibomio, es mayor en pacientes sintomáticamente moderados y aún mayor en pacientes con un valor de OSDI que los clasificaba como severos.

9. Existe una estrecha relación entre el tiempo de ruptura lagrimal y los parámetros de área y velocidad de ruptura: tiempos más bajos de TBUT se relacionan con áreas y velocidades de ruptura mayores. La inestabilidad de la película lagrimal genera de manera rápida áreas de ruptura o “puntos secos”, que avanzan a gran velocidad formando grandes superficies de exposición corneal.

10. Existe una estrecha relación entre la osmolaridad lagrimal y los parámetros de área y velocidad de ruptura de la película lagrimal: osmolaridades lagrimales más altas se relacionan con áreas y velocidades de ruptura mayores.

11. La medición de la TMH mediante asistencia informática con el software ImageJ resultó ser una técnica clínica aceptable y repetible. Se observó una baja variabilidad entre clínicos y una buena concordancia con la evaluación subjetiva de expertos.

12. La medida de la osmolaridad obtenida con el osmómetro Fiske 110 muestra una buena exactitud en soluciones no diluidas (soluciones para lentes de contacto), siendo ésta menor en soluciones diluidas.

13. La medida de la osmolaridad de la película lagrimal con el osmómetro Fiske 110 requiere una muestra diluida, obteniéndose la mayor repetibilidad para una dilución 1:4 (muestra de lágrima de 4 μ l).

14. Existen diferencias significativas entre las mediciones obtenidas entre Fiske 110 y TearLab independientemente del grado de dilución de la muestra utilizado para el Fiske, si bien la mejor concordancia entre ambos instrumentos es cuando se utiliza una dilución 1:4 (muestra de 4 μ l).

6.2 PERSPECTIVAS DE FUTURO

Los resultados de este trabajo han puesto de manifiesto la utilidad del uso de herramientas diagnósticas automáticas y semiautomáticas, tanto de software como de video. Adicionalmente, existen nuevos parámetros prometedores, especialmente en la estabilidad de la película de lagrimal, que podrían aportar nueva información relevante en la mejora diagnóstica.

Así pues, como perspectivas futuras de continuidad de este trabajo de investigación se proponen los siguientes objetivos científicos:

- ~ Estudiar las variaciones diurnas en la estabilidad de la película lagrimal en pacientes con problemas de sequedad ocular de diferentes grados de severidad, aplicando el mismo protocolo de estudio que el utilizado en esta tesis.
- ~ Estudiar cómo varían el área y velocidad de ruptura lagrimal a través de intervalos de tiempo mayores a los utilizados en el presente trabajo.
- ~ Estudiar la relación entre la velocidad y área de ruptura con el patrón de la misma (forma de la ruptura), su localización sobre la superficie corneal, y la presencia/ausencia de tinción corneal (profundidad, extensión y tipo).
- ~ Implementar la medida automática del TBUT para el diagnóstico del SOS, y establecer su capacidad diagnóstica en comparación con otras pruebas de referencia como la osmolaridad.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

- ~ Analizar las curvas de evolución de ruptura de la película lagrimal para profundizar en su significancia clínica y su correlación con otros test frecuentemente usados en el diagnóstico de SOS.
- ~ Desarrollar nuevas prestaciones del software ImageJ para medir parámetros del menisco lagrimal que puedan ser útiles en el diagnóstico del SOS (por ejemplo, área frontal del menisco lagrimal).
- ~ Optimizar el método de recogida y dilución de la muestra lagrimal con el fin de mejorar los presentes resultados clínicos del osmómetro Fiske 110 (basado en el descenso del punto de congelación).
- ~ Proporcionar valores de osmolaridad de soluciones de mantenimiento de lentes de contacto y lágrimas artificiales obtenidos con el osmómetro Fiske 110; valores útiles en clínica, al permitir seleccionar la solución o lágrima artificial con la osmolaridad adecuada al grado de severidad de SOS.
- ~ Aplicar los métodos de estudio del TBUT desarrollados en esta tesis al campo de la contactología, estudiando la caracterización del TBUT en la película lagrimal pre-lente de contacto.
- ~ Estudiar la composición de la capa lipídica y su relación con el TBUT, la sintomatología y otros test de evaluación de la película lagrimal, en pacientes normales y con disfunción de las Glándulas de Meibomio. Se parte de la hipótesis de que los lípidos polares contribuyen a la estabilidad lagrimal y los apolares la disminuyen

Las aportaciones científicas que se puedan derivar de la continuidad de esta investigación adquieren especial relevancia si se tiene en cuenta que el número de pacientes con SOS ha sufrido un aumento considerable en los últimos años, creciendo la necesidad de una correcta diagnosis especialmente en edades más avanzadas. La información aquí presente será importante para la clínica diaria, que en función de los resultados podrán utilizar nuevas herramientas y protocolos susceptibles de mejorar el diagnóstico.



BIBLIOGRAFÍA

1. *The epidemiology of dry eye disease: report of the Epidemiology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)*. Ocul Surf, 2007. 5(2): p. 93-107.
2. Lemp, M.A., *Advances in understanding and managing dry eye disease*. Am J Ophthalmol, 2008. 146(3): p. 350-356.
3. Pflugfelder, S.C., *Prevalence, burden, and pharmacoeconomics of dry eye disease*. Am J Manag Care, 2008. 14(3 Suppl): p. S102-6.
4. McCarty, C.A., A.K. Bansal, P.M. Livingston, Y.L. Stanislavsky, and H.R. Taylor, *The epidemiology of dry eye in Melbourne, Australia*. Ophthalmology, 1998. 105(6): p. 1114-9.
5. Lin, P.Y., S.Y. Tsai, C.Y. Cheng, J.H. Liu, P. Chou, and W.M. Hsu, *Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study*. Ophthalmology, 2003. 110(6): p. 1096-101.
6. *The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)*. Ocul Surf, 2007. 5(2): p. 75-92.
7. de Paiva, C.S., J.L. Lindsey, and S.C. Pflugfelder, *Assessing the severity of keratitis sicca with videokeratographic indices*. Ophthalmology, 2003. 110(6): p. 1102-9.
8. Pflugfelder, S.C., S.C. Tseng, O. Sanabria, H. Kell, C.G. Garcia, C. Felix, W. Feuer, and B.L. Reis, *Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation*. Cornea, 1998. 17(1): p. 38-56.
9. Pritchard, N., D. Fonn, and D. Brazeau, *Discontinuation of contact lens wear: a survey*. Int Contact Lens Clin, 1999. 26(6): p. 157-162.
10. *Research in dry eye: report of the Research Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)*. Ocul Surf, 2007. 5(2): p. 179-93.
11. *Management and therapy of dry eye disease: report of the Management and Therapy Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)*. Ocul Surf, 2007. 5(2): p. 163-78.
12. *Design and conduct of clinical trials: report of the Clinical Trials Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)*. Ocul Surf, 2007. 5(2): p. 153-62.
13. *Methodologies to diagnose and monitor dry eye disease: report of the Diagnostic Methodology Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007)*. Ocul Surf, 2007. 5(2): p. 108-52.
14. Asbell, P.A., F.J. Stapleton, K. Wickstrom, E.K. Akpek, P. Aragona, R. Dana, M.A. Lemp, and K.K. Nichols, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the clinical trials subcommittee*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 2065-85.

15. Geerling, G., J. Tauber, C. Baudouin, E. Goto, Y. Matsumoto, T. O'Brien, M. Rolando, K. Tsubota, and K.K. Nichols, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on management and treatment of meibomian gland dysfunction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 2050-64.
16. Tomlinson, A., A.J. Bron, D.R. Korb, S. Amano, J.R. Paugh, E.I. Pearce, R. Yee, N. Yokoi, R. Arita, and M. Dogru, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the diagnosis subcommittee*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 2006-49.
17. Schaumberg, D.A., J.J. Nichols, E.B. Papas, L. Tong, M. Uchino, and K.K. Nichols, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on the epidemiology of, and associated risk factors for, MGD*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 1994-2005.
18. Green-Church, K.B., I. Butovich, M. Willcox, D. Borchman, F. Paulsen, S. Barabino, and B.J. Glasgow, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on tear film lipids and lipid-protein interactions in health and disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 1979-93.
19. Knop, E., N. Knop, T. Millar, H. Obata, and D.A. Sullivan, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 1938-78.
20. Nelson, J.D., J. Shimazaki, J.M. Benitez-del-Castillo, J.P. Craig, J.P. McCulley, S. Den, and G.N. Foulks, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the definition and classification subcommittee*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 1930-7.
21. Nichols, K.K., G.N. Foulks, A.J. Bron, B.J. Glasgow, M. Dogru, K. Tsubota, M.A. Lemp, and D.A. Sullivan, *The international workshop on meibomian gland dysfunction: executive summary*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 1922-9.
22. Nichols, K.K., *The international workshop on meibomian gland dysfunction: introduction*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(4): p. 1917-21.
23. Schiffman, R.M., M.D. Christianson, G. Jacobsen, J.D. Hirsch, and B.L. Reis, *Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index*. Arch Ophthalmol, 2000. 118(5): p. 615-21.
24. Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, B. Remeseiro, M.J. Giraldez, and E. Yebra-Pimentel, *Correlation between tear osmolarity and tear meniscus*. Optom Vis Sci, 2014. 91(12): p. 1419-29.
25. Ring, M.H., D.F. Rabensteiner, J. Horwath-Winter, I. Boldin, R. Horantner, and T. Haslwanter, *Introducing a new parameter for the assessment of the tear film lipid layer*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. 53(10): p. 6638-44.
26. Miller, K.L., J.G. Walt, D.R. Mink, S. Satram-Hoang, S.E. Wilson, H.D. Perry, P.A. Asbell, and S.C. Pflugfelder, *Minimal clinically important difference for the ocular surface disease index*. Arch Ophthalmol, 2010. 128(1): p. 94-101.
27. Patel, V.D., J.H. Watanabe, J.A. Strauss, and A.T. Dubey, *Work productivity loss in patients with dry eye disease: an online survey*. Curr Med Res Opin, 2011. 27(5): p. 1041-8.
28. McMonnies, C.W., *Key questions in a dry eye history*. J Am Optom Assoc, 1986. 57(7): p. 512-7.
29. McMonnies, C.W. and A. Ho, *Responses to a dry eye questionnaire from a normal population*. J Am Optom Assoc, 1987. 58(7): p. 588-91.

30. McMonnies, C., A. Ho, and D. Wakefield, *Optimum dry eye classification using questionnaire responses*. Adv Exp Med Biol, 1998. 438: p. 835-8.
31. Glasson, M.J., F. Stapleton, L. Keay, D. Sweeney, and M.D. Willcox, *Differences in clinical parameters and tear film of tolerant and intolerant contact lens wearers*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. 44(12): p. 5116-24.
32. Johnson, M.E. and P.J. Murphy, *The Effect of instilled fluorescein solution volume on the values and repeatability of TBUT measurements*. Cornea, 2005. 24(7): p. 811-7.
33. Abelson, M.B., G.W. Ousler, 3rd, L.A. Nally, D. Welch, and K. Krenzer, *Alternative reference values for tear film break up time in normal and dry eye populations*. Adv Exp Med Biol, 2002. 506(Pt B): p. 1121-5.
34. Elliott, M., H. Fandrich, T. Simpson, and D. Fonn, *Analysis of the repeatability of tear break-up time measurement techniques on asymptomatic subjects before, during and after contact lens wear*. Cont Lens Anterior Eye, 1998. 21(4): p. 98-103.
35. Julio, G., S. Lluch, P. Pujol, and M.D. Merindano, *Effects of tear hyperosmolarity on conjunctival cells in mild to moderate dry eye*. Ophthalmic Physiol Opt, 2012. 32(4): p. 317-23.
36. Pena-Verdeal, H., C. García-Resúa, L. Ramos, M.J. Giraldez, and E. Yebra-Pimentel, *Diurnal BUT variations determined in healthy subjects by software-assisted interpretation of tear film videorecordings*. Clin Exp Optom, 2015. Accepted 6 April.
37. Lemp, M.A., *Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes*. CLAO J, 1995. 21(4): p. 221-32.
38. Lemp, M.A., F.J. Holly, S. Iwata, and C.H. Dohlman, *The precorneal tear film I: Factors in spreading and maintaining a continuous tear film over the corneal surface*. Arch Ophthalmol, 1970. 83(1): p. 89-94.
39. Cho, P. and B. Brown, *Review of the tear break-up time and a closer look at the tear break-up time of Hong Kong Chinese*. Optom Vis Sci, 1993. 70(1): p. 30-8.
40. Sweeney, D.F., T.J. Millar, and S.R. Raju, *Tear film stability: a review*. Exp Eye Res, 2013. 117: p. 28-38.
41. Behrens, A., J.J. Doyle, L. Stern, R.S. Chuck, P.J. McDonnell, D.T. Azar, H.S. Dua, M. Hom, P.M. Karpecki, P.R. Laibson, M.A. Lemp, D.M. Meisler, J.M. Del Castillo, T.P. O'Brien, S.C. Pflugfelder, M. Rolando, O.D. Schein, B. Seitz, S.C. Tseng, G. van Setten, S.E. Wilson, and S.C. Yiu, *Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations*. Cornea, 2006. 25(8): p. 900-7.
42. Mengher, L.S., A.J. Bron, S.R. Tonge, and D.J. Gilbert, *A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability*. Curr Eye Res, 1985. 4(1): p. 1-7.
43. Cho, P. and W. Douthwaite, *The relation between invasive and noninvasive tear break-up time*. Optom Vis Sci, 1995. 72(1): p. 17-22.
44. Patel, S., D. Murray, A. McKenzie, D.S. Shearer, and B.D. McGrath, *Effects of fluorescein on tear breakup time and on tear thinning time*. Am J Optom Physiol Opt, 1985. 62(3): p. 188-90.
45. Xu, K.P. and K. Tsubota, *Correlation of tear clearance rate and fluorophotometric assessment of tear turnover*. Br J Ophthalmol, 1995. 79(11): p. 1042-5.
46. Tomlinson, A., M.G. Doane, and A. McFadyen, *Inputs and outputs of the lacrimal system: review of production and evaporative loss*. Ocul Surf, 2009. 7(4): p. 186-98.
47. Saleh, T.A., B. McDermott, A.K. Bates, and P. Ewings, *Phenol red thread test vs Schirmer's test: a comparative study*. Eye (Lond), 2006. 20(8): p. 913-5.

48. Kwong, Y.M. and P. Cho, *Evaluation of a self-prepared cotton thread test (SP-CTT) and the Phenol Red Thread (PRT) test*. *Cont Lens Anterior Eye*, 1998. 21(1): p. 11-4.
49. Tomlinson, A., K.J. Blades, and E.I. Pearce, *What does the phenol red thread test actually measure?* *Optom Vis Sci*, 2001. 78(3): p. 142-6.
50. Nichols, K.K., G.L. Mitchell, and K. Zadnik, *The repeatability of clinical measurements of dry eye*. *Cornea*, 2004. 23(3): p. 272-85.
51. Nichols, K.K., J.J. Nichols, and G.L. Mitchell, *The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease*. *Cornea*, 2004. 23(8): p. 762-70.
52. Benelli, U., M. Nardi, C. Posarelli, and T.G. Albert, *Tear osmolarity measurement using the TearLab Osmolarity System in the assessment of dry eye treatment effectiveness*. *Cont Lens Anterior Eye*, 2010. 33(2): p. 61-7.
53. Patel, S. and I. Wallace, *Tear meniscus height, lower punctum lacrimale, and the tear lipid layer in normal aging*. *Optom Vis Sci*, 2006. 83(10): p. 731-9.
54. Johnson, M.E. and P.J. Murphy, *The agreement and repeatability of tear meniscus height measurement methods*. *Optom Vis Sci*, 2005. 82(12): p. 1030-7.
55. Mainstone, J.C., A.S. Bruce, and T.R. Golding, *Tear meniscus measurement in the diagnosis of dry eye*. *Curr Eye Res*, 1996. 15(6): p. 653-61.
56. Santodomingo-Rubido, J., J.S. Wolffsohn, and B. Gilmartin, *Comparison between graticule and image capture assessment of lower tear film meniscus height*. *Cont Lens Anterior Eye*, 2006. 29(4): p. 169-73.
57. Garcia-Resua, C., J. Santodomingo-Rubido, M. Lira, M.J. Giraldez, and E.Y. Vilar, *Clinical assessment of the lower tear meniscus height*. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2009. 29(5): p. 487-496.
58. Pult, H., C. Purslow, and P.J. Murphy, *The relationship between clinical signs and dry eye symptoms*. *Eye (Lond)*, 2011. 25(4): p. 502-10.
59. Bandlitz, S., C. Purslow, P.J. Murphy, and H. Pult, *Comparison of a new portable digital meniscometer and optical coherence tomography in tear meniscus radius measurement*. *Acta Ophthalmol*, 2014. 92(2): p. e112-8.
60. Bandlitz, S., C. Purslow, P.J. Murphy, H. Pult, and A.J. Bron, *A new portable digital meniscometer*. *Optom Vis Sci*, 2014. 91(1): p. e1-8.
61. Chan, H.H., Y. Zhao, T.A. Tun, and L. Tong, *Repeatability of tear meniscus evaluation using spectral-domain Cirrus(R) HD-OCT and time-domain Visante(R) OCT*. *Cont Lens Anterior Eye*, 2015.
62. Tukenmez-Dikmen, N., E.H. Yildiz, S. Imamoglu, E. Turan-Vural, and M.S. Sevim, *Correlation of Dry Eye Workshop Dry Eye Severity Grading System With Tear Meniscus Measurement by Optical Coherence Tomography and Tear Osmolarity*. *Eye Contact Lens*, 2015.
63. Lin, T., L. Gong, X. Liu, and X. Ma, *Fourier-domain optical coherence tomography for monitoring the lower tear meniscus in dry eye after acupuncture treatment*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. 2015: p. 492150.
64. Garg, A., *Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular : diagnóstico y tratamiento en xerodacriología*. 2008, Madrid [etc.]: Médica Panamericana. XVIII, 454 p.
65. Tomlinson, A., S. Khanal, K. Ramaesh, C. Diaper, and A. McFadyen, *Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. 47(10): p. 4309-15.
66. Gilbard, J.P., R.L. Farris, and J. Santamaria, 2nd, *Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca*. *Arch Ophthalmol*, 1978. 96(4): p. 677-81.

