

PELICULA LACRIMAL BIOQUIMICA Y FISIOLOGIA

JORGE RAMIRO BARRERO S. *

INTRODUCCION

La presente revisión bibliográfica acerca de la Bioquímica y Fisiología de la Película Lacrimal pretende presentar brevemente, detalles de su composición, particularidades físico-químicas, comportamiento fisiológico y pruebas de diagnóstico en estados de insuficiencia-lacrimal. Finalmente, se incluye la revisión de algunos métodos de laboratorio para el análisis bioquímico.

No procura el autor considerar en extenso cada uno de los temas expuestos; constituye solamente la revisión bibliográfica previa a un futuro trabajo de "Composición Química de Lágrimas en individuos normales y en Enfermedades degenerativas de Conjuntiva".

Adelantar así sea un mínimo trabajo de investigación en un medio como el nuestro resulta tarea difícil, ya por el escaso material de consulta disponible, ya por la extrema limitación de recursos económicos, además de la escasa preparación en metodología de la investigación. Hasta tanto estas condiciones persistan, nuestros trabajos continuarán resultando simplemente revisiones de tema, de casuística, o en el

mejor de los casos, revisiones bibliográficas medianamente actualizadas. Su calidad dependerá, en fin, de la propia iniciativa e interés. El autor confía, eso sí, que la actual revisión resulte de utilidad para alguien más que sí mismo.

Mi reconocimiento especial para Doña Isabel de Guzmán, encargada de la biblioteca del Hospital San Juan de Dios, sin cuya colaboración ésta revisión no podría haberse adelantado. Su ayuda en el pedido de la literatura consultada fué particularmente valiosa.

Mi gratitud para la señora Clara Inés de Alfonso, secretaria de la Sección de Oftalmología del Hospital San Juan de Dios, cuya paciencia y colaboración en la mecanografía de ésta revisión merecen mi especial consideración.

FISIOLOGIA DE LA PELICULA LACRIMAL

GENERALIDADES

La película lacrimal es una estructura fundamentalmente líquida que cubre la córnea y la conjuntiva ocular, cuya función primaria es proporcionar una superficie óptica perfecta en la interfase aire-ojo, regularizando la superficie corneal anterior para la adecuada refracción de los rayos de luz. Además

* Estudiante de Postgrado-2. Sección de Oftalmología. Departamento de Cirugía.

de lo anterior, la película lacrimal sirve como un vehículo para remover las células descamadas y los restos diversos de la superficie ocular expuesta, y proporciona el oxígeno necesario para el metabolismo del epitelio y estroma corneal. Las lágrimas también contienen sustancias antimicrobianas, lubrican la interfase córneo-palpebral y mantienen la humedad de la superficie ocular anterior. Finalmente, la película lacrimal sirve como ruta de acceso de leucocitos en los estados reparativos de heridas corneales centrales.

La película lacrimal humana tiene tres zonas bien definidas: la banda marginal, la película que cubre las superficies conjuntivales palpebral y tarsal, y la película que cubre la córnea. La banda marginal yace posterior a la banda lipídica del margen palpebral inferior y forma el menisco lacrimal que confluye con la película preocular que cubre las superficies corneal y conjuntival. Esta banda marginal lleva los constituyentes de secreción lacrimal presentes en toda otra localización y los desechos con destino a los puntos lacrimales.

Se considera a la película lacrimal como una estructura trilaminar compuesta de una capa anterior lipídica, una capa media acuosa (la de mayor espesor) y una capa posterior mucoproteica.

Únicamente en los últimos decenios se ha estudiado en profundidad la composición química de las lágrimas, pero ya de tiempo atrás se indicaban algunas de sus características. Así, ya desde 1797 Fourcroy y Mons mencionaron algunos de sus constituyentes. Para fines del siglo XIX se evidenciaron progresos en el estudio químico.

En este siglo han sido identificados numerosos compuestos, para citar algunos: albúminas y proteínas (1930-49), estudios electroforéticos de fracciona-

miento proteico (1979) y con inmunoelectroforesis (1969-77), prealbúmina (1969), glucosa y cloro, úrea, sodio, potasio (1950-54), calcio (1972), magnesio (1977), fósforo inorgánico (1960), colesterol (1975-76-78), lactato y piruvato (1977), catecolaminas (1977) y prostaglandinas (1979). Estudios más avanzados han indicado la concentración hidrogeniónica, osmolaridad (1945); se han determinado enzimas e incluso la lisozima (1968-76-79); se ha identificado la actividad antiproteásica, el factor bactericida no lisosomal (1976) y la lactoferina (1974). De igual manera, se han determinado niveles de complemento e inmunoglobulinas A y G (1976-75).

SECRECIÓN LACRIMAL

El sistema secretor lacrimal, al menos teóricamente, tiene dos componentes: secreción básica y secreción refleja. No se conoce estímulo para la secreción básica o innervación específica para las glándulas lacrimales accesorias básicas, que son las de Krause y de Wolfring.

Las glándulas de Krause comprenden dos tercios de las glándulas accesorias y se localizan en la parte lateral del Fórnix superior proximal a la glándula principal. Un número variable de glándulas de Krause se encuentran en el fórnix inferior. Las glándulas de Wolfring se localizan a lo largo del margen orbital de cada tarso.

La secreción refleja es producto de la glándula principal, dividida en dos partes anatómicas por la aponeurosis del elevador del párpado (porciones orbitaria y palpebral). La secreción refleja es estimulada por neuronas eferentes simpáticas y parasimpáticas. Las fibras nerviosas simpáticas en la glándula principal terminan en los vasos sanguíneos y son vasomotoras, mientras que las fibras parasimpáticas terminan alre-

dedor de los conductos glandulares. las fibras aferentes periféricas del nervio trigémino, originadas en conjuntiva, córnea, mucosa nasal y márgenes de los párpados, inducen al lagrimeo en respuesta a irritación física. Las fibras centrales aferentes, originadas en el lóbulo frontal, ganglios basales, hipotálamo y tálamo, estimulan el núcleo lacrimal localizado en el puente y causan el llanto psicógeno. La luz brillante induce al lagrimeo, pero esta vía aferente retinal no ha sido determinada.

Bajo anestesia general, cuando los estímulos supranucleares y táctiles se suprimen, el flujo basal de lágrimas es mínimo, según algunos estudios de 0 mm. (Schirmer) en 11/17 pacientes y de 2-8 mm. en 6/17 (Iwata et al, 1969).

El movimiento de los párpados es importante para la renovación y distribución de las lágrimas. Cuando los párpados se cierran completamente, los fórnices superior e inferior son comprimidos por la fuerza de los músculos preseptales, y los párpados se mueven uno hacia otro, con el mayor desplazamiento a expensas del párpado superior y ejerciendo presión sobre el globo.

Esta fuerza limpia la superficie anterior de restos y de mucina insoluble y exprime las glándulas de Meibomio. El párpado inferior se mueve horizontalmente en dirección nasal y empuja el fluido lacrimal y los restos hacia los puntos superior e inferior. Cuando los párpados se abren, la película se redistribuye en dos procesos: inicialmente, el párpado superior tira de la fase acuosa de la película por acción capilar, secundariamente, la capa lipídica se extiende lentamente y hacia arriba sobre la fase acuosa. Esto arrastra lágrimas adicionales, aumenta el espesor y estabiliza la película lacrimal.

