

## CUANTIFICACION DE LA LACRIMACION: NUEVO METODO FLUOROFOTOMETRICO.

Por  
GONZALEZ DE LA ROSA Manuel  
SERRANO GARCIA Miguel  
CARDONA GUERRA Pedro  
HERNANDEZ CALZADILLA Carlos  
(de La Laguna)

*RESUMEN ESPAÑOL:* Cuantificación de la lacrimación. Nuevo método fluorofotométrico. Se describe un nuevo método fluorofotométrico para medir volúmenes en el rivus lagrimal, modificándose la técnica de MISHIMA (1.966) para calcular el recambio lagrimal, tratando de minimizar el efecto perturbador que, sobre la prueba, representa la hipersecreción secundaria a la instilación de fluoresceína.

*RÉSUMÉ FRANÇAIS:* Quantification de la production lacrymale. Une nouvelle méthode fluorophotométrique. On décrit une nouvelle méthode fluorophotométrique pour mesurer des volumes dans le rivus lacrymal. On modifie la technique de MISHIMA (1966) pour calculer le renouvellement lacrymal, afin de minimiser l'effet perturbateur que, dans ce cas, représente l'hypersecretion secondaire á l'instillation de la fluorescéine.

*ENGLISH SUMMARY:* Valoration of lacrimal production. A new fluorophotometric method. A new fluorophotometric method is reported for measuring lacrimal rivus volumes which modifies MISHIMA'S technique (1.966) with this one can calculate the lacrimal production trying to minimize the perturbing effect which, according to the experiments represents the secondary hypersecretion caused by the fluorescein instillation.

## INTRODUCCION

El problema fundamental para determinar la producción lagrimal reside en la dificultad de mantener durante la prueba las condiciones basales o fisiológicas del paciente. Se han descrito numerosos métodos para medir la producción lagrimal observando la dilución de determinadas sustancias en las lágrimas por métodos colorimétricos, recogiendo la lágrima con tiras de papel como en la clásica prueba de SCHIRMER, con capilares etc... Cualquiera de estos métodos altera, de una forma o de otra, la producción lagrimal, por lo que difícilmente podemos admitir que midan la producción lagrimal basal o, como la define el Prof. MURUBE, la "lágrima peripatética".

Uno de los intentos más serios en este sentido lo constituyó el trabajo de MISHIMA et al. (1966), quienes colocaban en el saco conjuntival una gota de un microlitro de fluoresceína al 0'1% ( $10^{-3}$  gr/ml) y median la evolución de la fluorescencia de la lágrima en el tiempo. Para ello emplearon un fluorofotómetro desarrollado por MAURICE (1963), evitando irritar el ojo o modificar el volumen lagrimal durante la prueba. La tasa de renovación lagrimal resultaba ser, por este método, del 16% al minuto, y el flujo lagrimal de 1'2 mililitros por minuto.

Nuestra intención ha sido, como se verá más adelante, aportar algunas mejoras al procedimiento del cálculo de las concentraciones a partir de la fluorescencia y minimizar el efecto perturbador que

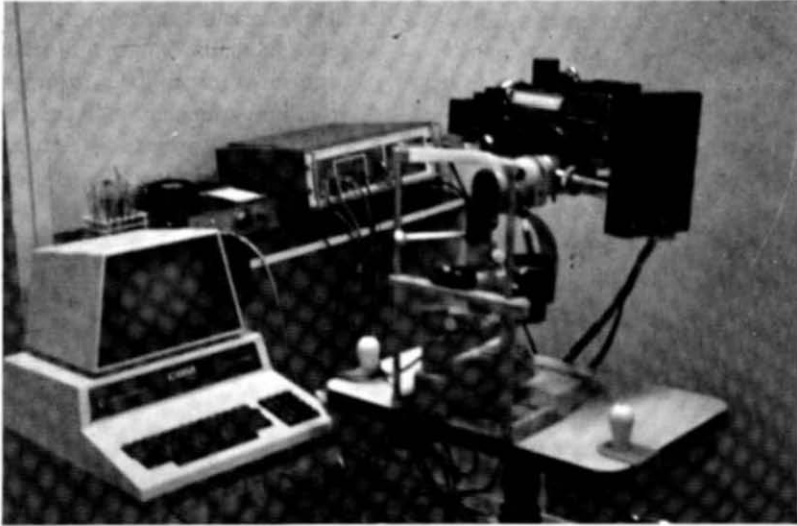
sobre este método tiene la hipersecreción consecuente a la instilación de la fluoresceína para, de esta forma, acercarnos a las condiciones peripatéticas ideales.