67. Gilbard, J.P., *Human tear film electrolyte concentrations in health and dry-eye disease*. Int Ophthalmol Clin, 1994. 34(1): p. 27-36.
68. Farris, R.L., J.P. Gilbard, R.N. Stuchell, and I.D. Mandel, *Diagnostic tests in keratoconjunctivitis sicca*. CLAO J, 1983. 9(1): p. 23-8.
69. Messmer, E.M., M. Bulgen, and A. Kampik, *Hyperosmolarity of the tear film in dry eye syndrome*. Dev Ophthalmol, 2010. 45: p. 129-38.
70. Tomlinson, A., L.C. McCann, and E.I. Pearce, *Comparison of human tear film osmolarity measured by electrical impedance and freezing point depression techniques*. Cornea, 2010. 29(9): p. 1036-41.
71. Enriquez-de-Salamanca, A., V. Calder, J. Gao, G. Galatowicz, C. Garcia-Vazquez, I. Fernandez, M.E. Stern, Y. Diebold, and M. Calonge, *Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an in vitro model of ocular inflammation*. Cytokine, 2008. 44(1): p. 160-7.
72. Pflugfelder, S.C., C.S. de Paiva, D.Q. Li, and M.E. Stern, *Epithelial-immune cell interaction in dry eye*. Cornea, 2008. 27 Suppl 1: p. S9-11.
73. Himebaugh, N.L., C.G. Begley, A. Bradley, and J.A. Wilkinson, *Blinking and tear break-up during four visual tasks*. Optom Vis Sci, 2009. 86(2): p. E106-14.
74. Begley, C.G., N. Himebaugh, D. Renner, H. Liu, R. Chalmers, T. Simpson, and J. Varikooty, *Tear breakup dynamics: a technique for quantifying tear film instability*. Optom Vis Sci, 2006. 83(1): p. 15-21.
75. Liu, H., C.G. Begley, R. Chalmers, G. Wilson, S.P. Srinivas, and J.A. Wilkinson, *Temporal progression and spatial repeatability of tear breakup*. Optom Vis Sci, 2006. 83(10): p. 723-30.
76. Bitton, E. and J.V. Lovasik, *Longitudinal analysis of precorneal tear film rupture patterns*. Adv Exp Med Biol, 1998. 438: p. 381-9.
77. Li, M., C. Du, D. Zhu, M. Shen, L. Cui, and J. Wang, *Daytime variations of tear osmolarity and tear meniscus volume*. Eye Contact Lens, 2012. 38(5): p. 282-7.
78. Stahl, U., M. Willcox, and F. Stapleton, *Osmolality and tear film dynamics*. Clin Exp Optom, 2012. 95(1): p. 3-11.
79. Bron, A.J., A. Tomlinson, G.N. Foulks, J.S. Pepose, C. Baudouin, G. Geerling, K.K. Nichols, and M.A. Lemp, *Rethinking dry eye disease: a perspective on clinical implications*. Ocul Surf, 2014. 12(2 Suppl): p. S1-31.
80. Holly, F.J., *Physical chemistry of the normal and disordered tear film*. Trans Ophthalmol Soc U K, 1985. 104 (Pt 4): p. 374-80.
81. Yokoi, N., A.J. Bron, J.M. Tiffany, K. Maruyama, A. Komuro, and S. Kinoshita, *Relationship between tear volume and tear meniscus curvature*. Arch Ophthalmol, 2004. 122(9): p. 1265-9.
82. Korb, D.R., *Survey of preferred tests for diagnosis of the tear film and dry eye*. Cornea, 2000. 19(4): p. 483-6.
83. Nichols, K.K., J.J. Nichols, and K. Zadnik, *Frequency of dry eye diagnostic test procedures used in various modes of ophthalmic practice*. Cornea, 2000. 19(4): p. 477-82.
84. Oguz, H., N. Yokoi, and S. Kinoshita, *The height and radius of the tear meniscus and methods for examining these parameters*. Cornea, 2000. 19(4): p. 497-500.
85. Suzuki, M., M.L. Massingale, F. Ye, J. Godbold, T. Elfassy, M. Vallabhajosyula, and P.A. Asbell, *Tear osmolarity as a biomarker for dry eye disease severity*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. 51(9): p. 4557-61.

86. Farris, R.L., *Tear osmolarity--a new gold standard?* Adv Exp Med Biol, 1994. 350: p. 495-503.
87. White, K.M., W.J. Benjamin, and R.M. Hill, *Human basic tear fluid osmolality. II. Importance of processing strategy.* Acta Ophthalmol (Copenh), 1993. 71(4): p. 530-8.
88. White, K.M., W.J. Benjamin, and R.M. Hill, *Human basic tear fluid osmolality. I. Importance of sample collection strategy.* Acta Ophthalmol (Copenh), 1993. 71(4): p. 524-9.
89. Li, D.Q., Z. Chen, X.J. Song, L. Luo, and S.C. Pflugfelder, *Stimulation of matrix metalloproteinases by hyperosmolarity via a JNK pathway in human corneal epithelial cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(12): p. 4302-11.
90. Paiva, C.S. and S.C. Pflugfelder, *Rationale for anti-inflammatory therapy in dry eye syndrome.* Arq Bras Oftalmol, 2008. 71(6 Suppl): p. 89-95.
91. Luo, L., D.Q. Li, A. Doshi, W. Farley, R.M. Corrales, and S.C. Pflugfelder, *Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(12): p. 4293-301.
92. Nelson, J.D., M.M. Drake, J.T. Brewer, Jr., and M. Tuley, *Evaluation of a physiological tear substitute in patients with keratoconjunctivitis sicca.* Adv Exp Med Biol, 1994. 350: p. 453-7.
93. Peng, C.C., C. Cerretani, R.J. Braun, and C.J. Radke, *Evaporation-driven instability of the precorneal tear film.* Adv Colloid Interface Sci, 2014. 206: p. 250-64.
94. Braun, R.J., P.E. King-Smith, C.G. Begley, L. Li, and N.R. Gewecke, *Dynamics and function of the tear film in relation to the blink cycle.* Prog Retin Eye Res, 2015. 45: p. 132-64.
95. King-Smith, P.E., P. Ramamoorthy, R.J. Braun, and J.J. Nichols, *Tear film images and breakup analyzed using fluorescent quenching.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(9): p. 6003-11.
96. Khanal, S., A. Tomlinson, A. McFadyen, C. Diaper, and K. Ramaesh, *Dry eye diagnosis.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. 49(4): p. 1407-14.
97. Eperjesi, F., M. Aujla, and H. Bartlett, *Reproducibility and repeatability of the OcuSense TearLab osmometer.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. 250(8): p. 1201-5.
98. Khanal, S. and T.J. Millar, *Barriers to clinical uptake of tear osmolarity measurements.* Br J Ophthalmol, 2012. 96(3): p. 341-4.
99. Chanraud, S., N. Zahr, E.V. Sullivan, and A. Pfefferbaum, *MR diffusion tensor imaging: a window into white matter integrity of the working brain.* Neuropsychol Rev, 2010. 20(2): p. 209-25.
100. Lee, J.H. and P.M. Hyun, *The reproducibility of the Schirmer test.* Korean J Ophthalmol, 1988. 2(1): p. 5-8.
101. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis.* Nat Methods, 2012. 9(7): p. 671-5.
102. Garcia-Resua, C., M.J. Giraldez Fernandez, M.F. Gonzalez Penedo, D. Calvo, M. Penas, and E. Yebra-Pimentel, *New software application for clarifying tear film lipid layer patterns.* Cornea, 2013. 32(4): p. 538-46.
103. Remeseiro, B., M. Penas, N. Barreira, A. Mosquera, J. Novo, and C. Garcia-Resua, *Automatic classification of the interferential tear film lipid layer using colour texture analysis.* Comput Methods Programs Biomed, 2013. 111(1): p. 93-103.

104. Begley, C., T. Simpson, H. Liu, E. Salvo, Z. Wu, A. Bradley, and P. Situ, *Quantitative analysis of tear film fluorescence and discomfort during tear film instability and thinning*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(4): p. 2645-53.
105. Wolffsohn, J.S. and C. Purslow, *Clinical monitoring of ocular physiology using digital image analysis*. Cont Lens Anterior Eye, 2003. 26(1): p. 27-35.
106. Fieguth, P. and T. Simpson, *Automated measurement of bulbar redness*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43(2): p. 340-7.
107. Papas, E.B., *Key factors in the subjective and objective assessment of conjunctival erythema*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. 41(3): p. 687-91.
108. Stern, M.E., R.W. Beuerman, R.I. Fox, J. Gao, A.K. Mircheff, and S.C. Pflugfelder, *The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands*. Cornea, 1998. 17(6): p. 584-9.
109. Benitez del Castillo, J.M., M.A. Wasfy, C. Fernandez, and J. Garcia-Sanchez, *An in vivo confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(9): p. 3030-5.
110. Wolff, E., *The muco-cutaneous junction of the lid margin and the distribution of the tear fluid*. Trans. Ophthalmol. Soc., 1946. 66.
111. Tiffany, J.M., *Tears in health and disease*. Eye (Lond), 2003. 17(8): p. 923-6.
112. Tiffany, J.M., *Tear film stability and contact lens wear*. Journal of the British Contact Lens Association, 1988. 11: p. 35-38.
113. Khanal, S. and T.J. Millar, *Nanoscale phase dynamics of the normal tear film*. Nanomedicine, 2010. 6(6): p. 707-13.
114. Roncone, M., H. Bartlett, and F. Eperjesi, *Essential fatty acids for dry eye: A review*. Cont Lens Anterior Eye, 2010. 33(2): p. 49-54; quiz 100.
115. Argueso, P., M. Balaram, S. Spurr-Michaud, H.T. Keutmann, M.R. Dana, and I.K. Gipson, *Decreased levels of the goblet cell mucin MUC5AC in tears of patients with Sjogren syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43(4): p. 1004-11.
116. Veys, J., J. Meyler, and I. Davies, *Prácticas esenciales con lentes de contacto*, ed. The Vision Care institute. 2012: Johnson and Johnson Medical
117. Guillon, M. and D.P. Lydon, *Tear layer thickness characteristics of rigid gas permeable lenses*. Am J Optom Physiol Opt, 1986. 63(7): p. 527-35.
118. Ehlers, N., S.V. Kessing, and M.S. Norn, *Quantitative amounts of conjunctival mucous secretion and tears*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1972. 50(2): p. 210-4.
119. Mishima, S., A. Gasset, S.D. Klyce, Jr., and J.L. Baum, *Determination of tear volume and tear flow*. Invest Ophthalmol, 1966. 5(3): p. 264-76.
120. Berman, E.R., *Biochemistry of the eye*. Perspective in vision research, ed. C. Blakemore. 1991, New York and London: Plenum Press.
121. Larke, J.R., *The eye in contact lens wear*. 1997, Great Britain: Butterworth Heinemann.
122. Carney, L.G. and R.M. Hill, *Human tear pH. Diurnal variations*. Arch Ophthalmol, 1976. 94(5): p. 821-4.
123. Rolando, M. and M. Zierhut, *The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease*. Surv Ophthalmol, 2001. 45 Suppl 2: p. S203-10.
124. Seal, D.V., J.I. McGill, I.A. Mackie, G.M. Liakos, P. Jacobs, and N.J. Goulding, *Bacteriology and tear protein profiles of the dry eye*. Br J Ophthalmol, 1986. 70(2): p. 122-5.
125. Tomlinson, A. and S. Khanal, *Assessment of tear film dynamics: quantification approach*. Ocul Surf, 2005. 3(2): p. 81-95.

126. King-Smith, P.E., J.J. Nichols, K.K. Nichols, B.A. Fink, and R.J. Braun, *Contributions of evaporation and other mechanisms to tear film thinning and break-up*. *Optom Vis Sci*, 2008. 85(8): p. 623-30.
127. Liu, H., C. Begley, M. Chen, A. Bradley, J. Bonanno, N.A. McNamara, J.D. Nelson, and T. Simpson, *A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(8): p. 3671-9.
128. Mathers, W.D., *Why the eye becomes dry: a cornea and lacrimal gland feedback model*. *CLAO J*, 2000. 26(3): p. 159-65.
129. Bahr, G.V., *Könnte der Flüssigkeitsabgang durch die Cornea von physiologischer Bedeutung sein?* *Acta Ophthalmol*, 1941. 19: p. 125-134.
130. Balik, J., *The lacrimal fluid in keratoconjunctivitis sicca; a quantitative and qualitative investigation*. *Am J Ophthalmol*, 1952. 35(6): p. 1773-82.
131. Murube, J, Benítez del Castillo, JM, Chen. Zhuo L, Berta. A, and R. M, *Triple clasificación de Madrid para el Ojo Seco*. *Arch Soc Esp Oftalmol*, 2003. 78: p. 587-593.
132. Murube, J., J. Nemeth, H. Hoh, P. Kaynak-Hekimhan, J. Horwath-Winter, A. Agarwal, C. Baudouin, J.M. Benitez del Castillo, S. Cervenka, L. ChenZhuo, A. Ducasse, J. Duran, F. Holly, R. Javate, J. Nepp, F. Paulsen, A. Rahimi, P. Raus, O. Shalaby, P. Sieg, H. Soriano, D. Spinelli, S.H. Ugurbas, and G. Van Setten, *The triple classification of dry eye for practical clinical use*. *Eur J Ophthalmol*, 2005. 15(6): p. 660-7.
133. Scherz, W. and C.H. Dohlman, *Is the lacrimal gland dispensable? Keratoconjunctivitis sicca after lacrimal gland removal*. *Arch Ophthalmol*, 1975. 93(4): p. 281-3.
134. Jacobsson, L.T., T.E. Axell, B.U. Hansen, V.J. Henricsson, A. Larsson, K. Lieberkind, B. Lilja, and R. Manthorpe, *Dry eyes or mouth--an epidemiological study in Swedish adults, with special reference to primary Sjogren's syndrome*. *J Autoimmun*, 1989. 2(4): p. 521-7.
135. Schein, O.D., B. Munoz, J.M. Tielsch, K. Bandeen-Roche, and S. West, *Prevalence of dry eye among the elderly*. *Am J Ophthalmol*, 1997. 124(6): p. 723-8.
136. Caffery, B.E., D. Richter, T. Simpson, D. Fonn, M. Doughty, and K. Gordon, *CANDEES. The Canadian Dry Eye Epidemiology Study*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. 438: p. 805-6.
137. Ellwein, L.B. and C.J. Urato, *Use of eye care and associated charges among the Medicare population: 1991-1998*. *Arch Ophthalmol*, 2002. 120(6): p. 804-11.
138. Miljanovic, B., K.A. Trivedi, M.R. Dana, J.P. Gilbard, J.E. Buring, and D.A. Schaumberg, *Relation between dietary n-3 and n-6 fatty acids and clinically diagnosed dry eye syndrome in women*. *Am J Clin Nutr*, 2005. 82(4): p. 887-93.
139. Fenga, C., P. Aragona, A. Cacciola, R. Spinella, C. Di Nola, F. Ferreri, and L. Rania, *Meibomian gland dysfunction and ocular discomfort in video display terminal workers*. *Eye (Lond)*, 2008. 22(1): p. 91-5.
140. Uchino, M., D.A. Schaumberg, M. Dogru, Y. Uchino, K. Fukagawa, S. Shimmura, T. Satoh, T. Takebayashi, and K. Tsubota, *Prevalence of dry eye disease among Japanese visual display terminal users*. *Ophthalmology*, 2008. 115(11): p. 1982-8.
141. Waduthantri, S., S.S. Yong, C.H. Tan, L. Shen, M.X. Lee, S. Nagarajan, M.H. Hla, and L. Tong, *Cost of dry eye treatment in an Asian clinic setting*. *PLoS One*, 2012. 7(6): p. e37711.