BIOQUIMICA DE LAS LAGRIMAS

El espesor promedio de la película lacrimal precorneal es de 6.5-7.5 microm., siendo la fase acuosa su principal constituyente en volumen. El volumen lacrimal es variable con la edad, disminuyendo con ella, y mayor en el ojo sin anestesia local ni general.

Fase Lipídica.

La capa anterior de la película lacrimal tiene un espesor de 0.1-0.2 microm.; y contiene lípidos polares y no polares dispuestos de manera tal que se conforman en conjunto de cerca de 100 moléculas en grosor. Estos lípidos son secretados especialmente por las glándulas de Meibomio, estructuras localizadas en la lámina tarsal de los párpados superior (30-40) e inferior (20-30). De tipo multilobulado, se encuentran rodeadas por terminaciones nerviosas cuyo neuro transmisor es acetilcolina. Cada glándula tiene un orificio que se abre en el margen palpebral entre la línea gris tarsal y la unión mucocutánea.

Otros lípidos de esta capa provienen de las glándulas sebáceas de Zeis, localizadas en el margen palpebral del tarso y las glándulas apocrinas de Moll, localizadas en las raíces de cada pestaña.

Las funciones básicas de la capa lipídica son: Contribuir a las propiedades ópticas de la película lacrimal, mantener una barrera hidrofóbica (franja lipídica) que impide el flujo lacrimal excesivo, retardar la evaporación y proporcionar la lubricación de la interfase óculo-palpebral.

El individuo normal posee una composición lacrimal cualitativamente muy estable, aunque cuantitativamente se encuentran leves variaciones fisiológicas.

La cromatografía gas-líquido muestra que la secreción "normal" de las glándulas de Meibomio comprende: ésteres de cera (35%), ésteres de colesterol (29.5%), fosfolípidos (16%), triglicéridos (4%), ácidos grasos libres (2%) y esteroides libres (1.8%). La longitud de las cadenas de ácidos grasos varía de 8 a 32 carbonos, predominando las del tipo saturado. La fusión de estas grasas se logra a 35°C., propiedad debida a los ácidos grasos del tipo insaturado y que permite la extensión de las secreciones de las glándulas de Meibomio sobre la fase acuosa de la película lacrimal. La remoción de la capa lipídica aumenta la velocidad de evaporación cuatro veces.

Fase Acuosa.

La película lacrimal está formada principalmente por agua (más del 98%), siendo el restante contenido de tipo sólido. Si se analizan los sólidos después de evaporar las lágrimas, se encuentran un peso promedio de 18.7 mg/ml., de los cuales 7.0 mg/ml. corresponden a proteínas.

La fase acuosa es producida por las glándulas lacrimales principal y accesorias. Su viscosidad es baja e incluye todos los elementos hidrosolubles de las lágrimas: sales inorgánicas, glucosa, úrea, elementos varios en trazas, enzimas, proteínas y glicoproteínas.

Los principales electrolitos de la película lacrimal son el Na⁺, cuya concentración semeja la sérica; el K⁺, cuya concentración es entre 5 y 7 veces superior a la sérica; Ca⁺², Mg⁺², Cl⁻ y HCO₂⁻. En general, podría indicarse que Na⁺, K⁺ y Cl⁻ regulan el flujo osmótico entre córnea y película lacrimal. El Bicarbonato regula el pH lacrimal (6.5 a 7.6) y otros electrolitos (Mg⁺², Ca⁺², PO⁻³) son coenzimas.

Otras sustancias disueltas en la película lacrimal son la úrea, glucosa, lactato, citrato, ascorbato y aminoácidos. Todas estas sustancias entran en las lágrimas procedentes de la circulación sistémica, y sus concentraciones varían en general, proporcionalmente con los niveles séricos.

Desde los trabajos de Ridley (29), muchos autores han intentado correlacionar cuantitativamente el nivel de glucosa en las lágrimas con aquel en sangre en los diabéticos. Generalmente se reconoce que las cifras de glucosa en ayunas en lágrimas varían entre 3.6 y 4.1 mg% tanto en sujetos normales como en diabéticos, y que existen marcadas diferencias en las cifras luego de una carga oral de glucosa. Sin embargo, Sharma y otros en la India (33) han indicado en un juicioso estudio que los niveles de glucosa en lágrimas son buen reflejo de la glicemia sérica y que el diagnóstico de "diabetes química" (si se aceptare el término) y de la diabetes con fácilmente con el simple estimativo de la glucosa en lágrimas.

Los niveles de glucosa en lágrimas pueden estar aumentados en otras condiciones, Tapasztó y otros (35) reportan que estas cifras se incrementan 2 o 3 veces sobre el valor normal en enfermedades oculares inflamatorias diversas. Estudios posteriores han confirmado que los niveles de glucosa en lágrimas muestran un aumento durante y luego de procesos inflamatorios en conjuntiva y córnea, con un descenso significativo estadísticamente luego del control de la inflamación. Existen notorias variaciones según el microorganismo patógeno responsable.

Las lágrimas contienen proteínas, de las cuales escasamente el 1% provienen del suero a través de filtración. Las restantes 99% de las proteínas lacrimales son producidas localmente por las glándulas lacrimales (21).

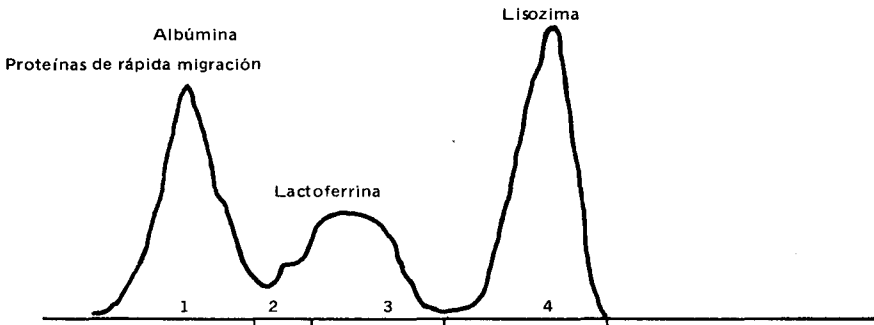


Fig. 1 - Lágrimas normales. Electroforesis en celulosa-acetato (21)

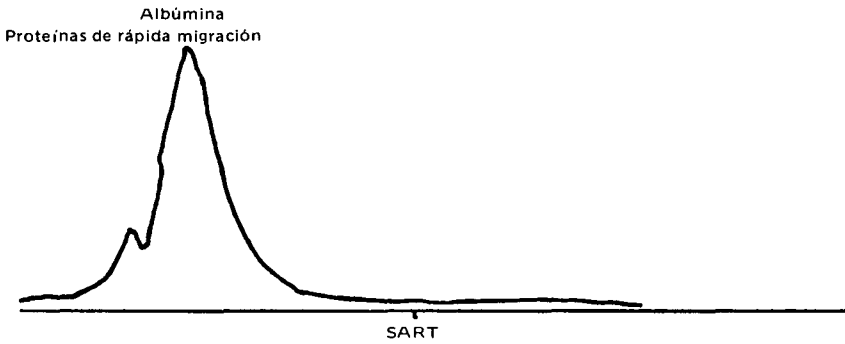


Fig. 2 - Lágrimas anormales. Electroforesis en celulosa - acetato (21)