## MATERIAL Y METODO.

Se utilizó un espectrofotómetro de reflexión, (fig. 1) diseñado y construido gracias a la colaboración entre el Instituto de Astrofísica de Canarias y el Departamento de Oftalmología de la Universidad de La Laguna. (GONZALEZ DE LA ROSA et al. 1980). El equipo se acopla a una lámpara de hendidura Zeiss y se controla desde un microcomputador, estando dotado de un alto grado de automatización en su funcionamiento.

Se utilizó para la estimulación de la fluoresceína un filtro Wratten Kodak 47B, y para la detección de la luz fluorescente resultante, un filtro interferencial variable ORIEL5748 centrado en los 520 nm mediante una rendija de 1'2 x 22 mm que permite una resolución de 12'5nm. El resultado de esta combinación permite asegurar que el receptor es prácticamente ciego para la luz azul de estimulación (transmitancia del filtro detector inferior al 0'01%).

Enfocamos con el fotómetro la región central del rivus lagrimal inferior limitando las medidas a una longitud de 10 mm gracias a un diafragma de campo tipo iris situado en el plano imagen del sistema óptico. A partir de la instilación de la fluoresceína se tomaron medidas se-



EL ESPECTROFTAL, utilizable como espectrofotómetro y como fluorofotómetro. De izquierda a derecha: microcomputador, estabilizador de la alimentación, unidad de control y detector montado sobre la lámpara de hendidura.

riadas de fluorescencia, utilizando un tiempo de integración para cada registro de 4 segundos.

De cada grupo de 6 medidas se descartaron la máxima y la mínima para eliminar el efecto perturbador del parpadeo, y se promedió el resto, utilizando como control de la estabilidad de las señales el coeficiente de variación de Pearson, que fué en todo caso inferior al 5%.

La toma de datos se hizo de forma discontinua para mantener al paciente en unas condiciones poco alejadas de la normalidad.

## PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS.

### *VOLUMEN DEL RIVUS LAGRIMAL.*

Una de las principales dificultades del método fluorofotométrico para la determinación del flujo lagrimal consiste en la evaluación del volumen de lágrimas que es objeto de medición. Desconociendo este dato resulta imposible averiguar a qué concentración de fluoresceína corres-

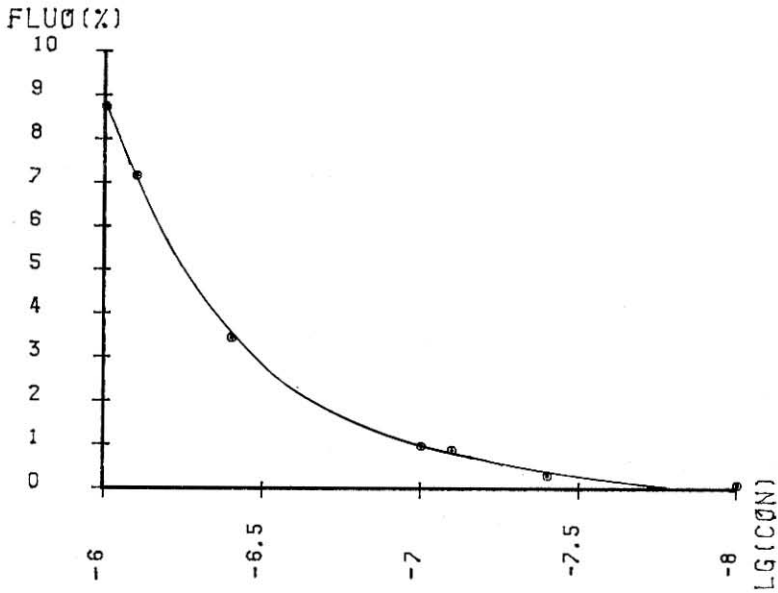
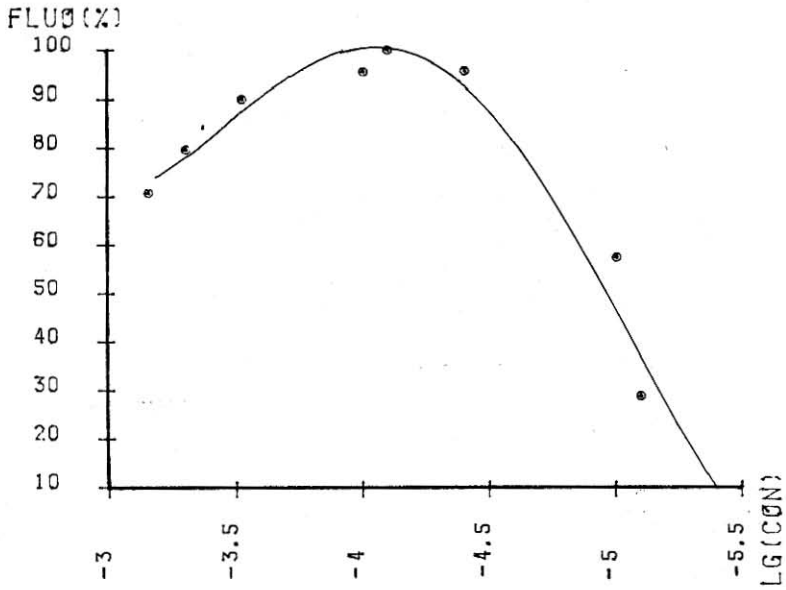
ponde cada determinación de fluorescencia.