142. Clegg, J.P., J.F. Guest, A. Lehman, and A.F. Smith, *The annual cost of dry eye syndrome in France, Germany, Italy, Spain, Sweden and the United Kingdom among patients managed by ophthalmologists*. *Ophthalmic Epidemiol*, 2006. 13(4): p. 263-74.
143. Yu, J., C.V. Asche, and C.J. Fairchild, *The economic burden of dry eye disease in the United States: a decision tree analysis*. *Cornea*, 2011. 30(4): p. 379-87.
144. Reddy, P., O. Grad, and K. Rajagopalan, *The economic burden of dry eye: a conceptual framework and preliminary assessment*. *Cornea*, 2004. 23(8): p. 751-61.
145. Yamada, M., Y. Mizuno, and C. Shigeyasu, *Impact of dry eye on work productivity*. *Clinicoecon Outcomes Res*, 2012. 4: p. 307-12.
146. Mertzanis, P., L. Abetz, K. Rajagopalan, D. Espindle, R. Chalmers, C. Snyder, B. Caffery, T. Edrington, T. Simpson, J.D. Nelson, and C. Begley, *The relative burden of dry eye in patients' lives: comparisons to a U.S. normative sample*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. 46(1): p. 46-50.
147. O'Brien, P.D. and L.M. Collum, *Dry eye: diagnosis and current treatment strategies*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2004. 4(4): p. 314-9.
148. Moore, J.E., J.E. Graham, E.A. Goodall, D.A. Dartt, A. Leccisotti, V.E. McGilligan, and T.C. Moore, *Concordance between common dry eye diagnostic tests*. *Br J Ophthalmol*, 2009. 93(1): p. 66-72.
149. Matsumoto, Y., M. Dogru, E. Goto, R. Ishida, T. Kojima, T. Onguchi, Y. Yagi, J. Shimazaki, and K. Tsubota, *Efficacy of a new warm moist air device on tear functions of patients with simple meibomian gland dysfunction*. *Cornea*, 2006. 25(6): p. 644-50.
150. Matsumoto, Y., E.A. Sato, O.M. Ibrahim, M. Dogru, and K. Tsubota, *The application of in vivo laser confocal microscopy to the diagnosis and evaluation of meibomian gland dysfunction*. *Mol Vis*, 2008. 14: p. 1263-71.
151. Arita, R., K. Itoh, S. Maeda, K. Maeda, A. Furuta, S. Fukuoka, A. Tomidokoro, and S. Amano, *Proposed diagnostic criteria for obstructive meibomian gland dysfunction*. *Ophthalmology*, 2009. 116(11): p. 2058-63 e1.
152. Sullivan, B.D., D. Whitmer, K.K. Nichols, A. Tomlinson, G.N. Foulks, G. Geerling, J.S. Pepose, V. Kosheleff, A. Porrecó, and M.A. Lemp, *An objective approach to dry eye disease severity*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010. 51(12): p. 6125-30.
153. Turner, A.W., C.J. Layton, and A.J. Bron, *Survey of eye practitioners' attitudes towards diagnostic tests and therapies for dry eye disease*. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2005. 33(4): p. 351-5.
154. Versura, P., V. Profazio, and E.C. Campos, *Performance of tear osmolarity compared to previous diagnostic tests for dry eye diseases*. *Curr Eye Res*, 2010. 35(7): p. 553-64.
155. Farris, R.L., R.N. Stuchell, and I.D. Mandel, *Basal and reflex human tear analysis. I. Physical measurements: osmolarity, basal volumes, and reflex flow rate*. *Ophthalmology*, 1981. 88(8): p. 852-7.
156. van Bijsterveld, O.P., *Diagnostic tests in the Sicca syndrome*. *Arch Ophthalmol*, 1969. 82(1): p. 10-4.
157. Vitali, C., H.M. Moutsopoulos, and S. Bombardieri, *The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome*. *Ann Rheum Dis*, 1994. 53(10): p. 637-47.
158. Sullivan, B.D., L.A. Crews, E.M. Messmer, G.N. Foulks, K.K. Nichols, P. Baenninger, G. Geerling, F. Figueiredo, and M.A. Lemp, *Correlations between*

- commonly used objective signs and symptoms for the diagnosis of dry eye disease: clinical implications.* Acta Ophthalmol, 2014. 92(2): p. 161-6.
159. Yildiz, E.H., V.C. Fan, H. Banday, L.V. Ramanathan, R.K. Bitra, E. Garry, and P.A. Asbell, *Evaluation of a new tear osmometer for repeatability and accuracy, using 0.5-microL (500-Nanoliter) samples.* Cornea, 2009. 28(6): p. 677-80.
160. Doughty, M.J., D. Fonn, D. Richter, T. Simpson, B. Caffery, and K. Gordon, *A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients presenting to optometric practices across Canada.* Optom Vis Sci, 1997. 74(8): p. 624-31.
161. Mangione, C.M., P.P. Lee, J. Pitts, P. Gutierrez, S. Berry, and R.D. Hays, *Psychometric properties of the National Eye Institute Visual Function Questionnaire (NEI-VFQ). NEI-VFQ Field Test Investigators.* Arch Ophthalmol, 1998. 116(11): p. 1496-504.
162. Rajagopalan, K., L. Abetz, P. Mertzanis, D. Espindle, C. Begley, R. Chalmers, B. Caffery, C. Snyder, J.D. Nelson, T. Simpson, and T. Edrington, *Comparing the discriminative validity of two generic and one disease-specific health-related quality of life measures in a sample of patients with dry eye.* Value Health, 2005. 8(2): p. 168-74.
163. Begley, C.G., B. Caffery, R.L. Chalmers, and G.L. Mitchell, *Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye.* Cornea, 2002. 21(7): p. 664-70.
164. de, A.F.G.B., M.R. Santhiago, M.N. de Azevedo, and H.V. Moraes, Jr., *Evaluation of dry eye signs and symptoms in patients with systemic sclerosis.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2012. 250(7): p. 1051-6.
165. Korb, D.R., *The tear film-its role today and in the future.*, in *The tear film, structure, function and clinical evaluation.*, Butterworth-Heinemann, Editor. 2002. p. 126-92.
166. Guillon, J.P., *Non-invasive Tearscope Plus routine for contact lens fitting.* Cont Lens Anterior Eye, 1998. 21 Suppl 1: p. S31-S40.
167. Rolando, M., C. Valente, and S. Barabino, *New test to quantify lipid layer behavior in healthy subjects and patients with keratoconjunctivitis sicca.* Cornea, 2008. 27(8): p. 866-70.
168. Giraldez, M.J., S.A. Naroo, and C.G. Resua, *A preliminary investigation into the relationship between ocular surface temperature and lipid layer thickness.* Cont Lens Anterior Eye, 2009. 32(4): p. 177-80; quiz 193, 195.
169. Goto, T., X. Zheng, S.D. Klyce, H. Kataoka, T. Uno, M. Karon, Y. Tatematsu, T. Bessyo, K. Tsubota, and Y. Ohashi, *A new method for tear film stability analysis using videokeratography.* Am J Ophthalmol, 2003. 135(5): p. 607-12.
170. Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Minones, M.J. Giraldez, and E. Yebra-Pimentel, *Interobserver and intraobserver repeatability of lipid layer pattern evaluation by two experienced observers.* Cont Lens Anterior Eye, 2014. 37(6): p. 431-7.
171. Guillon, J.P., *Use of the Tearscope Plus and attachments in the routine examination of the marginal dry eye contact lens patient.* Adv Exp Med Biol, 1998. 438: p. 859-67.
172. Uchida, A., M. Uchino, E. Goto, E. Hosaka, Y. Kasuya, K. Fukagawa, M. Dogru, Y. Ogawa, and K. Tsubota, *Noninvasive interference tear meniscometry in dry eye patients with Sjogren syndrome.* Am J Ophthalmol, 2007. 144(2): p. 232-237.

173. King-Smith, P.E., B.A. Fink, J.J. Nichols, K.K. Nichols, and R.M. Hill, *Interferometric imaging of the full thickness of the precorneal tear film*. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2006. 23(9): p. 2097-104.
174. Guillon, J.P., *Abnormal lipid layers. Observation, differential diagnosis, and classification*. Adv Exp Med Biol, 1998. 438: p. 309-13.
175. Nichols, J.J., K.K. Nichols, B. Puent, M. Saracino, and G.L. Mitchell, *Evaluation of tear film interference patterns and measures of tear break-up time*. Optom Vis Sci, 2002. 79(6): p. 363-9.
176. Shen, M., J. Li, J. Wang, H. Ma, C. Cai, A. Tao, Y. Yuan, and F. Lu, *Upper and lower tear menisci in the diagnosis of dry eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. 50(6): p. 2722-6.
177. Yokoi, N. and A. Komuro, *Non-invasive methods of assessing the tear film*. Exp Eye Res, 2004. 78(3): p. 399-407.
178. Soper, J.W., *Method of diagnosing deficiency of aqueous tears*. Contact Lens Spectr., 1993. 8: p. 31-35.
179. Khurana, A.K., R. Chaudhary, B.K. Ahluwalia, and S. Gupta, *Tear film profile in dry eye*. Acta Ophthalmol (Copenh), 1991. 69(1): p. 79-86.
180. Erstad, B.L., *Osmolality and osmolarity: narrowing the terminology gap*. Pharmacotherapy, 2003. 23(9): p. 1085-6.
181. Dalton, K., L.N. Subbaraman, R. Rogers, and L. Jones, *Physical properties of soft contact lens solutions*. Optom Vis Sci, 2008. 85(2): p. 122-8.
182. Yoon, D., N. Gadaria-Rathod, C. Oh, and P.A. Asbell, *Precision and accuracy of TearLab osmometer in measuring osmolarity of salt solutions*. Curr Eye Res, 2014. 39(12): p. 1247-50.
183. Pensyl, C.D. and W.J. Benjamin, *Vapor pressure osmometry: minimum sample microvolumes*. Acta Ophthalmol Scand, 1999. 77(1): p. 27-30.
184. Belhouachi, N., S. Jaisson, R. Garnotel, and P. Gillery, *[Comparison of two osmometers at the clinical chemistry laboratory]*. Ann Biol Clin (Paris), 2007. 65(5): p. 545-9.
185. Tiffany, J., C. Chew, and A. Bron, *Vapor pressure osmometry of human tears*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994. 35(4): p. 1692.
186. Ogasawara, K., K. Mitsubayashi, T. Tsuru, and I. Karube, *Electrical conductivity of tear fluid in healthy persons and keratoconjunctivitis sicca patients measured by a flexible conductimetric sensor*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1996. 234(9): p. 542-6.
187. McGinnigle, S., S.A. Naroo, and F. Eperjesi, *Evaluation of dry eye*. Surv Ophthalmol, 2012. 57(4): p. 293-316.
188. TearLabTMC Corp., *TearLabTM Osmolarity Test Card package insert*. 2008.
189. Wise, R.J., R.K. Sobel, and R.C. Allen, *Meibography: A review of techniques and technologies*. Saudi J Ophthalmol, 2012. 26(4): p. 349-56.
190. Mathers, W.D., W.J. Shields, M.S. Sachdev, W.M. Petroll, and J.V. Jester, *Meibomian gland dysfunction in chronic blepharitis*. Cornea, 1991. 10(4): p. 277-85.
191. Nichols, J.J., D.A. Berntsen, G.L. Mitchell, and K.K. Nichols, *An assessment of grading scales for meibography images*. Cornea, 2005. 24(4): p. 382-8.
192. Shimazaki, J., M. Sakata, and K. Tsubota, *Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction*. Arch Ophthalmol, 1995. 113(10): p. 1266-70.

193. Versura, P., V. Profazio, and E. Campos. *A critical look at meibometry as a means to monitor Meibomian gland function*. in *European Association for Vision and Eye Research Conference*. 2010. Acta Ophthalmologica.
194. Yokoi, N., F. Mossa, J.M. Tiffany, and A.J. Bron, *Assessment of meibomian gland function in dry eye using meibometry*. Arch Ophthalmol, 1999. 117(6): p. 723-9.
195. Nagymihalyi, A., S. Dikstein, and J.M. Tiffany, *The influence of eyelid temperature on the delivery of meibomian oil*. Exp Eye Res, 2004. 78(3): p. 367-70.
196. Chew, C.K., C. Jansweijer, J.M. Tiffany, S. Dikstein, and A.J. Bron, *An instrument for quantifying meibomian lipid on the lid margin: the Meibometer*. Curr Eye Res, 1993. 12(3): p. 247-54.
197. Ofri, R., K. Orgad, P.H. Kass, and S. Dikstein, *Canine meibometry: establishing baseline values for meibomian gland secretions in dogs*. Vet J, 2007. 174(3): p. 536-40.
198. Benz, P., A. Tichy, and B. Nell, *Review of the measuring precision of the new Meibometer MB550 through repeated measurements in dogs*. Vet Ophthalmol, 2008. 11(6): p. 368-74.
199. Sebbag, L., P.H. Kass, and D.J. Maggs, *Reference values, intertest correlations, and test-retest repeatability of selected tear film tests in healthy cats*. J Am Vet Med Assoc, 2015. 246(4): p. 426-35.
200. Bron, A.J., V.E. Evans, and J.A. Smith, *Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests*. Cornea, 2003. 22(7): p. 640-50.
201. van Bijsterveld, O.P. and J. Baardman, *[Measurements of corneal thickness in patients with keratoconjunctivitis sicca]*. Klin Monbl Augenheilkd, 1990. 197(3): p. 240-3.
202. Pult, H., C. Purslow, M. Berry, and P.J. Murphy, *Clinical tests for successful contact lens wear: relationship and predictive potential*. Optom Vis Sci, 2008. 85(10): p. E924-9.
203. Barr, J.T., K.B. Schechtman, B.A. Fink, G.E. Pierce, C.D. Pensyl, K. Zadnik, and M.O. Gordon, *Corneal scarring in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: baseline prevalence and repeatability of detection*. Cornea, 1999. 18(1): p. 34-46.
204. Dundas, M., A. Walker, and R.L. Woods, *Clinical grading of corneal staining of non-contact lens wearers*. Ophthalmic Physiol Opt, 2001. 21(1): p. 30-5.
205. Murphy, P.J., J.S. Lau, M.M. Sim, and R.L. Woods, *How red is a white eye? Clinical grading of normal conjunctival hyperaemia*. Eye (Lond), 2007. 21(5): p. 633-8.
206. Bailey, I.L., M.A. Bullimore, T.W. Raasch, and H.R. Taylor, *Clinical grading and the effects of scaling*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. 32(2): p. 422-32.
207. Fenner, B.J. and L. Tong, *Corneal staining characteristics in limited zones compared with whole cornea documentation for the detection of dry eye subtypes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(13): p. 8013-9.
208. Tung, C.I., A.F. Perin, K. Gumus, and S.C. Pflugfelder, *Tear meniscus dimensions in tear dysfunction and their correlation with clinical parameters*. Am J Ophthalmol, 2014. 157(2): p. 301-310 e1.
209. !!! INVALID CITATION !!! .
210. Gumus, K., A. Yurci, E. Mirza, H. Arda, A. Oner, D. Topaktas, and S. Karakucuk, *Evaluation of ocular surface damage and dry eye status in chronic hepatitis C at different stages of hepatic fibrosis*. Cornea, 2009. 28(9): p. 997-1002.

211. Baudouin, C., P. Aragona, G. Van Setten, M. Rolando, M. Irkeç, J. Benitez Del Castillo, G. Geerling, M. Labetoulle, and S. Bonini, *Diagnosing the severity of dry eye: a clear and practical algorithm*. Br J Ophthalmol, 2014.
212. Labbe, A., Q. Liang, Z. Wang, Y. Zhang, L. Xu, C. Baudouin, and X. Sun, *Corneal nerve structure and function in patients with non-sjogren dry eye: clinical correlations*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(8): p. 5144-50.
213. Ray, W.A. and D.M. O'Day, *Statistical analysis of multi-eye data in ophthalmic research*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985. 26(8): p. 1186-8.
214. McAlinden, C., J. Khadka, and K. Pesudovs, *Statistical methods for conducting agreement (comparison of clinical tests) and precision (repeatability or reproducibility) studies in optometry and ophthalmology*. Ophthalmic Physiol Opt, 2011. 31(4): p. 330-8.
215. Bandlitz, S., C. Purslow, P.J. Murphy, and H. Pult, *The relationship between tear meniscus regularity and conjunctival folds*. Optom Vis Sci, 2014. 91(9): p. 1037-44.
216. Pult, H. and B. Riede-Pult, *Comparison of subjective grading and objective assessment in meibography*. Cont Lens Anterior Eye, 2013. 36(1): p. 22-7.
217. Dupont, W.D. and W.D. Plummer, *Power and sample size calculations: A review and computer program*. Controlled trials, 1990. 11: p. 116-128.
218. Stanislaw, P.A. and M.D. Stawicki, *RESEARCH GUIDE: Guide to free statistical software: general applications*. OPUS 12 Scientist, 2010. 4: p. 12-13.
219. Lee, J.H. and C.W. Kee, *The significance of tear film break-up time in the diagnosis of dry eye syndrome*. Korean J Ophthalmol, 1988. 2(2): p. 69-71.
220. Isreb, M.A., J.V. Greiner, D.R. Korb, T. Glonek, S.S. Mody, V.M. Finnemore, and C.V. Reddy, *Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up time and Schirmer's test*. Eye (Lond), 2003. 17(1): p. 79-83.
221. Egrilmez, S., F. Aslan, G. Karabulut, Y. Kabasakal, and A. Yagci, *Clinical efficacy of the SmartPlug in the treatment of primary Sjogren's syndrome with keratoconjunctivitis sicca: one-year follow-up study*. Rheumatol Int, 2011. 31(12): p. 1567-70.
222. Rodriguez-Torres, L.A., D.J. Porrás-Machado, A.E. Villegas-Guzman, and J.A. Molina-Zambrano, *[Analysis of incidence of ocular surface disease index with objective tests and treatment for dry eye]*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2010. 85(2): p. 70-5.
223. Raj, A., *Correlation of lipid layer thickness measurements with fluorescein tear film break-up and Schirmer's test*. Eye (Lond), 2005. 19(4): p. 484-5.
224. Lira, M., M.E. Oliveira, and S. Franco, *Comparison of the tear film clinical parameters at two different times of the day*. Clin Exp Optom, 2011. 94(6): p. 557-62.
225. Montes-Mico, R., J.L. Alio, and W.N. Charman, *Dynamic changes in the tear film in dry eyes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. 46(5): p. 1615-9.
226. Jiang, Y., H. Ye, J. Xu, and Y. Lu, *Noninvasive Keratograph assessment of tear film break-up time and location in patients with age-related cataracts and dry eye syndrome*. J Int Med Res, 2014. 42(2): p. 494-502.
227. Masmali, A., S. Alrabiah, A. Alharbi, G.A. El-Hiti, and T. Almubrad, *Investigation of tear osmolarity using the TearLab Osmolarity System in normal adults in Saudi Arabia*. Eye Contact Lens, 2014. 40(2): p. 74-8.
228. Ramos, L., N. Barreira, A. Mosquera, M.G. Penedo, E. Yebra-Pimentel, and C. Garcia-Resua, *Analysis of parameters for the automatic computation of the tear film*