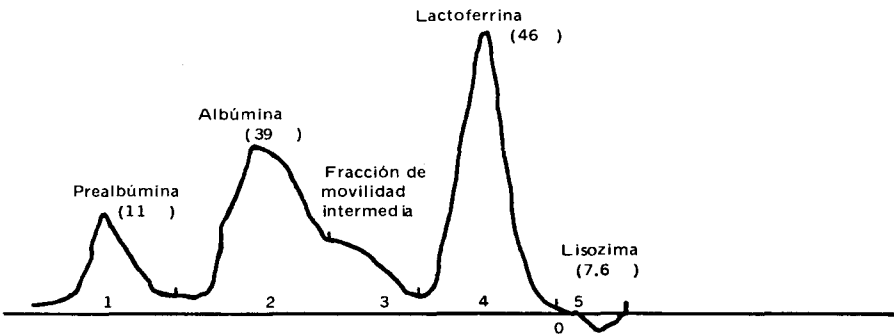
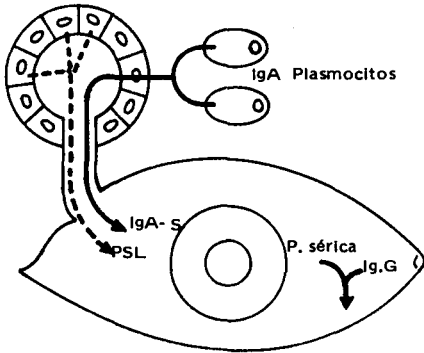
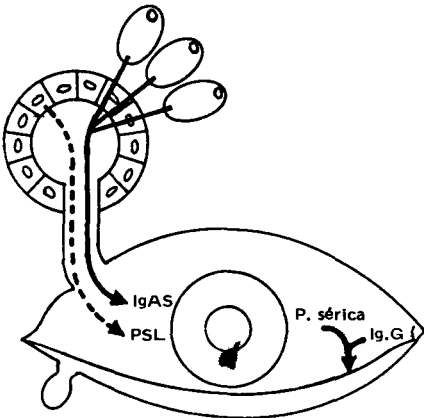


Fig. 3 - Trazado electroforético en acetato de celulosa de lágrimas concentradas cerca de 20 veces (19)

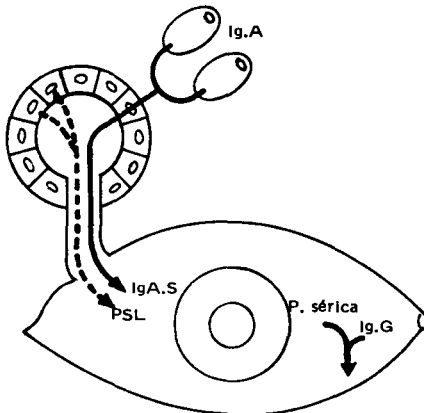
GLANDULA LACRIMAL



Representación diagramática de los sitios de secreción de las proteínas de lágrimas humanas. Sujeto normal. La mayor fuente de Ig.G y de otras proteínas séricas es a través de filtración de los vasos conjuntivales. (17)



Esquema que muestra la inflamación aguda en el caso de Queratoconjuntivitis epidémica. (17)



Esquema que muestra un paciente con síndrome de Sjögren, enfermedad de Mikulicz o tumor de la glándula lacrimal. (17)

Aunque hay un gran número de proteínas asociadas con la película lacrimal, algunas de ellas podrían no ser propias de la misma, sino introducidas como resultado de irritación mecánica o química de la conjuntiva o mucosa nasal, permitiendo su transudado a las lágrimas. Según los trabajos de Stuchell et al (34) se aprecia un significativo aumento en las proteínas lacrimales de origen sérico cuando se utiliza una tira de papel de filtro (Schirmer) para recolectar las lágrimas, comparado con los resultados obtenidos con lágrimas producto de secreción refleja sin irritación local. En contraste, no se hallaron diferencias en los niveles de proteínas de origen lacrimal, lactoferina y lisozima.

Generalmente las lágrimas se analizan mediante electroforesis en celulosa-acetato para determinar su composición proteica. Liotet (20) describió bien en 1982 los patrones normales y anormales de electroforesis de lágrimas en celulosa-acetato. Con este tipo de electroforesis, la migración depende de la carga eléctrica de las proteínas. Normalmente, se encuentran 4 fracciones proteicas con tal técnica, siendo la fracción 1 compuesta de albúmina y de proteínas de rápida migración, la fracción 3 de lactotransferina y estas junto con la fracción 2 (otras proteínas) migran hacia el ánodo, mientras la fracción 4 (lisozima) migra hacia el cátodo.

Con otras técnicas de electroforesis, por ejemplo, mediante la electroforesis en celulosa-poliacrilamida gel, se obtiene una separación más delicada, pues la migración depende de tanto el tamaño molecular como de la carga eléctrica.

De las proteínas producto de filtración sérica las más importantes son la albúmina, que nunca es producto de secreción activa in situ ni de síntesis local y que alcanza una concentración en lágrimas superior a 50 mg/L, y la Ig G,

que en promedio alcanza valores de 3 mg/L y que proviene exclusivamente de filtración sérica, sin ninguna síntesis local.

La importancia actual de establecer esta diferencia en el origen de las proteínas lacrimales reside en que según el estudio de Lundh et al (21) se encuentran anomalías en la composición química del 84% de pacientes usuarios de lentes de contacto de diferentes materiales (blandos y semiduros) y es especialmente llamativa la alta cifra de Ig G hallada en el 18% de ellos, lo que sugiere un estímulo antigénico del lente.

Dentro de las proteínas específicas de las lágrimas es preciso incluir la prealbúmina específica lacrimal (specific tear prealbumin STP), sintetizada exclusivamente por las glándulas lacrimales y que sirve como sistema buffer de la película lacrimal.

La IgA y la IgA-secretoria se encuentran en la película lacrimal. La primera de ellas es formada por plasmocitos en los tejidos intersticiales de las glándulas lacrimales principal y accesorias y en la sustancia propia de la conjuntiva. El componente secretor es producido dentro de los acinos de la glándula lacrimal, siendo la IgA-secretora vertida a la luz de las glándulas lacrimales principal y accesorias. La Ig-A desempeña un papel importante en los mecanismos locales de defensa en la zona externa del ojo, como lo muestran los niveles aumentados de Ig-A e Ig-G en lágrimas asociadas con inflamación ocular. Debe nuevamente indicarse que el origen de la Ig-A es producción local, en contraste con la Ig-G, que proviene de los vasos conjuntivales superficiales.