- break-up time test based on CCLRU standards*. Comput Methods Programs Biomed, 2014. 113(3): p. 715-24.
229. Teson, M., M.J. Gonzalez-Garcia, A. Lopez-Miguel, A. Enriquez-de-Salamanca, V. Martin-Montanez, M.J. Benito, M.E. Mateo, M.E. Stern, and M. Calonge, *Influence of a controlled environment simulating an in-flight airplane cabin on dry eye disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. 54(3): p. 2093-9.
230. de Monchy, I., G. Gendron, C. Miceli, N. Pogorzalek, X. Mariette, and M. Labetoulle, *Combination of the Schirmer I and phenol red thread tests as a rescue strategy for diagnosis of ocular dryness associated with Sjogren's syndrome*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. 52(8): p. 5167-73.
231. Pult, H., P.J. Murphy, and C. Purslow, *A novel method to predict the dry eye symptoms in new contact lens wearers*. Optom Vis Sci, 2009. 86(9): p. E1042-50.
232. Doughty, M.J., J. Whyte, and W. Li, *The phenol red thread test for lacrimal volume--does it matter if the eyes are open or closed?* Ophthalmic Physiol Opt, 2007. 27(5): p. 482-9.
233. Cho, P. and C.C. Chan, *Interexaminer difference and the effect of training on the phenol red thread test results in Hong Kong-Chinese*. Optom Vis Sci, 2003. 80(12): p. 820-5.
234. Patel, S., J. Farrell, K.J. Blades, and D.J. Grierson, *The value of a phenol red impregnated thread for differentiating between the aqueous and non-aqueous deficient dry eye*. Ophthalmic Physiol Opt, 1998. 18(6): p. 471-6.
235. Muselier-Mathieu, A., A.M. Bron, B. Mathieu, M. Souchier, F. Brignole-Baudouin, N. Acar, L. Bretillon, and C. Creuzot-Garcher, *Ocular surface assessment in soft contact lens wearers; the contribution of tear osmolarity among other tests*. Acta Ophthalmol, 2014. 92(4): p. 364-9.
236. Gokhale, M., U. Stahl, and I. Jalbert, *In situ osmometry: validation and effect of sample collection technique*. Optom Vis Sci, 2013. 90(4): p. 359-65.
237. Utine, C.A., M. Bicakcigil, S. Yavuz, and F. Ciftci, *Tear osmolarity measurements in dry eye related to primary Sjogren's syndrome*. Curr Eye Res, 2011. 36(8): p. 683-90.
238. Fowler, F.J. and T.W. Mangione, *Standardized Survey Interviewing: Minimizing Interviewer-Related Error*, ed. Thousand Oaks. 1990, Newbury Park: CA: SAGE Publications, Inc.
239. Fowler, F.J., *Improving Survey Questions: Design and Evaluation*. Applied Social Research Methods, Volumen 38. 1995: SAGE Publications, Inc. 200.
240. Pena-Verdeal, H., C. García-Resua, L. Ramos, A. Mosquera, E. Yebra-Pimentel, and M.J. Giraldez. *Measuring the area of tear film break-up by image analysis software*. in *8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Application*. 2013. Porto (Portugal): Proc. SPIE.
241. Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Lira, M.E. Real Oliveira, M.J. Giraldez, and E. Yebra-Pimentel. *Comparison between three methods to value lower tear meniscus measured by image software*. in *8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications*. 2013. Porto (Portugal): Proc. SPIE.
242. Ramos, L., A. Mosquera, N. Barreira, M. Currás, H. Pena-Verdeal, M.J. Giráldez, and M.G. Penedo, *Computational Approach for Measuring the Tear Film Break-Up Time in an Unsupervised Manner*, in *Advanced Techniques for Knowledge Engineering and Innovative Applications*, J.W.T.L.C. Jain, Editor. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 254-267.

243. Ramos, L., A. Mosquera, N. Barreira, M. Currás, H. Pena-Verdeal, M.J. Giraldez, and M.G. Penedo. *Adaptive parameter computation for the automatic measure of the Tear Break-Up Time*. in *16th International Conference on Knowledge-Based and intelligent Information & Engineering Systems*. 2012. San Sebastian (Spain): IOS Press Ebook.
244. Ramos, L., N. Barreira, H. Pena-Verdeal, and M.J. Giraldez, *Automatic assessment of tear film break-up dynamics*. Stud Health Technol Inform, 2014. 207: p. 173-82.
245. Ramos, L., N. Barreira, A. Mosquera, H. Pena-Verdeal, and E. Yebra-Pimentel, *Break-Up Analysis of the Tear Film Based on Time, Location, Size and Shape of the Rupture Area*, in *Image Analysis and Recognition, 10th International Conference, ICIAR 2013*, M. Kamel and A. Campilho, Editors. 2013, Springer Berlin Heidelberg: Póvoa do Varzim (Portugal). p. 695-702.
246. Canny, J., *A computational approach to edge detection*. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell, 1986. 8(6): p. 679-98.
247. Zhou, L., R.W. Beuerman, A. Barathi, and D. Tan, *Analysis of rabbit tear proteins by high-pressure liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. 17(5): p. 401-12.
248. Green-Church, K.B., K.K. Nichols, N.M. Kleinholz, L. Zhang, and J.J. Nichols, *Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches*. Mol Vis, 2008. 14: p. 456-70.
249. Lam, H., L. Bleiden, C.S. de Paiva, W. Farley, M.E. Stern, and S.C. Pflugfelder, *Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome*. Am J Ophthalmol, 2009. 147(2): p. 198-205 e1.
250. Emanuel, C.F., *Delivery precision of micropipets*. Analytical Chemistry, 1973. 45(8): p. 1568-1569.
251. Iskeleli, G., Y. Karakoc, and A. Abdula, *Tear film osmolarity in patients with thyroid ophthalmopathy*. Jpn J Ophthalmol, 2008. 52(4): p. 323-6.
252. Armstrong, R.A., L.N. Davies, M.C. Dunne, and B. Gilmartin, *Statistical guidelines for clinical studies of human vision*. Ophthalmic Physiol Opt, 2011. 31(2): p. 123-36.
253. Wilcoxon, F., *Individual comparisons of grouped data by ranking methods*. J Econ Entomol, 1946. 39: p. 269.
254. Bland, J.M. and D.G. Altman, *Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement*. Lancet, 1986. 1(8476): p. 307-10.
255. Dunn, G., *Design and analysis of reliability studies : the statistical evaluation of measurement errors*. 1989, New York, London: Oxford University Press ; E. Arnold. viii, 198 p.
256. Kramer, M.S. and A.R. Feinstein, *Clinical biostatistics. LIV. The biostatistics of concordance*. Clin Pharmacol Ther, 1981. 29(1): p. 111-23.
257. Rosner, B., *On the estimation and testing of interclass correlations: the general case of multiple replicates for each variable*. Am J Epidemiol, 1982. 116(4): p. 722-30.
258. Landis, J.R. and G.G. Koch, *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics, 1977. 33(1): p. 159-74.
259. Pointer, J.S., *The diurnal variation of intraocular pressure in non-glaucomatous subjects: relevance in a clinical context*. Ophthalmic Physiol Opt, 1997. 17(6): p. 456-65.
260. du Toit, R., J.A. Vega, D. Fonn, and T. Simpson, *Diurnal variation of corneal sensitivity and thickness*. Cornea, 2003. 22(3): p. 205-9.
261. Read, S.A., M.J. Collins, and L.G. Carney, *The diurnal variation of corneal topography and aberrations*. Cornea, 2005. 24(6): p. 678-87.

262. Walker, P.M., K.J. Lane, G.W. Ousler, 3rd, and M.B. Abelson, *Diurnal variation of visual function and the signs and symptoms of dry eye*. *Cornea*, 2010. 29(6): p. 607-12.
263. Benjamin, W.J. and R.M. Hill, *Human tears: osmotic characteristics*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983. 24(12): p. 1624-6.
264. Gilbard, J.P., G.R. Cohen, and J. Baum, *Decreased tear osmolarity and absence of the inferior marginal tear strip following sleep*. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1991. 89: p. 209-13; discussion 213-4.
265. Terry, J.E. and R.M. Hill, *Human tear osmotic pressure: diurnal variations and the closed eye*. *Arch Ophthalmol*, 1978. 96(1): p. 120-2.
266. Miller, W.L., M.J. Doughty, S. Narayanan, N.E. Leach, A. Tran, A.L. Gaume, and J.P. Bergmanson, *A comparison of tear volume (by tear meniscus height and phenol red thread test) and tear fluid osmolality measures in non-lens wearers and in contact lens wearers*. *Eye Contact Lens*, 2004. 30(3): p. 132-7.
267. Cho, P., B. Brown, I. Chan, R. Conway, and M. Yap, *Reliability of the tear break-up time technique of assessing tear stability and the locations of the tear break-up in Hong Kong Chinese*. *Optom Vis Sci*, 1992. 69(11): p. 879-85.
268. Arita, R., N. Morishige, S. Koh, R. Shirakawa, M. Kawashima, T. Sakimoto, T. Suzuki, and K. Tsubota, *Increased Tear Fluid Production as a Compensatory Response to Meibomian Gland Loss: A Multicenter Cross-sectional Study*. *Ophthalmology*, 2015. 122(5): p. 925-33.
269. Craig, J.P., K. Blades, and S. Patel, *Tear lipid layer structure and stability following expression of the meibomian glands*. *Ophthalmic Physiol Opt*, 1995. 15(6): p. 569-74.
270. Craig, J.P. and A. Tomlinson, *Importance of the lipid layer in human tear film stability and evaporation*. *Optom Vis Sci*, 1997. 74(1): p. 8-13.
271. Korb, D.R., D.F. Baron, J.P. Herman, V.M. Finnemore, J.M. Exford, J.L. Hermosa, C.D. Leahy, T. Glonek, and J.V. Greiner, *Tear film lipid layer thickness as a function of blinking*. *Cornea*, 1994. 13(4): p. 354-9.
272. Srinivasan, S., K. Menzies, L. Sorbara, and L. Jones, *Infrared imaging of meibomian gland structure using a novel keratograph*. *Optom Vis Sci*, 2012. 89(5): p. 788-94.
273. Abengoza-Vela, A., F.J. Pinto, J.M. Gonzalez-Mejome, M. Rallo, C. Seres, M. Calonge, and M.J. Gonzalez-Garcia, *Contact lens case cleaning procedures affect storage solution pH and osmolality*. *Optom Vis Sci*, 2011. 88(12): p. 1414-21.
274. Stern, M.E., J. Gao, K.F. Siemasko, R.W. Beuerman, and S.C. Pflugfelder, *The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye*. *Exp Eye Res*, 2004. 78(3): p. 409-16.
275. Blackie, C.A. and D.R. Korb, *The diurnal secretory characteristics of individual meibomian glands*. *Cornea*, 2010. 29(1): p. 34-8.
276. Patel, S., R. Bevan, and J.C. Farrell, *Diurnal variation in precorneal tear film stability*. *Am J Optom Physiol Opt*, 1988. 65(3): p. 151-4.
277. Bitton, E., A. Keech, L. Jones, and T. Simpson, *Subjective and objective variation of the tear film pre- and post-sleep*. *Optom Vis Sci*, 2008. 85(8): p. 740-9.
278. Lemp, M.A., A.J. Bron, C. Baudouin, J.M. Benitez Del Castillo, D. Geffen, J. Tauber, G.N. Foulks, J.S. Pepose, and B.D. Sullivan, *Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease*. *Am J Ophthalmol*, 2011. 151(5): p. 792-798 e1.
279. Nichols, K.K., *Patient-reported symptoms in dry eye disease*. *Ocul Surf*, 2006. 4(3): p. 137-45.

280. Bron, A.J., J.M. Tiffany, N. Yokoi, and S.M. Gouveia, *Using osmolarity to diagnose dry eye: a compartmental hypothesis and review of our assumptions*. *Adv Exp Med Biol*, 2002. 506(Pt B): p. 1087-95.
281. Yedidya, T., R. Hartley, J.P. Guillon, and Y. Kanagasingam, *Automatic dry eye detection*. *Med Image Comput Comput Assist Interv*, 2007. 10(Pt 1): p. 792-9.
282. Yedidya, T., R. Hartley, and J.P. Guillon. *Automatic detection of pre-ocular tear film break-up sequence in dry eyes*. in *Digital Image Computing: Techniques and Applications (DICTA)*, 2008. 2008. Canberra, ACT.
283. Yedidya, T., P. Carr, R. Hartley, and J.P. Guillon, *Enforcing monotonic temporal evolution in dry eye images*. *Med Image Comput Comput Assist Interv*, 2009. 12(Pt 2): p. 976-84.
284. Abdelfattah, N.S., A. Dastiridou, S.R. Sadda, and O.L. Lee, *Noninvasive Imaging of Tear Film Dynamics in Eyes With Ocular Surface Disease*. *Cornea*, 2015.
285. Abdelfattah, N.S., A. Dastiridou, S.R. Sadda, and O.L. Lee. *Use of Corneal Topography to Assess Tear Film and Meibography in Ocular Surface Disease*. in *American Society of Cataract and Refractive Surgery*. 2015. San Diego.
286. Koh, S., C. Ikeda, S. Watanabe, Y. Oie, T. Soma, H. Watanabe, N. Maeda, and K. Nishida, *Effect of non-invasive tear stability assessment on tear meniscus height*. *Acta Ophthalmol*, 2015. 93(2): p. e135-9.
287. Carpenete, A., L. Ramos, N. Barreira, M.G. Penedo, H. Pena-Verdeal, and M.J. Giraldez. *On the Automation of the Tear Film Non-invasive Break-up Test*. in *IEEE 27th International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS)*. 2014. New York, NY: IEEE.
288. Lamberts, D.W., C.S. Foster, and H.D. Perry, *Schirmer test after topical anesthesia and the tear meniscus height in normal eyes*. *Arch Ophthalmol*, 1979. 97(6): p. 1082-5.
289. Kwong, Y.M. and P. Cho, *Tear meniscus height in normal and dry eyes*. *Optom Today*, 2001. 4124: p. 28-32.
290. Lim, K.J. and J.H. Lee, *Measurement of the tear meniscus height using 0.25% fluorescein sodium*. *Korean J Ophthalmol*, 1991. 5(1): p. 34-6.
291. Savini, G., P. Barboni, and M. Zanini, *Tear meniscus evaluation by optical coherence tomography*. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*, 2006. 37(2): p. 112-8.
292. Pult, H., D.R. Korb, P.J. Murphy, B.H. Riede-Pult, and C. Blackie, *A new model of central lid margin apposition and tear film mixing in spontaneous blinking*. *Cont Lens Anterior Eye*, 2015. 38(3): p. 173-80.
293. Ortega, M., N. Barreira, J. Novo, M.G. Penedo, A. Pose-Reino, and F. Gomez-Ulla, *Sirius: a web-based system for retinal image analysis*. *Int J Med Inform*, 2010. 79(10): p. 722-32.
294. Young, G., C. Hunt, and M. Covey, *Clinical evaluation of factors influencing toric soft contact lens fit*. *Optom Vis Sci*, 2002. 79(1): p. 11-9.
295. Pilat, A.V., F.A. Proudlock, P. Kumar, H. Lee, E. Papageorgiou, and I. Gottlob, *Macular morphology in patients with optic nerve head drusen and optic disc edema*. *Ophthalmology*, 2014. 121(2): p. 552-7.
296. Truong, T., E. Huang, D. Yuen, and L. Chen, *Corneal lymphatic valve formation in relation to lymphangiogenesis*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014. 55(3): p. 1876-83.
297. Kagemann, L., B. Wang, G. Wollstein, H. Ishikawa, J.E. Nevins, Z. Nadler, I.A. Sigal, R.A. Bilonick, and J.S. Schuman, *IOP elevation reduces Schlemm's canal cross-sectional area*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014. 55(3): p. 1805-9.

298. Bandlitz, S., C. Purslow, P.J. Murphy, and H. Pult, *Time course of changes in tear meniscus radius and blink rate after instillation of artificial tears*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. 55(9): p. 5842-7.
299. Yokoi, N., A. Bron, J. Tiffany, N. Brown, J. Hsuan, and C. Fowler, *Reflective meniscometry: a non-invasive method to measure tear meniscus curvature*. Br J Ophthalmol, 1999. 83(1): p. 92-7.
300. Yokoi, N., A.J. Bron, J.M. Tiffany, and S. Kinoshita, *Reflective meniscometry: a new field of dry eye assessment*. Cornea, 2000. 19(3 Suppl): p. S37-43.
301. Cappadona, S., P. Nanni, M. Benevento, F. Levander, P. Versura, A. Roda, S. Cerutti, and L. Pattini, *Improved label-free LC-MS analysis by wavelet-based noise rejection*. J Biomed Biotechnol, 2010. 2010: p. 131505.
302. Brewitt, H., *Research projects in dry eye syndrome*. Developments in ophthalmology., 2010, Basel Switzerland ; New York: Karger. xii, 151 p.
303. Baldacara, L., M.C. de Castro Ferrari, B.F. Monteiro, R.R. Uchida, and M. Sanches, *Hypomania induced by atypical antipsychotics among schizophrenic patients: report of three cases*. Pharmacopsychiatry, 2007. 40(4): p. 169-70.
304. Gilbard, J.P., S.R. Rossi, K.L. Gray, L.A. Hanninen, and K.R. Kenyon, *Tear film osmolarity and ocular surface disease in two rabbit models for keratoconjunctivitis sicca*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1988. 29(3): p. 374-8.
305. Morgan, P.B. and N. Efron, *A decade of contact lens prescribing trends in the United Kingdom (1996-2005)*. Cont Lens Anterior Eye, 2006. 29(2): p. 59-68.
306. Asbell, P.A. and M.A. Lemp, *Dry eye disease : the clinician's guide to diagnosis and treatment*. 2006, New York: Thieme. xiv, 215 p.
307. Menzies, K.L. and L. Jones, *In vitro analysis of the physical properties of contact lens blister pack solutions*. Optom Vis Sci, 2011. 88(4): p. 493-501.
308. Burke, S., K. Fridman, S. C, and V. Barniak, *Physical Properties of multipurpose lens care solutions*. Presented at the Annual Meeting of the American Academy of Optometry, 2009: p. 11 -14.
309. Lee, J.H., K. Min, S.K. Kim, E.K. Kim, and T.I. Kim, *Inflammatory cytokine and osmolarity changes in the tears of dry eye patients treated with topical 1% methylprednisolone*. Yonsei Med J, 2014. 55(1): p. 203-8.
310. Lopilly Park, H.Y., J.H. Kim, K.M. Lee, and C.K. Park, *Effect of prostaglandin analogues on tear proteomics and expression of cytokines and matrix metalloproteinases in the conjunctiva and cornea*. Exp Eye Res, 2012. 94(1): p. 13-21.

ANEXOS

ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

ANEXO 2: CUESTIONARIO OSDI

ANEXO 3: CUESTIONARIO DE MCMONNIES

ANEXO 4: ABSTRACTS DE LAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS





ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

D/Dña _____ con DNI _____ edad _____ años, con domicilio en _____ provincia de _____ manifiesto que he sido informado/a por _____ sobre los siguientes aspectos en cuanto a mi participación en el estudio arriba mencionado.

1. He leído la hoja de información que se me ha entregado.
2. Mi participación en este estudio es de forma voluntaria.
3. Acepto que se me realicen las exploraciones optométricas necesarias para el desarrollo del estudio.
4. Conozco y asumo los efectos secundarios que se puedan derivar de este estudio y que me han explicado los investigadores.
5. He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el estudio.
6. He hablado con el equipo investigador abajo firmante.

Por lo que declaro que todas mis dudas y preguntas han sido aclaradas, que he comprendido que mi participación es voluntaria y que comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Por ello doy mi consentimiento para participar en el estudio.

En Santiago de Compostela, a _____ de _____ 201 ____

Firma del paciente _____ Firma del Investigador _____

Estoy de acuerdo en que mis datos personales relativos a este trabajo sean almacenados, procesados electrónicamente y transmitidos, con propósitos de análisis de los datos derivados de este estudio. Doy mi consentimiento para que el personal autorizado del Servicio de Optometría o las autoridades sanitarias revisen que el estudio se está llevando a cabo de manera correcta e inspeccionen mi historial referente a mi colaboración en el mismo.

Así mismo autorizo a mi investigador a que revele la información necesaria recogida en el estudio para que pueda ser procesada, sin que se revele mi identidad.



ANEXO 2: CUESTIONARIO OSDI

**OCULAR SURFACE DISEASE INDEX
(OSDI)**



Nombre:

Fecha / /

Realice a su paciente las siguientes 12 preguntas, y rodee con un círculo el número en la casilla que mejor represente cada respuesta. A continuación, rellena las casillas A, B, C, D y E de acuerdo a las instrucciones.

¿Ha experimentado cualquiera de los siguientes síntomas durante la última semana?

	Todo el Tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	Algunas veces	Nunca
1. Los ojos sensibles a la luz	4	3	2	1	0
2. Ojos con sensación arenosa	4	3	2	1	0
3. Ojos doloridos o inflamados	4	3	2	1	0
4. Visión borrosa	4	3	2	1	0
5. Visión pobre	4	3	2	1	0
Puntuación total de las preguntas de la 1 a la 5					(A)

¿Ha experimentado problema con sus ojos que le impidieran realizar alguna de las siguientes actividades durante la última semana?

	Todo el Tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	Algunas veces	Nunca	N/A
6. Leer	4	3	2	1	0	N/A
7. Conducir de noche	4	3	2	1	0	N/A
8. Trabajar con el ordenador	4	3	2	1	0	N/A
9. Ver la televisión	4	3	2	1	0	N/A
Puntuación total de las preguntas de la 6 a la 9					(B)	

¿Ha experimentado incomodidad en alguna de las siguientes situaciones durante la última semana?

	Todo el Tiempo	La mayor parte del tiempo	La mitad del tiempo	Algunas veces	Nunca	N/A
10. Condiciones de viento	4	3	2	1	0	N/A
11. Zonas de baja humedad o secas	4	3	2	1	0	N/A
12. Zonas con aire acondicionado	4	3	2	1	0	N/A
Puntuación total de las preguntas de la 10 a la 12					(C)	

Suma los subtotales A, B y C para obtener D (D = suma de las calificaciones de todas las respuestas a las preguntas)	(D)
El valor E es el total de respuestas respondidas (sin contar las marcadas como N/A)	(E)
Los valores para determinar la gravedad del ojo seco mediante la fórmula OSDI ©	(OSDI)



ANEXO 3: CUESTIONARIO DE MCMONNIES



CUESTIONARIO DE MCMONNIES

Nombre:

Fecha / /

Por favor, marque con una cruz la opción correcta

Hombre Mujer

Menos de 25 años 25- 45 años Más de 45 años

¿Actualmente usuario de lentes de contacto?

No Sí, lentes de contacto rígidas Sí, lentes de contacto blandas

1) ¿Padece alguno de los siguientes síntomas oculares?

Picor

Quemazón

Sequedad

Molestia/ dolor

Sensación de arenilla

¿Con qué frecuencia?

Siempre Casi siempre Algunas veces Nunca

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

Si No No lo sé

3) ¿Padece artritis?

Si No No lo sé

4) ¿Tiene problemas de tiroides?

Si No No lo sé

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

Siempre Casi siempre Algunas veces Nunca

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

Si No A veces

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

Si No A veces No Aplicable

8) ¿Está tomando algún medicamento?

Anticonceptivos orales
Antihistamínicos
(gotas o pastillas)
Pastillas para problemas digestivos o
intestinales
Pastillas para dormir

Tranquilizantes
Diuréticos
Pastillas para la presión
de la sangre
Otro ¿Cuál?

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

Si No A veces No Aplicable

10) ¿Sabe si duerme con los ojos abiertos?

Si No A veces No lo sé

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

Si No A veces



ANEXO 4: ABSTRACTS DE LAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

1 PUBLICACIONES

*Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, M. Miñones, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2015). "Accuracy of a Freezing Point Depression Technique Osmometer." *Optom Vis Sci* (92e) 273-83*

PURPOSE: The purpose of this study was to examine the precision and accuracy of the Fiske 110 Osmolarity System under different protocols to determine the possible applications of this device in tear film research and clinical practice. **METHODS:** Three separate studies were performed. In the first, Fiske 110 measurements were made on undiluted and diluted (1:1, 1:4, and 1:9 dilutions) standard samples of different osmolarity values: 50, 290, and 850 mOsm/kg and 297 and 338 mOsm/l. In the second study, measurements were made on different types of contact lens care solutions. Finally, in an agreement study, measurements were made in two sets of 60 subjects to compare TearLab versus Fiske 110 (using both 2- and 4- μ L tear sample). **RESULTS:** Although osmolarity measurements for undiluted solutions differed statistically from reference standard values, all biases were in the tolerance range proposed by the manufacturer except for the 850-mOsm/kg solution. No significant differences from reference osmolarity values were observed for the 1:1 and 1:4 diluted 297- and 338-mOsm/l H₂O solutions, respectively, although all diluted solutions showed a possible bias out of the range provided. Osmolarities for the soft contact lens solutions fell within the range 293 to 309 mOsm/kg with the exception of Opti-Free Express (225 mOsm/kg). In the agreement study, significant differences were observed between measurements obtained using the TearLab and both Fiske 110 procedures, although the Fiske 110 (4 μ l) procedure was closer to the TearLab than the Fiske 110 (2 μ l) procedure. **CONCLUSIONS:** For undiluted solutions, the Fiske 110 shows good performance, making it a useful device for osmolarity measurements in lens care solutions or eye drops. A worse performance was observed for more diluted standard solution samples. When testing diluted samples, performance was acceptable for osmolarity values close to tear values.

*Ramos, L., N. Barreira, H. Pena-Verdeal, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2015). "Computational approach for tear film assessment based on break-up dynamics." *Biosystems Engineering* (138):90-103*

Dry eye syndrome is a common disorder of the tear film which affects a remarkable percentage of the population, impacting on quality of life. The study of the tear film stability is essential for the dry eye characterisation. The Break-Up Time (BUT) is a clinical test which computes the time the first tear film break-up appears. Besides the time, break-up properties can be related to specific aspects of the tear film that could affect dry eye severity. This work describes a fully automatic methodology to compute the BUT measurement and evaluate the dynamics of break-up areas. This methodology has been tested on a data set consisting of 18 tear film videos, achieving similar results to the manual annotations marked by the experts. This analysis provides useful additional information for the tear film assessment.

*Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, B. Remeseiro, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2014). "Correlation between tear osmolarity and tear meniscus." *Optom Vis Sci* 91(12): 1419-1429.*

PURPOSE: To examine the relationship between tear meniscus height (TMH) and subjective meniscus grading (subjective tear meniscus [TM]) with tear osmolarity. **METHODS:** Tear osmolarity measurements (using TearLab) and digital images of the TM were obtained in 177 consecutive patients undergoing an eye examination at our optometry clinic (Universidad de Santiago de Compostela, España) who fulfilled the study's inclusion criteria. Participants were also administered the McMonnies and Ocular Surface Disease Index questionnaires for the detection of dry eye disease. The lower TM was videotaped by a digital camera attached to a slit lamp in its central portion without fluorescein instillation. After the study, a masked observer extracted an image from each video and measured the TMH using open source software (NIH ImageJ). Subsequently, the masked observer subjectively graded the appearance of each meniscus. For statistical analysis, subjects were stratified by age and by dry eye symptoms as indicated by their scores in the two questionnaires. **RESULTS:** In the whole study population, a significant relationship was observed between osmolarity and TMH ($r = -0.41$, $p < 0.001$) and osmolarity and subjective TM ($r = 0.35$, $p < 0.001$). A cluster analysis revealed similar correlations when subjects were stratified by age or dry eye symptoms, these correlations being more pronounced in older and more symptomatic subjects. Objective TMH measurements and subjective meniscus quality were also correlated ($r = -0.75$, $p < 0.001$). **CONCLUSIONS:** Osmolarity and both objective TMH measurements and subjective interpretation of the meniscus showed high correlation, especially in older symptomatic subjects.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Miñones, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2014). "Interobserver and intraobserver repeatability of lipid layer pattern evaluation by two experienced observers." *Cont Lens Anterior Eye* 37(6): 431-437.

PURPOSE: The lipid layer plays a major role in limiting evaporation of the tear film. Based on interference phenomena, there is a test directed to lipid layer pattern (LLP) evaluation, but is affected by subjective interpretation of the patterns. The aim of this study is to compare the LLP evaluation between two experienced observers on a group of healthy patients. Furthermore, observers re-evaluated the same images to check their individual repeatability. **MATERIALS AND METHODS:** LLP was examined using a Tearscope-plus (Keeler, Windsor, UK) attached to a slit lamp. Tear film was recorded by a Topcon DV-3 digital camera video and LLP images were captured. This yielded 124 LLP images that were categorized (based on Guillon's scheme) by two expert observers in two sessions separated by one month. Interobserver repeatability and intraobserver repeatability between both sessions were studied by using Cohen's kappa coefficient. **RESULTS:** Comparing LLP categorization between both observers, Cohen's kappa coefficient was 0.615 and 0.633 for first and second session, respectively. When comparing LLP categorization by the same observer between both sessions, Cohen's kappa coefficient was 0.770 and 0.812 for Observer 1 and Observer 2, respectively. These results indicate substantial correlation in all cases. The most frequent misinterpretations were between open and closed meshwork and Wave and closed meshwork patterns. **CONCLUSION:** Although substantial correlation was found between categorizations of experienced observers, misinterpretation of the patterns may appear even in the same observer. Some misinterpretations between adjacent patterns could be palliated by including intermediate patterns between those categories.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, L. Ramos, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2015). "Diurnal BUT variations determined in healthy subjects by software-assisted interpretation of tear film videorecordings." *Clin Exp Optom Accepted* 6 April.

Background: This study was designed to examine diurnal variations in tear film break-up time (BUT) and maximum blink interval (MBI) and to assess two different ways of calculating these variables on video recordings of the BUT test interpreted with the help of especially designed software. The repeatability of interpreting BUT video recordings was also addressed. **Methods:** Twenty six healthy young adults were enrolled after ruling out dry eye according to a battery of tests (OSDI, McMonnies, Schirmer test, phenol red test and corneal staining). BUT and MBI were determined on video-recordings of the BUT test conducted over a day in four sessions (9.30 am, 12.30 pm, 3.30 pm and 6.30 pm). In each session, the test was repeated three times to give three videos in which three BUT and MBI values were obtained by a masked observer. BUT and MBI were determined by averaging the three measurements and by averaging only the two closest measurements. Finally, two further experienced observers re-examined the videos to assess the repeatability of the BUT measurements made. **Results:** No diurnal variation in BUT was observed regardless of whether 3 or 2 video measurements were averaged. Significant correlation was detected between BUT and MBI. Inter-observer repeatability was better when BUT times were no longer than 15 seconds. **Conclusions:** Tear film BUT was not influenced by the time of day and moderate to strong correlation with MBI was observed in all four sessions. The software-assisted method used proved useful and identified the need to clarify the BUT end-point, and to limit the test to 15 seconds to improve observer repeatability.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, L. Ramos, E. Yebra-Pimentel and M. J. Giraldez (Submission 01/08/2015). "Analysis of the relationship between tear film dynamic stability and osmolarity." *Ophthalmic Physiol Opt*.

Purpose: This study was designed to analyse how the area of tear film breakup and speed are related with classical break-up time (BUT) and osmolarity. **Methods:** 110 subjects were instilled with fluorescein, and by using a camera attached to the slit lamp, a total of three video of the tear film was then recorded after instructing the subject to blink. From each video, 4 frames were extracted: initial tear film break-up (AB_0), area 1 second after break up (AB_1), area 2 seconds after break up (AB_2) and break-up area just before the next reflex blink (AB_F). Area of tear film break (AB) and speed (SB) were determined using ImageJ. BUT was determined on video-recordings by a masked observer through assistance software. Tear osmolarity was obtained using TearLab. Correlations as well as ANOVA analyses under different cluster cut-of criteria between AB, SB, BUT and osmolarity were analysed. **Results:** All correlations between AB or SB parameters and BUT showed significant negative trend (from $r = -0.212$; AB_0 on BUT vs. BA to $r = -0.657$; BS_s2 on BUT vs. SB). Almost all the parameters showed statistically significant differences between BUT subgroups (one-way ANOVA, all parameters $p \leq 0.002$, except AB_0). Regarding osmolarity, all correlations with AB or SB parameters showed significant positive trend (from $r = 0.206$; AB_0 on osmolarity vs. AB to $r = 0.565$; SB_s2 on osmolarity vs. SB). Almost all the parameters showed statistically significant differences between osmolarity

subgroups (one-way ANOVA, all parameters $p \leq 0.0001$, except AB_0). Conclusions: There is a close relationship between tear film break-up time and osmolarity with the area of tear film break and speed.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, M. Miñones, E. Yebra-Pimentel and M. J. Giraldez (Submission 28/05/2015). "Correlation between lid margin meibum and tear film stability." Clin Exp Optom.

Purpose: To examine the relationship of meibomium secretion with tear film break-up time (BUT) and maximum blink interval (MBI), using different averaging methods and symptoms cluster analysis. Methods: 145 patients (64 men, 81 women; aged from 18 to 54 years) who fulfilled the study's inclusion criteria were recruited for the study. Using Meibometer MB550 under controlled environmental conditions, 5 curves were generated from the measurement performed on each patient. Meibometry curves were averaged as the mean of the higher values, mean of the 8 central values and mean of the 15 central values. BUT/MBI was repeated three times to give three videos in which three values were obtained by a masked observer. Both BUT and MBI parameters were determined on video-recordings with software-assisted interpretation in frames and values were determined by averaging the three measurements and by averaging only the two closest measurements. Subjects were also stratified following OSDI score criteria. Results: In the whole study population, regardless averaging methods, a significant relationship (all $p \leq 0.005$) was observed between Meibometer results and BUT (from $r = 0.213$ to $r = 0.285$) and Meibometer values and MBI (from $r = 0.224$ to $r = 0.296$). A cluster analysis revealed similar correlations when subjects were stratified by eye symptoms, being more pronounced on symptomatic subjects, ranging from $r = 0.443$ to $r = 0.568$ on BUT, and from $r = 0.679$ to $r = 0.721$ on MBI. Conclusion: There is relationship of meibomium oil secreted levels with tear film break stability and the interblink need, especially in symptomatic subjects.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, N. Barreira, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (Submission 11/03/2015; Revision 1 04/08/2015). "Validation of an open-source software for tear meniscus height measurement." Cont Lens Anterior Eye.