Las lágrimas contienen otras inmunoglobulinas: IgM, IgD e IgE. Esta última se ha demostrado aumentada en conjuntivitis vernal, tanto lacrimal como

sérica, y localmente, su asociación con niveles elevados de histamina sugiere el concepto de degranulación de masto-

цитos conjuntivales desencadenado por un antígeno Ig-E.

Electrolitos en Lágrimas Humanas (mmol/l) (37)

	Na+	K+	Ca++	Mg++	Cl-	HCO ⁻²
Lágrimas	134-170	26-42	0.5	0.3-0.6	120-135	26
Suero	140	4.5	2.5	0.9	100	30

Minerales en las Lágrimas (19)

Na	(mEq/L)	144.7
K	(mEq/L)	25.0
Cl	(mEq/L)	118.4
Ca	(mg%)	3.2
P	(mg%)	0.5
Mg	(mEq/L)	1.0

Componentes Bioquímicos de las Lágrimas (19).

Glucosa	(mg%)	4.1
Urea	(g/L)	0.37
Proteínas	(mg%)	700
Albumina	(mg%)	66.4
Colesterol	(mg%)	14.4
Transferrina	(mg%)	2.7
Ceruloplasmina	(mg%)	0.5
Lactato	(mg%)	40
Piruvato	(mmol/L)	185
pH		7.21

Los estudios iniciales de inmuno-electroforesis de lágrimas son debidas a Josephson y Lockwood (15), habiendo sido encontrado por ellos que la IgA es la inmunoglobulina dominante. Más tarde, el mismo Josephson y Weiner (16), identificaron la porción secretora de IgA (1968). Como referencia histórica y metodológica, es recomendable el artículo de Mc Clellan et al (25).

Otras Proteínas.

La lisozima es un importante constituyente antimicrobiano en las lágrimas y de igual manera, su medida es un parámetro útil en el diagnóstico de alteraciones en la función lacrimal, especialmente en la queratoconjuntivitis sicca (36). Desde 1922, Fleming indicó que la actividad bacteriológica de las lágrimas era debida a la presencia de lisozima. Sin embargo, las características enzimáticas y bacteriolíticas de la lisozima, tan insistentemente indicadas como parámetros de función de la glándula lacrimal en el pasado, no son del todo específicas y su interacción con la agarosa y aún con el papel de filtro empleado en su recolección influyen en los niveles medidos de la propia sustancia en condiciones normales, haciendo su cuantificación precisa una delicada misión.

In vitro, la glándula lacrimal sintetiza y excreta más de 20 componentes proteicos diversos, entre los cuales los 3 mayores son: lactoferrina, prealbumina específica lacrimal y lisozima.

La lisozima cataliza la hidrólisis de la pared celular bacteriana, particularmente de las bacterias gram-positivas (37).

Una fuerte actividad de lisozima se ha detectado en las células secretorias de la glándula lacrimal (17). La lisozima es responsable del 20 a 40% del contenido proteico de las lágrimas (32), su concentración aumenta de la infancia a la edad adulta, alcanza un pico alrededor de los 30 años y decrece posteriormente. No existen diferencias significativas entre hombres y mujeres, pero sí grandes diferencias individuales. En los pacientes con blefaritis, conjuntivitis y queratitis su nivel fué normal (alrededor de 1.768 μ g./ml.) y estuvo reducido en pacientes con queratitis debida a herpes simplex (31). Se acepta, en líneas generales, que su nivel normal no se altera en varias enfermedades oculares externas no asociadas con ojo seco (23). Varios estudios han mostrado que no hay correlación entre el contenido de lisozima en las lágrimas y la velocidad de su flujo en individuos normales y que la lagrimación excesiva en enfermedades infecciosas oculares externas no altera su nivel.

La B-Lisina, una proteína termolábil, tiene también actividad antibacteriana que se conjuga con la de la lisozima. Los niveles lacrimales de esta proteína exceden los séricos, cuyo origen son las plaquetas. El origen de la B-Lisina lacrimal se desconoce.

La Lactoferina lacrimal tiene propiedades bacteriostáticas y bactericidas, y puede interactuar con anticuerpos específicos para producir un potente mecanismo antimicrobiano. La lactoferina se une a 2 átomos de hierro y tiene afinidad por el cobre, IgA, IgG y albúmina.

Tanto la lisozima como la Lactoferina son altamente sensitivas y específicas como indicadores de la función de las glándulas principal y accesoria, pudiendo ser la concentración lacrimal de Lactoferina más útil en situaciones diagnósticas.

A pesar de los extensos estudios de las proteínas de las lágrimas humanas recientemente realizados, muchos problemas permanecen aún sin resolver: su tipo, función, proceso de síntesis y secreción.

Rennie et al (28) reportaron la localización de lisozima tanto en la glándula principal como en las accesorias. Franklin et al (6) reportaron que la Lactoferina estaba localizada en las células acinosas de la glándula principal. Gillette et al (8) también la encontraron localizada en los epitelios acinares de las glándulas principal y accesoria.

En cuanto a la IgA, Franklin et al (6) demostraron la presencia de plasmocitos en el intersticio de la glándula lacrimal principal, siendo estas células las productoras de aquella sustancia. Advirtieron además la presencia de IgA en la luz acinar, células epiteliales y en el espacio intercelular. También observaron la presencia de componentes secretorios en la luz acinar, células epiteliales y en espacios intercelulares, e indicaron que la IgA secretoria era localmente producida en la glándula lacrimal principal.

En un completo estudio, Inada et al (10) sugieren que las proteínas específicas lacrimales reducidas francamente en el síndrome de Sjögren, son secretadas por la glándula principal o por las accesorias. Indican igualmente que estas 10 proteínas específicas están reducidas en pacientes con tumor de la glándula lacrimal principal y que por lo tanto, son secretadas fundamentalmente por esta glándula.

Sin embargo, en ninguno de los casos anteriores (S. de Sjögren y tumor de la glándula lacrimal) se encontraron cambios significativos en la concentración de la IgA secretoria respecto a sujetos normales, razón por la que la produc-

ción y secreción de IgA-secretoria se piensa debe ser diferente a la de las proteínas lacrimales específicas. Los niveles de componentes séricos de las lágrimas presumiblemente provienen a través de vasos conjuntivales. Estos autores admiten que la IgA-secretoria es producida por plasmocitos adyacentes al epitelio secretor de la glándula principal y que el componente secretor se produce en los acinos y en sistema tubular, como lo indica Allansmith (1).

Otros complejos de proteínas con metales identificados en las lágrimas humanas incluyen la ceruloplasmina (Cu) y la transferrina (Fe) que les brindan protección al unirse con cofactores metálicos.

El interferon está presente en las lágrimas. Es específico de especie, inhibe la replicación viral y es eficaz al limitar la severidad de la queratitis ulcerativa herpética. La aplicación tópica de ácido poli-inosínico-ácido policitídílico induce niveles registrables. Su farmacología, actividad y metabolismo permanecen sin determinar.