Purpose: Different values of the lower tear meniscus height (TMH) can be obtained depending on the method and technique of measurement employed. The aim of this study was to validate a method of measuring TMH by using an open source software. Material and methods: 176 subjects were included in the study. The lower tear meniscus was videotaped by a digital camera attached to a slit lamp in the central portion and with Tearscope plus attached to the slit lamp. A masked observer extracts an image from each video. TMH was measured from the lower lid to the upper limit of the tear meniscus for both slit-lamp (TMH-SL) and Tearscope (TMH-Tc). Two observers measure the TMH in each method by using open source software of measurement based on Java (NIH ImageJ). Image sets were measured in a masked and randomized order. Subsequently to the THM measurement, the masked observers assigned a four grading and healthy/abnormal subjective classification to each central meniscus. Results: There was a concordance between measurements performed by the observers on both illumination protocols (paired t-test; $p = 0.382$ for TMH-SL, $p = 0.136$ for TMH-Tc). All TMH showed statistically significant differences between subjective subgroups (all parameters $p \leq 0.045$). There was an inter-observer concordance on almost of TMH measurement stratified grade by grade (paired t-test; all $p \geq 0.185$, except Grades 3 and 4 on slit-lamp evaluation both $p < 0.009$). Conclusion: This study showed a useful tool to objectively measure TMH by photography.

2 PROCEEDING

Sánchez, L., N. Barreira, H. Pena-Verdeal and E. Yebra-Pimentel (2015). A Novel Framework for Hyperemia Grading Based on Artificial Neural Networks. Advances in Computational Intelligence, 13th International Work-Conference on Artificial Neural Networks, IWANN 2015, Palma de Mallorca, España, June 10-12, 2015. Proceedings, Part I, Springer International Publishing.

A common symptom of several pathologies is hyperemia that occurs when a certain tissue has an abnormal hue of red. An increase of blood flow causes the engorgement of blood vessels, which produces the coloration. Hyperemia is an important parameter that specialists take into account when diagnosing diseases such as dry eye syndrome or problems derived from contact lenses wearing. In this work, we propose an automatic methodology to measure the hyperemia level of the bulbar conjunctiva. This methodology emphasizes the transformation from the extracted features to grading scales, using artificial neural networks for the process.

Carpente, A., L. Ramos, N. Barreira, M. G. Penedo, H. Pena-Verdeal and M. J. Giraldez (2014). On the Automation of the Tear Film Non-invasive Break-up Test. IEEE 27th International Symposium on Computer-Based Medical Systems (CBMS), New York, NY, IEEE.

Dry eye syndrome (DES) is a common disorder of the tear film, affecting a significant percentage of the population. The Non Invasive Break-Up Time (NIBUT) is a clinical test used for the diagnosis of DES. In this work, we propose a methodology for the semi-automatic computation of the NIBUT test. We tested our methodology on a dataset composed of 15 videos manually annotated and high success rates were obtained. The promising results of this approach mean a step forward on the development of computer aided tools for DES assessment.

Ramos, L., N. Barreira, H. Pena-Verdeal and M. J. Giraldez (2014). "Automatic assessment of tear film break-up dynamics." *Stud Health Technol Inform* 207: 173-182.

Dry eye syndrome is a common disorder of the tear film which affects a remarkable percentage of the population. The Break-Up Time (BUT) is a clinical test used for the diagnosis of this disease, which computes the time the first tear film break-up appears. This work describes a fully automatic methodology to compute the BUT measurement and evaluate the break-up dynamics until the final blink. This analysis provides useful additional information for the assessment of tear film stability.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, L. Ramos, A. Mosquera, E. Yebra-Pimentel and M. J. Giraldez (2013). *Measuring the area of tear film break-up by image analysis software. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Application, Porto (Portugal), Proc. SPIE.*

Tear film breakup time (BUT) test only examines the first break in the tear film, but subsequent tear film events are not monitored. We present a method of measuring the area of breakup after the appearance of the first breakup by using open source software. Furthermore, the speed of the rupture was determined. 84 subjects participated in the study. 2 μ l volume of 2% sodium fluorescein was instilled using a micropipette. The subject was seated behind a slit-lamp using a cobalt blue filter together with a Wratten 12 yellow filter. Then, the tear film was recorded by a camera attached to the slit lamp. 4 frames of each video was extracted, the first rupture (BUT_0), breakup after 1 second (BUT_1), rupture after 2 seconds (BUT_2) and breakup before the last blink (BUT_F). Open source software of measurement based on Java (NIH ImageJ) was used to measure the number of pixels in areas of breakup. These areas were divided by the area of exposed cornea to obtain the percentage of ruptures. Instantaneous breakup speed was calculated for second 1 as the difference between BUT_1 - BUT_0, whereas instant speed for second 2 was BUT_2 - BUT_1. Mean area of breakup obtained was: BUT_0 = 0.26%, BUT_1 = 0.48%, BUT_2 = 0.79% and BUT_F = 1.61%. Break speed was 0.22 area/sec for second 1 and 0.31 area/sec for second 2, showing a statistical difference between them ($p = 0.007$). Post BUT analysis may be easily monitoring with the aid of this software. © (2013) COPYRIGHT Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). Downloading of the abstract is permitted for personal use only.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, B. Remeseiro, M. G. Penedo, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2013). *Criteria for lipid layer pattern evaluation: Pli-marker database. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications, Porto (Portugal), Proc. SPIE.*

The purpose of this study is to establish the procedure of acquisition and evaluate the Lipid layer pattern (LLP) by Tearscope in order to enhance this useful technique. To aid this purpose, we present a new broad LLP images database (included in a web application called Pli-marker) the tear film lipid layer was examined using a Tearscope-plus (Keeler, Windsor, UK). To capture LLPs videos a Topcon DV-3 digital camera was used and attached to the slit lamp. All videos were stored in a computer via Topcon IMAGENet i-base software and LLP images were obtained and uploaded at Pli-marker web application, which offers the manual selection of regions associated to a specific LLP. 50 images were analysed by 4 experienced optometrists. Each of them marked (using Pli-marker) those areas in the 50 images that corresponded with some of the 5 LLP: open meshwork (OM), closed meshwork, (CM), wave (W), amorphous (AM) and color fringe (CO). From the 50 images we obtained 25 areas of OM, 22 areas of CM, 20 areas of W, 46 areas of AM and 17 areas of CO that 4 observers were in accordance. We present an example of 4 pictures for each area of concordance together with the description of the features used for categorizing the LLP in our study. This work describes the methodology used in our research project, including settings for capture image, and the criteria for subjective categorization of the LLP accomplished by a set of images.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Miñones, J. Gilino, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2013). *Accuracy of two osmometers on standard samples: electrical impedance technique and freezing point depression technique. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications, Porto (Portugal), Proc. SPIE.*

High tear fluid osmolarity is a feature common to all types of dry eye. This study was designed to establish the accuracy of two osmometers, a freezing point depression osmometer (Fiske 110) and an electrical impedance

osmometer (TearLab™) by using standard samples. To assess the accuracy of the measurements provided by the two instruments we used 5 solutions of known osmolarity/osmolality; 50, 290 and 850 mOsm/kg and 292 and 338 mOsm/l. Fiske 110 is designed to be used in samples of 20 µl, so measurements were made on 1:9, 1:4, 1:1 and 1:0 dilutions of the standards. Tear Lab is addressed to be used in tear film and only a sample of 0.05 µl is required, so no dilutions were employed. Due to the smaller measurement range of the TearLab, the 50 and 850 mOsm/kg standards were not included. 20 measurements per standard sample were used and differences with the reference value was analysed by one sample t-test. Fiske 110 showed that osmolarity measurements differed statistically from standard values except those recorded for 290 mOsm/kg standard diluted 1:1 ($p = 0.309$), the 292 mOsm/l H₂O sample (1:1) and 338 mOsm/l H₂O standard (1:4). The more diluted the sample, the higher the error rate. For the TearLab measurements, one-sample t-test indicated that all determinations differed from the theoretical values ($p = 0.001$), though differences were always small. For undiluted solutions, Fiske 110 shows similar performance than TearLab. However, for the diluted standards, Fiske 110 worsens.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Lira, M. E. Real Oliveira, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2013). Comparison between three methods to value lower tear meniscus measured by image software. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications, Porto (Portugal), Proc. SPIE.

To measure different parameters of lower tear meniscus height (TMH) by using photography with open software of measurement. TMH was addressed from lower eyelid to the top of the meniscus (absolute TMH) and to the brightest meniscus reflex (reflex TMH). 121 young healthy subjects were included in the study. The lower tear meniscus was videotaped by a digital camera attached to a slit lamp. Three videos were recorded in central meniscus portion on three different methods: slit lamp without fluorescein instillation, slit lamp with fluorescein instillation and Tearscope™ without fluorescein instillation. Then, a masked observer obtained an image from each video and measured TMH by using open source software of measurement based on Java (NIH ImageJ). Absolute central (TMH-CA), absolute with fluorescein (TMH-F) and absolute using the Tearscope (TMH-Tc) were compared each other as well as reflex central (TMH-CR) and reflex Tearscope (TMH-TcR). Mean \pm S.D. values of TMH-CA, TMH-CR, TMH-F, TMH-Tc and TMH-TcR of 0.209 ± 0.049 , 0.139 ± 0.031 , 0.222 ± 0.058 , 0.175 ± 0.045 and 0.109 ± 0.029 mm, respectively were found. Paired t-test was performed for the relationship between TMH-CA – TMH-CR, TMH-CA – TMH-F, TMH-CA – TMH-Tc, TMH-F – TMH-Tc, TMH-Tc – TMH-TcR and TMH-CR – TMH-TcR. In all cases, it was found a significant difference between both variables (all $p < 0.008$). This study showed a useful tool to objectively measure TMH by photography. Eye care professionals should maintain the same TMH parameter in the follow-up visits, due to the difference between them. © (2013) COPYRIGHT Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). Downloading of the abstract is permitted for personal use only.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Lira, M. G. Penedo, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2013). Interobserver and intraobserver repeatability of lipid layer pattern evaluation by two experienced observers. 8th Iberoamerican Optics Meeting and 11th Latin American Meeting on Optics, Lasers, and Applications, Porto (Portugal), Proc. SPIE.

The lipid layer plays a major role in limiting evaporation of the tear film. Based on interference phenomena, there is a test directed to lipid layer pattern (LLP) evaluation, but is affected by subjective interpretation of the patterns. The aim of this study is to compare the LLP evaluation between two experienced observers on a group of healthy patients. Furthermore, the observers re-evaluated the same images in order to check their individual repeatability. LLP was examined using a Tearscope-plus (Keeler, Windsor, UK) attached to a slit lamp. Tear film was recorded by a Topcon DV-3 digital camera video and LLP images were captured. This yielded 124 LLP images that were categorized (based on Guillon's schema) by two expert observers in two sessions separated by one month. Interobserver repeatability and intraobserver repeatability between both sessions were studied by using Cohen's kappa coefficient. Comparing LLP categorization between both observers, Cohen's kappa coefficient was 0.615 and 0.633 for first and second session, respectively. When comparing LLP categorization by the same observer between both sessions, Cohen's kappa coefficient was 0.770 and 0.812 for Observer 1 and Observer 2. These results indicate substantial correlation in all cases [range of 0.61–0.80]. The most frequent misinterpretations were between open and closed meshwork and Wave and closed meshwork patterns. Although substantial correlation was found between categorizations of experienced observers, misinterpretation of the patterns may appear even in the same observer. Some misinterpretations between adjacent patterns could be palliated by including intermediate patterns between those categories. © (2013) COPYRIGHT Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE). Downloading of the abstract is permitted for personal use only.

Ramos, L., A. Mosquera, N. Barreira, M. Currás, H. Pena-Verdeal, M. J. Giraldez and M. G. Penedo (2013). Computational Approach for Measuring the Tear Film Break-Up Time in an Unsupervised Manner. *Advanced Techniques for Knowledge Engineering and Innovative Applications*. J. W. T. L. C. Jain, Springer Berlin Heidelberg. 246: 254-267.

Dry eye syndrome is a common disorder of the tear film, affecting a significant percentage of the population. The Break-Up Time (BUT) is a clinical test used for the diagnosis of this disease. In this research, it is proposed an automatic methodology to evaluate the BUT test. This methodology locates the different measurement areas from a video of the tear film, extracts the Region of Interest (ROI) and performs the BUT test in each measurement area. Furthermore, it is independent of some specific features of each video such as the eye size, the intensity variation, or the starting point of the measurement frame sequence. This methodology has been tested on a dataset composed of 18 videos that have been annotated by four different experts. The average difference between the automatic measurement and the experts' measures is on the acceptable range considering the high inter-observer variance

Ramos, L., N. Barreira, A. Mosquera, H. Pena-Verdeal and E. Yebra-Pimentel (2013). Break-Up Analysis of the Tear Film Based on Time, Location, Size and Shape of the Rupture Area. *Image Analysis and Recognition, 10th International Conference, ICIAR 2013*. M. Kamel and A. Campilho. Póvoa do Varzim (Portugal), Springer Berlin Heidelberg. 7950: 695-702.

The Break-Up Time test (BUT) evaluates the quality and stability of the tear film. It is used for the diagnosis of the dry eye syndrome, a common disorder of the tear film, affecting a significant percentage of the population. This work describes a fully automatic methodology to compute the time in which the break-up occurs and to analyse the rupture zone. This analysis provides useful quantitative and qualitative information for the clinical practice about the location, size and shape of the break-up areas.

Ramos, L., A. Mosquera, N. Barreira, M. Currás, H. Pena-Verdeal, M. J. Giraldez and M. G. Penedo (2012). Adaptive parameter computation for the automatic measure of the Tear Break-Up Time. *16th International Conference on Knowledge-Based and intelligent Information & Engineering Systems, San Sebastian (España), IOS Press EBook*.

Dry eye syndrome is a common disorder of the tear film, affecting a significant percentage of the population. The Break-Up Time (BUT) is a clinical test used for the diagnosis of this disease. In this work, we propose several improvements for the automatic computation of the BUT measure that solve the limitations of previous approaches. In particular, we present several procedures for the automatic computation of some parameters involved in the BUT measurement, such as the eye size, the intensity variation, or the starting point of the measurement frame sequence. We have tested our methodology on a dataset composed of 18 videos annotated by 4 different experts. The average difference between the automatic measure and the experts' measures is on the acceptable range considering the high inter-observer variance.

3 COMUNICACIONES A CONGRESOS

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, E. Yebra-Pimentel and M. J. Giraldez (2015). Differences between morning and afternoon tear film osmolarity in normal subjects. Pilot Study. *12th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV15)*. Braga (Portugal).

Purpose: Many tear physiological variables oscillate during the day. This study was designed to assess diurnal variations in tear film quality, as reflected by tear osmolarity. Correlations with gender were also examined. Methods: Volunteers were recruited from patients undergoing an eye examination at the Optometry Clinic of the Optometry Faculty (Universidad de Santiago de Compostela, España). A total of 26 healthy subjects who fulfilled the study's inclusion criteria were enrolled for the study: a score > 13 for OSDI, a score > 10 for McMonnies, > 14.5 mm for both Schirmer I test without anaesthesia and phenol red test, a corneal staining grade ≤ 1 on the Oxford Grading Scale, and a central tear meniscus height without fluorescein ≥ 0.20mm. Tear osmolarity was measured using the TearLab™ system in two separated sessions, at 9.30 AM and 6.30 PM. Results: Tear osmolarity (Mean ± SD) was 312.54 ± 11.35 mOsm/l and 296.46 ± 13.66 mOsm/l at 9.30 AM and 6.30 PM respectively, being significantly lower at 6.30 PM than at 9.30 AM (Mean difference = 16.08 ± 10.15 mOsm/l; paired t-test: p < 0.001), indicating better tear film quality in the afternoon than morning. When stratifying by gender, osmolarity was also significantly higher in the morning than afternoon both in male and female (Male mean difference = 17.22 ± 12.06 mOsm/l; Female mean difference = 15.47 ± 9.33 mOsm/l; paired t-test: p ≤ 0.003 both). Conclusions: Tear film does appear to be influenced by the time of day. Osmolarity readings also indicated an improvement (lower osmolarity) in the afternoon, regardless to gender.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, L. Sánchez, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2015). Validation of an open source software applied to tear meniscus height assessment. 12th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV15). Braga (Portugal).

Purpose: Different values of the lower tear meniscus height (TMH) can be obtained depending on the method and technique of measurement employed. The aim of this study was to validate a method of measuring TMH by using an open source software. Methods: 176 subjects were included in the study. The lower tear meniscus in the central portion was videotaped by a digital camera attached to a slit lamp in the central portion and with Tearscope plus attached to the slit lamp. A masked observer extracts an image from each video. TMH was measured from the lower lid to the upper limit of the tear meniscus for both slit-lamp (TMH-SL) and Tearscope (TMH-Tc). Two observers measure the TMH in each method by using open source software of measurement based on Java (NIH ImageJ). Results: Mean \pm SD in TMH-SL was 0.199 ± 0.066 mm for observer 1 and 0.198 ± 0.064 mm for observer 2; meanwhile TMH-Tc was 0.127 ± 0.054 mm for observer 1 and 0.128 ± 0.053 mm for observer 2. There were no differences in the measurements performed by both observers (paired t-test: $p = 0.382$ for TMH-SL; $p = 0.136$ for TMH-Tc). Conclusion: This study showed a useful tool to objectively measure TMH by photography.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2015). Correlation between tear osmolarity and tear meniscus under symptomatic clustering. 12th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV15). Braga (Portugal).

Purpose: Osmolarity is defined as the number of dissolved solute particles in one kilogram of solution, regardless of particle shape, size, density, configuration or charge. Hence a higher osmolarity will induce a greater amount of evaporation from the eye surface and thus reduce tear film volume. Given the tear meniscus holds some 75–90% of the total tear film volume any reduction in TMH should indicate an increase in tear film osmolarity. The present study was designed to examine the relationship between tear meniscus height (TMH) and subjective meniscus grading (subjective TM) with tear osmolarity for subjects stratified by dry eye symptoms. Methods: Subjects and procedure: One hundred and seventy-seven (177) consecutive patients (78 male, 99 female) of mean age 25.92 ± 12.03 years (18 to 65 years) were recruited among subjects visiting the Optometry Clinic of the Optometry Faculty (Universidad de Santiago de Compostela, España) for an eye examination. Participants were administered the McMonnies and Ocular Surface Disease Index (OSDI) questionnaires. Osmolarity: The TearLabTM Osmometer (TearLabTM Corp., San Diego, CA, USA) was used to measure the osmolarity of the tear film. Only a $0.05 \mu\text{l}$ tear sample is needed and measurements are directly made on the tear meniscus using the probe. Its measurement range is 275 to 400 mOsm/l. Tear meniscus height Subjective meniscus grading: The lower tear meniscus was videotaped in its central portion without fluorescein instillation by a Topcon DV-3 digital camera attached to the slit lamp and stored using Topcon IMAGEnet i-base. An image from each video was extracted by a masked observer, and TMH was measured in its central portion (at 6 o'clock) as the distance between the darker edge of the lower eyelid and the upper limit of the tear meniscus using an open source software (NIH ImageJ). Subsequently, the masked observer subjectively graded the appearance of each meniscus. Results: Subjects were stratified by dry eye symptoms according with their scores in questionnaires. TMH versus osmolarity was negatively correlated while positive correlation was detected between osmolarity and TM quality parameter (Higher Subjective grading). For non-symptomatic subjects correlation between osmolarity and meniscus variables was very weak for both the objective ($r = -0.19$, $p = 0.049$ for osmolarity vs. TMH) and subjective ($r = 0.08$, $p = 0.4$ for osmolarity vs. TM quality); in subjects with mild symptoms this relationship was moderate in both comparisons ($r = -0.48$, $p = 0.002$ for osmolarity vs. TMH; $r = 0.51$, $p < 0.001$ for osmolarity vs. TM quality); strongly symptomatic subjects correlations with both the objective ($r = -0.52$, $p = 0.002$, for osmolarity vs. TMH) and subjective ($r = 0.64$, $p < 0.001$ for osmolarity vs. TM quality), were slightly improved over those observed in the subjects with mild DED symptoms. Thus, correlations became stronger with increasing symptoms. Conclusions: Osmolarity and both objective TMH measurements and subjective interpretation of the meniscus showed high correlation, especially in symptomatic subjects

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2015). Tear Film Osmolarity and dry eye symptoms. III Encontro da Mocidade Investigadora EDI-USC. Santiago de Compostela (España).

Introduction: Dry eye disease (DED) is a common condition that causes symptoms of discomfort and visual distortions. Tear film hyperosmolarity is a common feature to all types of dry eye. This study was designed to analyse the correlation between the tear film osmolarity values and common reported symptoms (assessed by McMonnies questionnaire test). Material and methods: A total of 284 patients were included in the study. Patients were volunteers recruited from the Optometry Clinic of the Optometry Faculty (Universidad de Santiago de Compostela, España). McMonnies test was performed first following the standard instructions. McMonnies

test is a dry eye specific questionnaire used to analyse the presence and frequency of Scratchiness, Dryness, Grittiness, Burning and Soreness. An electrical impedance osmometer, TearLab was used to measure osmolarity. Results: The whole sample showed an osmolarity mean value of 309.38 ± 13.93 mOsm/l [Mean \pm SD], and a McMonnies median of 7 (5 – 17) [Median (IQR)]. Higher tear osmolarity values were observed for each dry eye symptom when it is present (t-test for all symptoms $p \leq 0.041$). In addition, there is also a difference in the osmolarity value regarding to frequency (ANOVA $p < 0.014$). Conclusion: Higher tear osmolarity values may be related with dry eye symptoms presence and frequency.

Ramos, L., N. Barreira, A. Mosquera, H. Pena-Verdeal and M. G. Penedo (2014). Automatic classification of tear film rupture areas. Vision Sciences and Eye Research Meeting (ViSER 2014). Santiago de Compostela (España).

INTRODUCTION. The Dry Eye Syndrome is a common disorder of the tear film which affects a significant sector of the population, impacting on the quality of life. The Break-Up Time (BUT) is a clinical test used for the diagnosis of this disease, which computes the time the first tear film break-up appears. Besides the break-up time, there are several break-up features related to specific aspects of the tear film that could affect dry eye symptoms. Therefore, the first break-up appears as a dark area which could increase its size with time presenting different rupture patterns, defined as streaks, dots, or pools. These patterns are related to the BUT measure, the break-up area, and its growing rate, so they are a good indicator of tear film stability and quality, providing information about the dynamic aspects of tear rupture and morphology. **METHODOLOGY.** This work presents a fully automatic methodology for characterizing the break-up areas. The procedure first extracts the eye region where the break-up is analysed throughout the video. Then, the contrast and illumination are normalized in each tear film frame and, then, the break-up areas are segmented using an adaptive thresholding technique. Finally, a shape descriptor containing morphological features such as roundness, eccentricity, and ratio between the major and minor axes, area, convexity, and solidity is built for each segmented break-up area, and then, different classifiers are applied to these descriptors to decide their tear film rupture patterns. **RESULTS.** This methodology has been tested on a random set of 88 frames annotated by the experts, containing 25 dots, 33 pools and 38 streaks rupture patterns. A decision tree classifier obtained the best results, achieving 84.37% accuracy for all rupture patterns, where dot rupture pattern got 92%, pool 82%, and streak 82%. In some cases, very small pools were confused with dots as well as dots quite large were classified as pools. Some poorly defined streaks were classified as pools while streaks too small were mistaken with dots. **CONCLUSION.** Manual break-up characterization is a tedious and subjective task, so its automation provides an objective method to save time for the experts. The classification of the break-up areas allows a quantitative, objective analysis of tear instability, as an extension of BUT measurement, which focuses only on the time. It provides useful additional information to the clinical practice.

Ramos, L., N. Barreira, J. M. Molinelli, H. Pena-Verdeal and M. J. Giraldez (2014). Computerized tool for an automatic break-up assessment. II International Conference on Applications of Optics and Photonics (AOP 2014). Aveiro (Portugal).

The Dry Eye Syndrome is a common disorder of the tear film which affects a significant sector of the population, impacting on the quality of life. The composition and behaviour of the tear film provides crucial indicators, so the tear film assessment is essential for dry eye characterization. The Break-Up Time test (BUT) is a widely used measure to evaluate the quality and stability of the tear film on the ocular surface. Besides the break-up time, there are several break-up features related to specific aspects of the tear film that could affect dry eye symptoms. However, this analysis is affected by low repeatability mainly due to a subjective appreciation of the break-up areas, the differences among the experts, and the variability of the tear film. This work presents a fully automatic tool for break-up assessment in tear film videos. Each tear film video has a duration of several minutes and contains different measurement areas. This methodology has a first stage of video pre-processing which consists on locate the different measurement areas and extract the region of interest within each frame throughout the videos. Then, the main stage is the break-up assessment performed in each measurement area. This evaluation includes the BUT measurement computation as well as a quantitative and qualitative analysis based on location, size, shape, and evolution of the break-up areas. The proposed tool has been tested on a dataset consisting of 18 tear film videos achieving reliable results in the same range as between four different experts.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, M. Miñones, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2014). Osmolality measurement of eye drops with a freezing point depression Osmometer. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14). Braga (Portugal).

Purpose: The purpose of this study was to measure and compare the osmolality for a variety of commercially available eye drops. **Material and Methods:** Ten osmolality measurements were made using freezing point depression technique by Fiske 110 per solution. A volume of 20 µl was used in each measurement. During all de process, the room temperature, illumination and humidity are constants. **Results:** Osmolality range felt into 208 and 337 mOsm/kg, being all of them statistical difference (ANOVA, $p < 0.001$). Bonferroni post hoc shows that the osmolality values were statically different from each other ($p < 0.001$), with the exception of the Moisture drops and the Viscofresh ($p = 0.063$ for this relationship), and Viscofresh and sensitive Eyes ($p = 0.949$). **Conclusions:** This study detailed the osmolality of a group of eye drop, data that are not readily available, and shows that certain properties vary significantly among these products. The physical properties of the may have clinical implications regarding initial in-eye comfort.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, M. Miñones, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2014). Correlation between Osmolarity and common Dry Eye Symptoms. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14). Braga (Portugal).

Introduction: Dry eye disease (DED) is a common condition that causes symptoms of discomfort and visual distortions. Tear film Hyperosmolarity is a common feature to all types of dry eye. This study was designed to analyse the correlation between the tear film osmolarity level and the type of symptoms (assessed by McMonnies questionnaire test). **Material and methods:** A total of 203 patients were included in the study. A McMonnies test was performed previously to any other test following the standard instructions. Mean of one measurements of the electrical impedance osmometer TearLab was used to check de osmolarity. During all de study, room temperature, light and humidity were controlled. **Results:** The whole sample showed an osmolarity mean value of (Mean \pm SD) 307.5 ± 14.96 mOsm/l, and a McMonnies score of (Median \pm IQR) 7.0 ± 7.0 . The most frequent symptom was Dryness (38.9 %) and the least burning (6.9 %). Spearman Rho showed positive correlations between Osmolarity and McMonnies score ($r = 0.360$; $p < 0.001$), scratchiness ($r = 0.212$; $p = 0.002$), dryness ($r = 0.238$; $p < 0.001$), grittiness ($r = 0.172$; $p = 0.014$), and soreness ($r = 0.155$; $p = 0.027$). In contrast, osmolarity and burning did not showed statistical correlation ($r = 0.133$; $p = 0.059$). **Conclusion:** High values of osmolarity are related with symptoms, mainly with dryness and scratchiness. With the exception of Soreness.

Ramos, L., N. Barrera, A. Mosquera, H. Pena-Verdeal and M. J. Giraldez (2014). Computerized tool for evaluating tear film break-up dynamics. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14). Braga (Portugal).

Normal tear film dynamics require adequate production of tears, retention on the ocular surface, and balanced elimination. Disruption of any of these components can lead to the condition of dry eye syndrome, a common disorder which affects a remarkable percentage of population. The Break-Up Time (BUT) is a clinical test used for the diagnosis of this disease. However, BUT test only examines the appearance of the first break-up in the tear film, but this dark area could emerge as a small point or as a wide region and it could increase with time. This information is omitted in the BUT test, but could be relevant for tear film assessment. Manual break-up characterization is a tedious and subjective task, so its automation would provide an objective method to save time for the experts. Therefore, this work presents a fully automatic tool for evaluating tear film dynamics over the exposed corneal surface from the emergence of the first break-up in the tear film until the later blink. The procedure first extracts the eye region where the break-up evolution is analysed throughout the video. Then, the contrast and illumination are normalized in each tear film frame and, then, the break-up areas are segmented using an adaptive thresholding technique. Finally, the tear film evolution is analysed by computing the break-up time and characterizing the break-up areas in terms of size and growing rate. The assessment of the break-up dynamics allows a quantitative, objective analysis of tear instability, as an extension of BUT measurement, which focuses only on the time. It provides useful additional information to the clinical practice.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, N. Barreira, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2014). Assessment of lower tear meniscus height by ImageJ software. 11th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV14).

Purpose: Lower tear meniscus height (TMH) measurement is an objective parameter related with the quantity of the tear film. Different methods and techniques have been reported to measure TMH. The aim of this study is to compare the TMH between left and right eye in two different techniques (slit lamp without fluorescein, and Tearscope Plus) by using open source software. **Methods:** 40 subjects were included in the study. The lower tear meniscus was videotaped by a digital camera attached to a slit lamp, first in the right eye, and five minutes later (to avoid any kind of influence), in the left eye. Both eyes were examined under slit lamp illumination and thought the Tearscope device in the central portion. After the study, a masked observer extracts

an image from each video and measures the TMH absolute and reflex in each method by using open source software of measurement based on Java (NIH ImageJ). TMH was measured from the lower lid to the upper limit of the tear meniscus (complete) for slit-lamp (TMH-CA) and Tearscope (TMH-Tc), and from lower eyelid to brightest reflex of the meniscus (reflex meniscus) for slit-lamp (TMH-CR) and Tearscope (TMH-TcR). Results: Pearson Correlation showed a statistical significant relationship between both eyes for TMH-CA ($r = 0.632$; $p < 0.001$), TMH-CR ($r = 0.583$; $p < 0.001$), TMH-Tc ($r = 0.739$; $p < 0.001$) and TMH-TcR ($r = 0.745$; $p < 0.001$). Paired t-test was performed for the differences between each eye and none showed statistical differences (all parameters $p \geq 0.162$). Conclusion: This study showed that for all meniscus parameters there is no difference between both eyes. Also, ImageJ reveal as useful tool to objectively measure TMH by photography, being a useful tool for eye care professionals in order to maintain the same TMH criteria for follow-up visits.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, M. Miñones, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2014). Medida de la osmolalidad en un grupo de soluciones salinas y multipropósito. 23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM2014). Madrid. (España).

Antecedentes y objetivos: Las soluciones de mantenimiento afectan al uso de lentes de contacto, ya que éstas, previo al uso, son desinfectadas, y guardadas en ellas. La osmolalidad de estas soluciones puede afectar a la comodidad del porte, donde una solución hiperosmótica desecaría la película lagrimal. El objetivo de este trabajo es obtener la osmolalidad de una serie de soluciones de mantenimiento para lentes de contacto dada su importancia en el confort y salud ocular. Material y métodos: Se determinó la osmolalidad de 13 soluciones de lentes de contacto: 4 soluciones Salinas (Softwear Saline®, Polyrinse®, Avizor Saline® y Solución Fisiológica Cinfa®) y 9 Soluciones multipropósito (SoloCare Aqua®, Opti-Free Express®, All Clean®, ReNu Multiplus®, ReNu Sensitive Eyes MPS®, Biotrue®, Complete RevitalLens®, GP Multi Avizor® y Boston Solución Única®). Para ello se utilizó un osmómetro de descenso de punto de congelación (Fiske 110®) con el que se realizaron 10 medidas por solución, utilizando un volumen de 20 μ l en cada una. Durante todo el proceso la temperatura (20-23°) y la humedad (50%-60%) fueron controladas. Resultados: Las soluciones Salinas mostraron un rango de valores entre 289,1 y 308,5 mOsm/kg siendo estadísticamente diferentes entre sí (ANOVA, $p < 0,001$). El test post hoc Tukey reveló que las tres soluciones se diferenciaban entre sí, siendo la solución fisiológica Cinfa® la que presentaba mayor osmolalidad (p en todos los casos $< 0,001$). En el caso de las soluciones multipropósito los valores oscilaron entre 222 y 316,9 mOsm/kg, siendo estadísticamente diferentes (ANOVA, $p < 0,001$). El test post hoc Tukey mostró que las solución Solo Care Aqua® y Boston única® presentaban la mayor osmolalidad ($p < 0,001$ frente al resto). Curiosamente, las 3 soluciones de Baush and Lomb® fueron estadísticamente similares (p mínimo = 0,36). Conclusiones: este trabajo detalla gran cantidad de valores de osmolalidad de soluciones comúnmente utilizadas en el cuidado de las lentes de contacto y que habitualmente no está disponible por el fabricante. Esta clase de datos son relevantes en la clínica debida a su influencia sobre el confort ocular, ya que tanto soluciones salinas como multipropósito entran en contacto directo con la película lagrimal, y pueden alterar la estabilidad de la misma.

Pena-Verdeal, H., J. Donis, C. Garcia-Resua, E. Yebra-Pimentel and M. J. Giraldez (2014). Variación diurna en la calidad de la película lagrimal de sujetos control mediante el tiempo de ruptura lagrimal. 23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM2014). Madrid. (España).