La histamina, prostaglandinas, activador del plasminógeno, complemento y proteasas son conocidos mediadores de la inflamación ocular. La prostaglandina F es un constituyente normal en las lágrimas (76 u/ml) y se ha encontrado elevada en la conjuntivitis vernal (434 u/ml) y en el tracoma (332 u/ml). La histamina se ha cuantificado en aproximadamente 9 ng/ml y se encuentra elevada en la conjuntivitis vernal (16 ng/ml), según Allansmith (1).

El activador del plasminógeno hallado en las lágrimas es de origen corneal e interactúa con el sistema de plasmina, mediando la ulceración estromal corneal y su vascularización (4).

Las lágrimas tienen los 9 componentes del complemento requerido para las vías

de fijación clásica y alterna. También se ha descrito un factor anticomplemento, cuya interacción con los anteriores factores modula la reacción inflamatoria y los mecanismos de defensa del exterior del ojo.

Se han detectado algunas enzimas comprometidas en el metabolismo de la glucosa y enzimas asociadas con el metabolismo de aminoácidos. Su origen es conjuntival y no son producto de secreción lacrimal.

Se han descrito antiproteasas lacrimales que regularían la actividad especialmente de colagenasas formadas por el epitelio corneal, queratocitos y PMN en enfermedades del tipo queratitis severa.

Fase Mucoide.

La capa de mucina de la película lacrimal recubre los micropliegues de las células epiteliales superficiales de la córnea, creando una fase hidrofílica que es esencial para la correcta distribución de la misma película. La mucina interactúa con la capa lipídica para disminuir la tensión superficial, estabilizando la película lacrimal.

Esta delicada capa, extendida sobre la conjuntiva bulbar, incluye células superficiales exfoliadas, partículas extrañas y bacterias.

La mucina lacrimal es secretada principalmente por las células caliciformes de la conjuntiva, y en mínima parte por células de las glándulas lacrimales. La producción diaria es de 2-3 microlitros, contrastando con la producción de la fase acuosa de 2 a 3 ml/día.

Las células caliciformes están localizadas a lo largo de la conjuntiva palpebral y de los fórnices, pero se concentran en el área nasal inferior.

La mucina que recubre los micropliegues epiteliales está compuesta por mucopolisacáridos neutros y ácidos, que mediante electroforesis en gel de poliacrilamida demuestra varias bandas, al menos una de ellas exclusiva de la mucina lacrimal. Podría en general indicarse que las mucinas lacrimal y conjuntival son glicoproteínas de carga eléctrica negativa y que su composición es de 75% carbohidratos y 20% proteínas.

Preciso es indicar que algunos estados de disfunción lacrimal pueden ser debidos a alteraciones en el componente mucoide, sea por deficiencia (avitaminosis A, esfacelación conjuntival), por exceso (hipertiroidismo, estímulo por cuerpo extraño) o por alteraciones bioquímicas en los mucopolisacáridos (keratitis sicca).

Inmunoglobulinas A y G de las Lágrimas (19)

Ig A	(mg%)	15.7
IgG	(mg%)	49.8
Complemento total	(UCH 100)	59.5

Actividad Enzimática de las Lágrimas (19)

Amilasa	(mU/ml)	3344
Fosfatasa Alcalina	(mU/ml)	31.9
Fosfatasa Acida	(mU/ml)	10.4
LDH	(mU/ml)	40.7
GOT	(mU/ml)	28.6
GPT	(mU/ml)	8.8
G-GPDH	(mU/ml)	2.1

FISICOQUIMICA DE LA PELICULA LACRIMAL

La estabilidad de la película lacrimal que recubre la córnea se gobierna por un principio biofísico: la energía libre de la

película (definida como tensión superficial (aire-líquido) + tensión de la interfase (líquido-sólido) debe ser igual o menor que la tensión crítica superficial de la córnea (9).

La primera tensión es de 70 dinas/cm² a 37°C., la segunda es de 50 dinas/cm² y entonces la energía total libre es de 120 dinas/cm²., más alta que la tensión superficial crítica de la córnea (28 dinas/cm².) y por lo tanto, el epitelio se convierte en "no humedecible" por el agua.

La mucina facilita la humidificación corneal y con ella la estabilidad de la película, mediante 3 mecanismos:

1. Disminuyendo la tensión en la superficie de la película lacrimal de 70 a 40 dinas/cm²
2. Disminuyendo la tensión en la interfase lágrima-epitelio, proporcionando sitios que unan agua.
3. Aumentando la tensión crítica en la superficie de la córnea de 28 a 40 dinas/cm., mediante adsorción a los micropliegues epiteliales.

En resumen, la mucina disminuye la energía libre de la película lacrimal y eleva la energía superficial de la córnea, que finalmente conduce a una película precorneal estable.

Como una nueva capa lacrimal trilaminar se forma entre parpadeo y parpadeo, su grosor se mantiene estable entre 6 y 10 micrm. El adelgazamiento de la película ocurre como resultado de la retracción hacia los fórnices y alguna evaporación. Si se impide el parpadeo, voluntariamente o de manera forzada, aparecen manchas secas en la superficie corneal que representan contaminación lipídica de la superficie epitelial recubierta por mucina, causando que la capa acuosa se

retraiga de esta nueva área hidrofóbica. Si el parpadeo se impide más, aparecen áreas más grandes de discontinuidad en la película lacrimal y la córnea subyacente se deseca.

De lo dicho anteriormente se deduce que la película lacrimal es básicamente inestable.

Después de cada parpadeo una capa continua se forma y constantemente tiende a romperse, mientras el parpadeo periódico remueve la película.

Otra importante consideración al analizar las anomalías de la película lacrimal es la superficie corneal por sí misma. Las irregularidades en la superficie epitelial interfieren con la capacidad de la mucina para adsorberse a la superficie y representan sitios de retracción inicial de la película lacrimal. Como consecuencia, la película lacrimal es más delgada en estas áreas y la ruptura de la película ocurre allí más fácilmente.

DIAGNOSTICO DE ESTADOS DE INSUFICIENCIA DE FUNCION LAGRIMAL

No existe prueba definitiva para establecer de manera segura, reproducible y suficientemente discriminatoria un diagnóstico de insuficiencia en la función lacrimal. Este diagnóstico depende frecuentemente de evidencia acumulada en repetidas observaciones y exámenes. Resulta entonces fundamental considerar signos que sugieren deficiencia lacrimal.(5)

Examen con Lámpara de Hendidura.

La atención inicial debe dirigirse hacia la banda lacrimal marginal. Esta banda, de grosor aumentado normalmente, está localizada en el borde de los párpados superior e inferior. Debe tener por lo menos 1 mm. de anchura y una buena

superficie convexa. Una delgada banda marginal o áreas de franca discontinuidad son altamente sugestivas de queratoconjuntivitis sicca. Un signo más difícil de advertir en esta entidad es el aumento de restos en la película lacrimal. Esto se aprecia cuando al parpadear se ve un material flotar en la película lacrimal. Es normal encontrar algunas láminas de células epiteliales descamadas y un poco de mucina en la película, pero cuando ello es muy notorio es definitivamente anormal y resulta de la acción reducida de arrastre de las lágrimas y de un acúmulo de restos que no han sido eliminados adecuadamente.