Antecedentes y objetivos: El propósito de este estudio es investigar las variaciones diurnas en la calidad de la película lagrimal en un grupo de sujetos controles mediante el test de tiempo de ruptura lagrimal (Break-up time; BUT). Material y métodos: Un total de 26 sujetos sanos entre 19 y 30 años fueron incluidos en el estudio tras dar negativo en el cuestionario estandarizado "Ocular Surface Disease Index" (OSDI) y el test de secreción lagrimal Schirmer. Para la medición del BUT se instiló 2 μ l de fluoresceína mediante una micropipeta de precisión para evitar la influencia de la fluoresceína en las medidas. El sistema de iluminación de la lámpara de hendidura se utilizó con un filtro azul cobalto junto con un filtro amarillo Wratten 12. El BUT fue grabado en cuatro sesiones a intervalos regulares de 3 horas a lo largo del día (9:30, 12:30, 15:30 y 18:30 horas), con tres medidas en cada sesión (12 videos por paciente). Posteriormente el cálculo del BUT fue analizado visualizando las grabaciones digitales por un observador experto. Para aumentar la precisión de la medida, el tiempo de los vídeos de ruptura lagrimal se cuantificaba mediante los frames de los vídeos digitales y luego se transformaron a segundos (1 segundo = 15 frames). El estudio del BUT se realizó principalmente considerando el promedio de las tres medidas de cada paciente, aunque debido a la influencia de sucesivas las lecturas que pueden influir en la secreción refleja lagrimal, también se realizó el estudio considerando el promedio de las dos medidas más cercanas. Finalmente también se analizaron los resultados teniendo en cuenta sólo la primera lectura, tal como normalmente se realiza en clínica. Resultados: No se observaron variaciones diurnas en el BUT cuando se usaba la media de las tres medidas (test Wilcoxon, $p > 0,19$ en todos los momentos del día) o las dos más parecidas de cada sesión (test Wilcoxon, $p > 0,39$ en todas las medidas). Por el contrario, cuando solo se tomaba como

referencia el primer BUT grabado en cada sesión, este aumentaba al final del día, 18:30 horas (test Wilcoxon, $p < 0,001$). Conclusiones: Los resultados en la medida del BUT parecen no estar influenciados por la hora del día. Sin embargo, esto no se cumple cuando solo el primer BUT es tomado como referencia, lo que hay que tener en cuenta en clínica ya que es como normalmente se realiza.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2014). *Relación entre osmolaridad y menisco lagrimal. Influencia de la edad. Oral, coautor. 23 Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica (OPTOM2014). Madrid (España).*

Antecedentes y objetivos: El menisco lagrimal representa aproximadamente el 75–90% del volumen lágrima total, por lo tanto es un buen indicador de la cantidad/volumen lagrimal. Aunque existen varios parámetros para definirlo, normalmente se valora mediante la altura del menisco lagrimal (TMH). Por otra parte, la osmolaridad de la película lagrimal es un parámetro actualmente muy considerado la investigación/ clínica de ojo seco. Un descenso en la cantidad acuosa de lágrima provoca un incremento en la osmolaridad, por lo que un descenso en el menisco lagrimal debería provocar un aumento de la osmolaridad lagrimal. El objetivo de este estudio es el análisis de la relación entre TMH y la osmolaridad lagrimal mediante el uso de un osmómetro de impedancia eléctrica específico de lágrima (TearLab). Material y métodos: Este estudio fue realizado sobre un total de 177 sujetos (78 hombres y 99 mujeres). La osmolaridad lagrimal fue medida mediante el osmómetro de impedancia eléctrica TearLab, con el que se recogió 0,05 μ l de lágrima. El menisco lagrimal inferior fue grabado en la porción central digitalmente mediante una cámara conectada a la lámpara de hendidura y sin instilación de fluoresceína. Posteriormente, un observador “enmascarado” extrajo una imagen de cada uno de los videos y midió la altura del menisco lagrimal mediante el uso de un software (NIH ImageJ). También se valoró subjetivamente las imágenes del menisco lagrimal (siguiendo 4 grados de gravedad), donde se tenía en cuenta la irregularidad y la presencia de detritus, entre otros. A lo largo de todo el estudio, humedad, iluminación y temperatura fueron mantenidos constantes. Resultados: En todos los casos la osmolaridad mostró una correlación estadísticamente significativa con la altura del menisco: débil para el grupo joven (< 20 años $r = -0,28$, $p = 0,01$) y moderada para los grupos mayores (entre 20 y 45 años $r = -0,40$, $p = 0,001$, y > 45 años, $r = -0,52$, $p = 0,014$). La correlación entre grado subjetivo del menisco y osmolaridad fue de débil a sustancia dependiendo del rango de edad (desde $r = 0,27$ para ≤ 20 años hasta $r = 0,63$ para ≥ 45 años, en todos los caso, $p < 0,012$).

Ramos, L., N. Barreira, A. Mosquera, H. Pena-Verdeal and M. J. Giraldez (2013). *Computerized tool for video analysis in a tear film break-up test framework. VII Iberoamerican Conference on Optics - XI Latinamerican meeting on Optics, Lasers and Applications (RIAO-OPTILAS 2013). Porto (Portugal).*

The Dry Eye Syndrome is a common disorder of the tear film which affects a wide sector of the population and results in symptoms of discomfort, visual disturbance, and tear film instability. The diagnosis of this condition is extremely difficult due to its multifactorial ethology and the variability of the clinical tests. The study of the tear film stability is essential for the dry eye characterization. The Break-Up Time test (BUT) is a widely used measure in clinical practice to assess the quality and stability of the tear film on the ocular surface. Besides the break-up time, there are several break-up features related to specific aspects of the tear film that could affect dry eye symptoms. The automation of the tear film break-up analysis is almost an unexplored field. In this work, we present a fully automatic tool focused on obtaining the BUT measure as well as an analysis of the location, size and shape of the break-up areas. This methodology first locates the different measurement areas from a video, then extracts the region of interest and finally performs the BUT test and analyses the break-up features in each measurement area. Therefore, for each measurement area, our approach performs the timing of the break-up and a local characterization of the rupture areas, which provides useful additional information related with the tear film quality.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, J. Donis, L. Ramos, E. Yebra-Pimentel and M. J. Giraldez (2013). *Inter-observer variation on BUT evaluation. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal).*

Introduction: The tear film break-up time (BUT) test measures tear film stability, being one of the most used in clinical settings. However, the significance and interpretation of BUT have not yet been clearly defined. This study was designed to evaluate BUT by video analysis and assess inter-observer variation in the same subjects, in order to clarify BUT interpretation. Methods: a total of 312 videos of BUT were recorded at same times during two month from a group of healthy subjects by a camera attached to the slit lamp and the recording stored on a computer. 2 μ l volume of non-preserved 2% sodium fluorescein was instilled by a micropipette. The subject was seated behind the slit-lamp biomicroscope set at 16x magnification using a cobalt blue filter and a Wratten 12 yellow filter to enhance tear film visibility. To check the repeatability and interpretation of this technique, BUT was then determined in the digital recordings by three observers by counting the video frames

(15 frames = 1 second). Throughout the study, laboratory conditions of temperature, light and humidity were kept constant. Results: Good intraclass correlation coefficient correlation was observed among the observers when value de whole BUT video (ICC = 0.81, $p < 0.001$). Thus, the BUTs quantified by Observer 1 differed from those of the other two observers, whereas Observer 2 and Observer 3 showed good agreement. When only considered mean BUTs less than or equal to 15 seconds, inter-observer repeatability showed better performance. Conclusions: Our results reveal a need to clarify the BUT end-point and establish clear instructions to improve observer repeatability. Also, since better repeatability was observed for lower BUT values, restricting the measurements accepted to 15-20 seconds is a point worth *considering* in future studies.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Miñones, J. Gilino, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2013). Intersession repeatability of two osmometers. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal).

Introduction: High tear fluid osmolarity is a feature common to all types of dry eye. This study was designed to establish the intersession repeatability of two osmometers, a freezing point depression osmometer (Fiske 110) and an electrical impedance osmometer (TearLab™) on tear film samples. Methods: Intersession repeatability was determined in two sessions one week apart in three groups of 50 healthy subjects. In each group, measurements were made using both instruments. Tear film samples were collected from the lower meniscus of the subjects. Fiske 110 is designed to be used in samples of 20 μ l. Since it is difficult to obtain this volume of tears, samples need to be diluted in purified water, so measurements were made on 1:9, 1:4, dilutions by collecting, 2 μ l and 4 μ l respectively. Tear Lab is addressed to be used in tear film and only a sample of 0.05 μ l is required, so no dilutions were employed. For the intersession repeatability analysis, we used Bland and Altman procedure. Results: No significant differences were detected between the measurements obtained in the two sessions using each osmometer (paired t-test; TearLab $p = 0.14$; Fiske 110 (4 μ l) $p = 0.77$, Fiske 110 (2 μ l) $p = 0.054$), although 95% confidences interval were relatively wide (Tear Lab from -23.00 to 28.78; Fiske 110 (4 μ l) from -37.64 to 35.94; Fiske 110 (2 μ l) from -48.43 to 66.97). Conclusions: both osmometers showed a high bias range. In case of Fiske 110 only is acceptable the procedure with 4 μ l of tear sample.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Lira, B. Remeseiro, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2013). Relationship between Interferencial Lipid Layer Patterns and Tear Break-Up Time. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal).

Introduction: The lipid layer of the tear film plays a major role in limiting evaporation during the inter-blink period and also affects tear film stability. Tear film quality and lipid layer thickness can be assessed by non-invasively imaging the superficial lipid layer by interferometry obtaining a lipid layer pattern (LLP). Tear Break-up time (BUT) test is one of the commonest dry eye tests used for asses the tear film quality. The purpose of this study is to assess the relationship between BUT and LLP by using video and photographic analysis. Methods: 84 healthy subjects aged 19 to 30 years were enrolled in the study. LLP layer pattern was assessed by Tearscope-Plus attached to a slit-lamp. Interference images of the lipid layer were captured by a Topcon DV-3 digital camera and stored via Topcon IMAGENet i-base. Then, one experienced observer categorized LLP based on Guillon's scheme; Open meshwork (OM), closed meshwork (CM), Wave (W), amorphous (AM) and Color fringe (CO). Furthermore, it was noted whether LLPs were homogeneous or heterogeneous. In order to perform BUT evaluation, 2 μ l volume of 2% sodium fluorescein was instilled using a micropipette. The subject was seated behind a slit-lamp biomicroscope using a cobalt blue filter and a Wratten 12 yellow filter to enhance tear film visibility. Then, the tear film was recorded by a camera attached to the slit lamp and the recording stored on a computer. BUT was determined in the digital recordings by counting the video frames (15 frames = 1 second). Results: There was not found any differences between the BUT values obtained by the subjects with different LLP ($p = 0.74$). Although not statistically significant, there was a tendency of Thicker LLPs to present higher BUTs than thinner LLPs. When divided the sample by homogeneity of LLP, there was found that subjects with homogeneous LLPs showed higher BUTs values than those with a heterogeneous LLP ($p=0.004$). Conclusions: These results show that the morphology of the LLP does not show a direct relationship with BUT test, although the grade of homogeneity of the LLP affect BUT value.

Garcia-Resua, C., H. Pena-Verdeal, M. Lira, M. E. Real Oliveira, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2013). Assessment of lateral lower Tear meniscus height by image analysis software. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal).

Introduction: Different values of the lower tear meniscus height (TMH) can be obtained depending on the method and technique of measurement employed. This study is aimed to study the lateral meniscus parameters as nasal and temporal TMH, in order to check objective regularity of the meniscus. Two methods of measuring the meniscus were used, from lower eyelid to the top of the meniscus (absolute TMH), and to the brightest meniscus

reflex (reflex TMH) by using an open source software of measurement in Java. Methods: 121 young healthy subjects from an initial group of 135 were included in the study, following three cut-off criteria: McMonnies, OSDI and Phenol Red. The lower tear meniscus was videotaped by a digital camera attached to a slit lamp. Three videos were recorded in three different portions of the tear meniscus: central, nasal and temporal. After the study, a masked observer extracts an image from each video, and measures the TMH by using an open source software of measurement based on Java (NIH ImageJ). Absolute nasal (TMH-NA), absolute temporal (TMH-TA) and absolute central (TMH-CA) were compared each other as well as reflex nasal (TMH-NR), reflex temporal (TMH-TR) and reflex central (TMH-CR). Throughout the study, laboratory conditions of temperature, light and humidity were kept constant. Results: Mean \pm SD values of TMH-CA, TMH-CR, TMH-NA, TMH-NR, TMH-TA and TMH-TR of 0.209 ± 0.049 , 0.139 ± 0.031 , 0.209 ± 0.044 , 0.150 ± 0.033 , 0.230 ± 0.043 and 0.155 ± 0.031 mm, respectively were found. For absolute meniscus, It was found a significant difference between nasal and temporal meniscus (TMH-TA–TMH-NA, $p<0.001$) and between central and temporal meniscus (TMH-CA – TMH-TA, $p<0.001$). In contrast, nasal meniscus was not different from central (TMH-CA – TMH-NA, $p=0.904$). For reflex meniscus, nasal and temporal meniscus did not show significant differences (TMH-TR – TMH-NR, $p=0.07$). In contrast, central and nasal meniscus did not show statistical differences (TMH-CR – TMH-NA, $p<0.001$) as well as for central and temporal meniscus (TMH-CR – TMH-TA, $p<0.001$). Conclusion: Interpretation of the meniscus is subjected to the method employed. Reflex meniscus show better homogeneity between nasal and temporal than absolute meniscus in healthy subjects. In all cases nasal meniscus is higher than central meniscus.

Ramos, L., N. Barreira, A. Mosquera, H. Pena-Verdeal and M. J. Giraldez (2013). Computer Aided Diagnosis system for the evaluation of the tear film Break-Up Test and the characterization of the rupture areas. 10th Conference of Optometry and Vision Science (CIOCV13). Braga (Portugal).

The Dry Eye Syndrome is a tear film disorder which affects a wide sector of the population, especially among contact lens users. This disease alters some visual functions such as contrast perception and eye acuity, resulting in symptoms of discomfort and visual disturbance. The diagnosis of this condition is extremely difficult due to its multifactorial etiology and the variability of the clinical tests. The study of the tear film stability is essential for the dry eye characterization. The Break-Up Time (BUT) test has been widely used in clinical practice to assess the quality and stability of the tear film on the ocular surface. Besides the break-up time, there are several break-up features related to specific aspects of the tear film that could affect dry eye symptoms. Thus, the central cornea is much more sensitive than the periphery, so this area is especially vulnerable to tear disruptions. Moreover, the break-up area can have different size and shape, related with dynamic aspects of tear rupture and its growing rate. In the literature, there is no automatic techniques for computing the BUT test and analyzing the rupture zone features. Therefore, in this work, we present a fully automatic tool for evaluating tear film videos and comparing the different measurement areas to detect weakened zones of the cornea. This evaluation includes the BUT computation and a quantitative and qualitative analysis based on location, size and shape of the rupture areas.

Remeseiro, B., L. Ramos, N. Barreira, M. G. Penedo and H. Pena-Verdeal (2013). Evaluación automática del síndrome de ojo seco. II Reunión de la Sociedad Gallega de Optometría Clínica. Santiago de Compostela, (España).

El síndrome de ojo seco es una enfermedad que afecta a un amplio rango de la población y tiene un impacto negativo en su rutina diaria. Su diagnóstico es muy difícil de llevar a cabo debido a su naturaleza multifactorial. En la actualidad existen varias pruebas clínicas entre las que cabe destacar: el análisis de la capa lipídica de la película lagrimal mediante los patrones interferenciales definidos por Guillon; y el test de tiempo de ruptura (BUT, del inglés Break-Up time), que consiste en medir el tiempo durante el cual la lágrima permanece estable entre dos parpadeos. Ambas pruebas requieren conocimientos especializados y consumen mucho tiempo del especialista. En este trabajo se propone el uso de técnicas de procesamiento de imagen y aprendizaje máquina para automatizar ambas pruebas y eliminar su subjetividad. Para la primera prueba, se ha diseñado un sistema de clasificación automática de los patrones interferenciales, observados mediante el Tearscope plus, en una de las categorías definidas por Guillon: se obtiene una fotografía del ojo, se localiza su zona de interés, se extrae la información de color y textura, y finalmente se clasifica en una de las categorías preestablecidas. Para la segunda prueba, se ha diseñado un sistema de procesamiento de vídeo que permite detectar los parpadeos del paciente y delimitar así las zonas de medida. En dichas zonas, se analiza la evolución de la lágrima utilizando información de color, permitiendo así determinar el instante en el que se produce la ruptura.

Pena-Verdeal, H., C. Garcia-Resua, M. J. Giraldez and E. Yebra-Pimentel (2012). Diurnal variations in tear film quality in healthy subjects evaluated by break-up time. I Encontro da Mocidade Investigadora EDI-USC. Santiago de Compostela (Espana).

Purpose. This study was designed to assess diurnal variations in tear film quality reflected by break-up time (BUT). Correlations with gender and ocular symptoms were also examined. Also, interobserver influence in the evaluation was assessed. **Methods.** 26 healthy subjects aged 19 to 30 years were enrolled after completing the Ocular Surface Questionnaire (OSDI) and Schirmer tests. BUT and the maximum blink interval MB were measured in four sessions at regular 3-hour intervals over a day (9.30 am to 6.30 pm) and tests were video-recorded (three videos per variable). BUT and MBI were then measured in the digital recordings by a masked observer. Finally, two further observers determined BUTs in the videos to check the repeatability of this technique and BUT interpretation. **Results.** No diurnal variation in BUT was observed when we used the 3 video measurements or the 2 closest values independently of gender or OSDI score. However, when only the first BUT was considered, higher break-up times were recorded at 6.30 pm than the remaining times, especially in women. Significant correlation was detected between BUT and MBI. Inter-observer variation improved when BUT was no longer than 15 seconds. **Conclusions.** Tear film BUT does not appear to be influenced by the time of day, unless only one BUT test is performed, as is common in clinical practice. The last BUT measurement (6.30 pm) was higher than the remaining measures. Limiting acceptable BUT measurements to 15-20 seconds could improve inter/intra-observer variation.