Otro signo notorio en la queratoconjuntivitis sicca son las bandas de mucina en la película lacrimal. Normalmente, la mucina es arrastrada por el flujo continuo de lágrimas hacia las puntas, pero al reducirse el flujo, la mucina contaminada con lípidos se acumula en la película lacrimal.

Es también importante inspeccionar cuidadosamente los fórnic es superior e inferior: enfermedades inflamatorias crónicas leves como el penfigoide ocular se manifiestan inicialmente con el desarrollo de un pequeño simbléfaron, que puede advertirse solamente cuando se retraen los párpados cuidadosamente y se inspeccionan los fórnic es.

Test de Schirmer.

Esta prueba constituye la base del diagnóstico clínico de los síndromes de ojo seco. La prueba empleada por décadas, depende del humedecimiento de una tira de papel de filtro Whatman N. 41, valorada cuantitativamente en un tiempo límite.

La tira de papel es de 5 mm. de ancho por 35 mm. de largo y se dobla a 5 mm. de uno de sus extremos. Para cualquier

persona familiar con esta prueba, su falta de reproducibilidad, y aún su variación en el mismo individuo, limitan su valor, lo cual no significa que no sea de utilidad.

La prueba de Schirmer es altamente significativa cuando hay una disminución consistente en el humedecimiento del papel en mediciones seriadas.

Probablemente lo más seguro como valor normal es 5 mm. de humedecimiento a los 5 minutos, medidos desde el pliegue. Con esta medida se dice que aún hay 15% de falsas positivas. Cuando se registran menos de 5 mm. en varias mediciones en días diversos, Lemp (18) considera significativo el dato.

Algunos emplean una forma modificada del test de Schirmer, empleando la tira después de colocar una gota de anestésico tópico, indicando que tal medición elimina la secreción refleja estimulada por la inserción de la tira, y por lo tanto, mide la producción basal. Probablemente esto sea cierto, pero sólo parcialmente, pues la aplicación del anestésico genera de todas formas una lagrimación refleja.

No significa esto que el test de Schirmer II no sea útil. Es preciso, eso sí, darle su justo valor. En general, reconocidos autores no encuentran el Schirmer II (con anestésico tópico) tan útil como la prueba de Schirmer I.

Tinción con Rosa de Bengala

El rosa de bengala, un colorante hidrosoluble, es de los llamados "colorantes vitales" y es específico para células desvitalizadas y para mucina. Debido a que las células epiteliales ressecadas son desvitalizadas con el tiempo, hay una tinción extensa del epitelio corneal y conjuntival en los estados de deficiencia lacrimal. De igual

manera, si se hace un Schirmer test luego de la tinción con rosa de bengala, el colorante puede resultar tan irritante que induzca una lagrimación profusa en todos los ojos, pero especialmente en ojos secos y ello puede dar lugar a resultados negativos falsos. Para evitar esta irritación, una microgota de rosa de bengala al 1/2% o al 1% puede aplicarse a la conjuntiva bulbar superior con un aplicador de algodón estéril y se le indica al paciente que parpadee. Este efecto de tinción es similar al encontrado con grandes cantidades de colorantes sin prácticamente irritación de ojo.

Tiempo de Ruptura de la Película Lacrimal

Esta prueba es útil para definir una película lacrimal inestable. Como tal, es particularmente útil en el diagnóstico de casos de ojo seco debidos a deficiencia de mucina.

Se basa en el uso del fenómeno normal, fisiológico, de formación de "manchas secas". El intervalo entre el último parpadeo y el desarrollo de la primera mancha seca difusamente distribuida en la película precorneal es definido como tiempo de ruptura.

Los estudios han mostrado que en los ojos normales, usualmente varía en promedio entre 15 y 45 segundos. Los tiempos de ruptura menores de 10 segundos son considerados anormales y altamente sugestivos de película lacrimal inestable. La película lacrimal es extremadamente inestable en los estados de ojo seco debidos a deficiencia en mucina y en algunos casos de queratoconjuntivitis sicca.

El tiempo de ruptura de la película lacrimal no es útil si hay anomalías en el epitelio superficial de la córnea.

Ello es debido a que la película se romperá preferencialmente sobre la anormalidad epitelial, un reflejo de la dinámica anormal de la película sobre tal lesión epitelial y no necesariamente un reflejo de una película lacrimal por sí misma inestable. La clave aquí es reconocer el desarrollo de "manchas secas" ampliamente distribuidas. Si una mancha seca se desarrolla reiteradamente en un área específica de la córnea, uno debe asumir que hay una anormalidad epitelial y ello no debe tomarse como una indicación de un tiempo de ruptura anormal.

Es también importante anotar que cuando se efectúa esta prueba debe hacerse sin sostener los párpados, pues una retracción mecánica de ellos puede causar una retracción excesiva de la película lacrimal en los fórnices y adelgazar la película anormalmente, lo cual causa una rápida ruptura. Los anestésicos tópicos causan una ruptura temprana y deben evitarse.

Solamente deberán utilizarse tiras planas de fluoresceína, aplicadas del lado temporal de la conjuntiva bulbar. La luz con el filtro de cobalto en la lámpara de hendidura se utiliza para explorar la córnea mientras se solicita al paciente que no parpadee. Si el paciente no puede mantenerse sin parpadear e inadvertidamente lo hace, simplemente se empieza de nuevo, se hacen varias mediciones y se promedian.

Esta importante prueba tiene sus limitaciones: además de los problemas asociados con la integridad epitelial, algunos investigadores han encontrado dificultad para obtener datos reproducibles en un mismo ojo. De todas maneras, esta prueba es muy útil para apoyar un diagnóstico de anormalidad de la película lacrimal en pacientes con irritación crónica externa del ojo.

Prueba de Dilución de Fluoresceína.

La instilación de una cantidad conocida de fluoresceína en la película constituye una manera segura de medir el cambio lacrimal, que constituye una medida indirecta de la producción lacrimal.

A medida que se diluye, se advierten diferencias en la concentración de fluoresceína, que pueden medirse con un fluorofotómetro.

Proporciona una importante información fisiológica, pero aún constituye un instrumento de investigación y no está generalmente disponible para uso clínico.

Osmolaridad Sérica.

Varios estudios han indicado relación entre la osmolaridad y los estados de queratoconjuntivitis sicca (7). Estos estudios indican que la hiperosmolaridad de las lágrimas en los síndromes de ojo seco puede ser un buen indicador de la producción de la fase acuosa lacrimal. Los valores de osmolaridad lacrimal (medidas por la depresión en el punto de congelación) en sujetos normales son en promedio de 302 ± 6.3 mOsm/L y en los pacientes con queratoconjuntivitis sicca son en promedio de 343 ± 32.3 mOsm/L.

Determinaciones de Lisozima.

Evidencia reciente sugiere que el contenido de lisozima disminuye en las queratoconjuntivitis sicca, y que esta disminución va paralela con la disminución en la producción acuosa de lágrimas. Debido a ello, se ha señalado que la medición de lisozima en las lágrimas representa el más seguro diagnóstico de estas enfermedades. A pesar de lo anterior, la prueba no ha ganado popularidad debido a que es complicada de desarrollar y requiere un

laboratorio especial, que incluye la posibilidad de efectuar electroforesis en papel de filtro y el mantenimiento de una cepa bacteriana (*Micrococcus lysodeikticus*) cuya inhibición de crecimiento cuantificada debido a las lágrimas determina el contenido de lisozima de estas últimas.

Determinación de Lactoferrina lacrimal por Inmunodifusión Radial.

Janssen y van Bijsterveld describieron recientemente (12) un ensayo para medir lactoferrina lacrimal por inmunodifusión radial. En 58 muestras de sujetos normales se encontró una concentración promedio de 1.42 g/L. Además, se encontró una alta correlación entre los niveles de lactoferrina lacrimal medida por inmunodifusión radial y los niveles de Lisozima medidos por difusión en agar en un grupo heterogéneo de sujetos, desde individuos normales hasta pacientes con queratoconjuntivitis sicca. Según lo anterior, un límite normal inferior de 0.78 g/L. se determinó para la concentración de lactoferrina. Este método no requiere facilidades de laboratorio y puede ser una alternativa fácilmente accesible como o en adición a pruebas de función lacrimal actualmente en uso.

En resumen, varias pruebas para la estimación de la función de la glándula lacrimal están disponibles. La prueba de Schirmer es la más comúnmente empleada en la práctica clínica, debido a que es fácil de realizar y sus resultados son inmediatos. Fue descrita por Schirmer en 1903. La precisión de la prueba es sin embargo baja y aún tomando como límite normal inferior 5.5 mm. de humidificación del papel filtro, la posibilidad de clasificación errada es del 16% (36). Marquardt (24) también reporta la dificultad de definir el límite inferior normal. El valor diagnóstico de

la prueba de Schirmer después de anestesia local fue descrita inicialmente por Jones (13) con el propósito de establecer una secreción lacrimal "basaal", pero ha sido seriamente cuestionado por Jordan y Baum (14) y por Marquardt (24).

En pacientes con queratoconjuntivitis sicca la disfunción de la glándula lacrimal causa una disminución en la concentración de lisozima de la película lacrimal (27). La medición de la concentración de Lisozima ha sido demostrada como la prueba más sensible para el diagnóstico del síndrome de queratitis sicca (37).

La Lisozima usualmente se determina por su actividad lítica sobre la pared celular del *Micrococcus lysodeikticus* (3,22,30). Estos métodos requieren facilidades de laboratorio que frecuentemente no están disponibles para el oftalmólogo y por lo tanto su aplicación práctica ha sido limitada.

En varios estudios, grupos de investigación holandeses han observado que casi invariablemente existe una disminución simultánea en las concentraciones de Lisozima, lactoferrina y Prealbúmina específica lagrimal en pacientes con queratoconjuntivitis sicca (11).

En cultivos tisulares estas proteínas fueron todas sintetizadas y excretadas por el tejido de la glándula lacrimal, lo cual ha sugerido que la medición de Lactoferrina y Prealbúmina específica lacrimal es una buena alternativa potencial como parámetro para la función de la glándula lacrimal. Sin embargo, solamente existen patrones standard y antisuero disponible comercialmente para la Lactoferrina, lo cual excluye por el momento la Prealbúmina como alternativa práctica.

MÉTODOS DE LABORATORIO PARA ANALISIS QUIMICO DE LAGRIMAS

La primera consideración debe hacerse respecto al método de recolección. Se ha demostrado que existe un incremento significativo en las proteínas de origen sérico medidas en lágrimas recolectadas en papel de filtro Whatman N. 41 (Schirmer) comparado con lágrimas recolectadas sin el estímulo mecánico a la conjuntiva que tal método necesariamente genera (34).

A pesar de lo anteriormente indicado, parece ser que con el empleo de papel de filtro de Schirmer se consigue usualmente material adecuado en volumen, y que si fuere necesario un mayor volumen, el uso de estimulación nasal, gases de amonio, cebolla, limón o irritantes lacrimógenos podría suplirlo, alterando moderadamente la composición original de las lágrimas.

Minerales. Sodio y potasio pueden cuantificarse con método fotométrico o llama. Cloro con método colorimétrico, estando disponible un método comercial conocido como "Clorofast" (Chemilab, Milan). Calcio y fósforo inorgánico total con el método colorimétrico "Roche" (Basilea, Suiza). Glucosa y úrea con métodos enzimáticos. Colesterol con métodos enzimático "Merck" (Darmstadt, Alemania).

Proteínas totales con método colorimétrico (Lawry, 1951).

Albúmina, transferina y ceruloplasmina con reactivo RID por concentración de bases Boehringerwerke (Marburg, RFA).

Lactato y piruvato con test cinético Boehringer (Ingelheim, RFA).

Fosfatasas alcalina y ácida con 4 nitrofenilfosfato como sustrato y test cinéticos Boehringer N. 15236 y 1579.

SGOT y SGPT con reactivos de tests cinéticos Carlo Erba (Milán, Italia).

Trazados electroforéticos de proteínas en acetato de celulosa.

Inmunoglobulinas A y G con reactivo RID "Ultra-low-Level" y "Low-level" Boehringer.

Complemento total con "quantiplate" Kallestadt (Chasco, Minn, USA).

Un método cualitativo de estimación de glucosa en lágrimas es mediante el empleo de la preparación comercial de Clinistix (Ames Co.), empleado para detectar glucosuria. Se aplica el Clinistix en el fondo de saco conjuntival inferior durante 10 segundos para humedecer el extremo de la tira o esta misma se coloca ya humedecida con agua. Los resultados se leen luego de 1 minuto. Si la glucosa está presente, un color azul aparece, cuya intensidad se correlaciona con el nivel de glucosa sanguínea. En lugar de aplicar la tira de Clinistix al fondo de saco conjuntival inferior, una tira de papel de Schirmer puede colocarse en el fondo de saco inferior y una vez humedecido se coloca contra él la tira de clinistix durante un minuto, y dependiendo de la concentración de glucosa presente, el color varía entre azul y café oscuro. Se ha determinado que concentraciones de glucosa en lágrimas menores de 10 mg% no producen cambios en el clinistix. Concentraciones mayores de 22 mg% producen un color azul oscuro. Colores azules brillante y medio son producidos por concentraciones de glucosa entre 10 y 17 mg% (26).

Un análisis cuantitativo de glucosa puede hacerse con lágrimas recolectadas en tubo capilar, en base a la siguiente reacción:

La glucoxidasa por acción sobre la glucosa produce ácido gluconico y peróxido

de hidrógeno; éste se descompone y transforma la orto-dianisidina en orto-anisidina oxidada la cual reacciona con ácido sulfúrico dando un compuesto rojo cuya concentración se mide por espectrofotometría (p. ej. en equipo Unimeter).

RESUMEN

Revisión de algunos conceptos básicos sobre la composición química y la fisiología de la película lacrimal. El estudio incluye descripciones de las técnicas de medición (tanto de análisis cualitativo como cuantitativo) de los componentes lacrimales más comunes y útiles clínicamente. Se consideran en forma crítica algunas de las pruebas de medición más importantes, sencillas y reproducibles (examen con lámpara de hendidura, Schirmer, prueba de dilución de fenoltaleína). Este artículo se publica con una revisión bibliográfica actualizada y como etapa previa a la determinación de patrones inmunoelectroforéticos de las proteínas lacrimales

en trastornos conjuntivales degenerativos y proliferativos (p. ej. pterigio y pingüecula).

SUMMARY

A review of some basic concepts on tear-film chemical composition and physiology. The study includes descriptions of measurement techniques (both quantitative and qualitative analysis) of the most common and clinically useful compounds in tears.

The author considers critically some of the most important and easily performed and reproducible tests of lacrimal function (slit lamp examination, Schirmer, fluorescein dilution tests, etc.).

This article appears as an up-to-date bibliographic review previous to a detailed determination of immunoelectrophoretic protein patterns of tears in degenerative and proliferative conjunctival disorders (e.g. pterigium and pinguecula).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Allansmith, M.R.: *The eye and immunology*. Mosby, St Louis, 1982.
- (2) Allansmith, M.R., McClellan, B.H.: *Inmunoglobulin levels in human tears*. *Invest. Ophthalmol.* 8: 240, 1969.
- (3) Bonavida, E., Sapse, A. T.: *Human tear lysozyme*. *Am. J. Ophthalmol.* 66: 70-75, 1968.
- (4) Dhir, S. P., et al.: *Prostaglandin in human tears*. *Am. J. Ophthalmol.* 87: 403-404, 1979.
- (5) Doane, M.G.: *Blinking and the mechanics of the lacrimal drainage system*. *Ophthalmology* 88: 884-885, 1981.
- (6) Franklin, R.M., et al.: *Immunohistologic studies of human lacrimal gland: localization of immunoglobulins, secretory component and lactoferrin*. *J. Immunol* 110: 984-992, 1973.
- (7) Gilbard, J. P., et al.: *Tear osmolarity and ocular surface disease in keratoconjunctivitis sicca*. *Arch. Ophthalmol.* 97: 1642-1646, 1979.
- (8) Gillette, T.E., Allansmith, M.R.: *Lactoferrin in human ocular tissues*. *Am. J. Ophthalmol.* 90: 30-37, 1980.
- (9) Holly, F. J.: *Surface chemical evaluation of artificial tears and their ingredients. I. Interfacial activity at equilibrium: con-*

- tact and intraocular lens. *Med. J.* 4: 14-31, 1978.
- (10) Inada, K. et al.: Studies of human tear proteins-2: Analysis by crossed immunoelectrophoresis of tears from diseased eyes. *Jpn. J. Ophthalmol.* 27: 277-288, 1983.
- (11) Janssen, P.T., Van Bijsterveld, O. P.: The relation between tear fluid concentration of lysozyme, tear specific prealbumin and lactoferrin. *Exp. Eye Res.* 36: 773-779, 1983.
- (12) Janssen, P. T., Van Bijsterveld, O. P.: A simple test for lacrimal gland function: a tear lactoferrin assay by radical immunodiffusion. *Graefe's Arch. Exp. Ophthalmol.* 220: 171-174, 1983.
- (13) Jones, L.T.: The lacrimal secretory system and its treatment. *Am. J. Ophthalmol.* 62: 47-69, 1966.
- (14) Jordan, A., Baum, J. C.: Basic tear flow. *Ophthalmology* 87: 920-930, 1980.
- (15) Josephson, A.S., Lockwood, D. W.: Immunoelectrophoretic studies of the protein components of normal tears. *J. Immunol.* 93: 532-539, 1964.
- (16) Josephson, A. S., Weiner, R.S.: Studies, of the proteins of lacrimal secretions. *J. Immunol.* 100: 1080-1092, 1968.
- (17) Klockars, M., Reitamo, S.: Tissue distribution of lysozyme in man. *J. Histochem. Cytochem.* 23: 934-940, 1975.
- (18) Lemp, M. A.: Diagnosis and treatment of tear deficiencies, in *Duane's Clinical Ophthalmology*, 4, cap. 14, 1982.
- (19) Linoli, O., et al.: Ricerche sulla composizione delle lacrime. *Pathologica* 75: 509-517, 1983.
- (20) Liotet, S.: Les proteines des larmes humaines. *N. Presse Med.* 8: 3893-3895, 1979.
- (21) Lundh, R. L., et al.: A study of the human blood-tear barrier and the biochemical changes in the tears of 30 contact lens wearers (50 eyes). *Ophthalmologica (Basel)* 188: 100-105, 1984.
- (22) Mackie, I. A., Seal, D.U.: Quantitative tear lysozyme assay in units of activity per microlitre. *Brit. J. Ophthalmol.* 60: 70-74, 1976.
- (23) Mackie, I. A., Seal, D. U.: The questionable dry eye. *Brit. J. Ophthalmol.* 65: 2-9, 1981.
- (24) Marquardt, R.: Untersuchungen zur tranenfilmstabilitat in: *Chronische Conjunctivitis - Trockenes Auge*, Springer, Wien, 1982.
- (25) McClellan, B. H., et al.: Immunoglobulins in tears. *Am J. Ophthalmol.* 76: 89-101, 1973.
- (26) Mediratia, R. K., Rohatgi, J.N.: Glucose estimation in tear fluid. Its diagnostic significance, a preliminary study. *Ind. J. Ophthalmol.* 31: 635-638, 1983.
- (27) Regan, E.: The lysozyme content of tears. *Am. J. Ophthalmol.* 33: 600-612, 1950.
- (28) Rennie, I. G., Parsons, M. A.: Lysozyme distribution in human lacrimal glands and other ocular adnexa. *Arch. Ophthalmol.* 99: 1850-1853, 1981.
- (29) Ridley, I.: Intraocular pressure and drainage of aqueous humour. *Brit. J. Exp. Pathol.* 11: 217-240, 1930.
- (30) Ronen, R., et al.: A spectrophotometric method for quantitative determination of lysozyme in human tears. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 14: 47-488, 1975.
- (31) Saari, K. M., et al.: Lysozyme content of tears in normal subjects and in patients with external eye infections. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 221: 86-88, 1983.
- (32) Selinger, D. S., et al.: Resistance to infection of the external eye: the role of tears. *Surv. Ophthalmol.* 24: 33-38, 1979.
- (33) Sharma, G. K., et al.: Tear glucose in ocular inflammations and its enzymatic

-
- lysis as a possible therapeutic adjunct in treatment of ocular infections. *Ind. J. Ophthalmol.* 31: 563-565, 1983.
- (34) Stuchell, R. N., et al.: The effect of collection technique on tear composition. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25: 374-377, 1984.
- (35) Tapaszto, I.: Pathophysiology of human tears. *Int. Clin. Ophthalmol.* 13: 119-147, 1973.
- (36) Van Bijsterveld, O. P.: Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 82: 10-14, 1969.
- (37) Van Haeringen, N. J.: Clinical biochemistry of tears, *Surv. Ophthalmol.* 26: 84-96, 1981.