Mientras que MISHIMA et al. (1966) parten de unos cálculos volumétricos producto de estimaciones anatómicas y fotográficas, nosotros hemos puesto a punto un nuevo método que incluye una estimación de dichos volúmenes por fluorofotometría.

La fluoresceína a concentraciones altas es muy poco fluorescente. A medida que se diluye, la fluorescencia aumenta, alcanzando valores máximos a la concentración de  $8 \times 10^{-5}$  gr/ml (0'008%) para disminuir progresivamente con concentraciones inferiores (fig. 2).

Nosotros hemos aprovechado este fenómeno para calcular la concentración de la lágrima circulante por el rivus lagrimal, zona donde practicamos las medidas de fluorescencia.

Instilamos con una microjeringa un volumen de 1 microlitro de fluoresceína al 10% ( $10^{-1}$  gr/ml.) en saco conjuntival



Eficacia porcentual de varias concentraciones de fluoresceina ( se señala el logaritmo de la concentración expresada en gr/ml) para generar luz por fluorescencia. En la gráfica inferior se amplifica la escala para las concentraciones con menos del 10% de eficacia.

de forma que, pese a establecerse una hiperproducción lagrimal refleja en los primeros minutos, al diluirse en la lágrima no se alcanzará la concentración de máxima eficacia fluorescente ( $8 \times 10^{-3}$ gr/m.).

A continuación realizamos determinaciones de fluorescencia a nivel del rívis lagrimal, abarcándolo en una longitud de 10 mm, observando como la fluorescencia aumenta con el tiempo para luego descender, describiendo una curva (fig. 3) cuyo máximo señala que se ha alcanzado la referida concentración de máxima eficacia fluorescente.

Si llamamos F a la fluorescencia en este punto podremos calcular experimentalmente, usando una disolución de fluoresceína a la misma concentración, cual es el volumen capaz de producir una fluorescencia F. El volumen resultante será similar al de lágrimas presentes en la sección de rívis lagrimal objeto de análisis. El estudio de 20 pacientes normales de ambos sexos, y edades comprendidas entre 20 y 35 años proporcionó un valor promedio de 0'035 microlitros por milímetro de rívis, o lo que es lo mismo un área de sección en el menisco lagrimal de 0'035 mm.<sup>2</sup>

**FLUJO LAGRIMAL.**

Si llamamos P a la fluorescencia generada por un volumen de V de fluoresceína a la concentración de  $8 \times 10^{-5}$ gr/ml, experimentalmente hemos comprobado que, para disoluciones inferiores a  $2 \times 10^{-5}$  gr/ml, la concentración a la que se encuentra una disolución problema puede deducirse de su fluorescencia (F) según la ecuación:

$$C \text{ (gr/ml)} = (429'4 \times \frac{F}{P} - 3'34) \times 10^{-7}$$

De otra parte, si en un recipiente que contiene un volumen V de una disolución que se encuentra a una concentra-

ción Co, penetra de forma continua un volumen Q de disolvente al minuto y sale de él un volumen idéntico de disolución en el mismo tiempo, reduciendo la concentración en un tiempo t hasta Ct, el flujo (Q) puede deducirse de la evolución de las concentraciones en el tiempo mediante la fórmula:

$$Q \text{ (vol./min.)} = \frac{V}{t} \times \ln \frac{C_0}{C_t}$$

de donde se deduce que:

$$\ln C_t = \ln C_0 - \frac{Q}{V} \times t$$

Por lo tanto, si el flujo lagrimal es constante a lo largo de la exploración, tendrá que existir una correlación lineal entre el tiempo y el logaritmo neperiano de las concentraciones. Para un volumen determinado el flujo vendría reflejado por la pendiente de la recta ( $-\frac{Q}{V}$ )

Hemos comprobado que, efectivamente, esta linealidad existe (Fig. 4) si se excluyen del análisis estadístico los datos correspondientes a los primeros minutos, que, de otra forma, se ven artefactados por la hipersecreción refleja inicial, y si se deduce de cada una de las medidas de fluorescencia un valor constante que corresponde a la fluoresceína que permanece fijada a los tejidos durante la prueba, así como a la autofluorescencia de estos.

Por término medio los resultados en los 20 pacientes fueron:

Tiempo inicial despreciado = 15 minutos.

Tiempo total explorado = 25 minutos.

Número de medidas por caso = 63'5

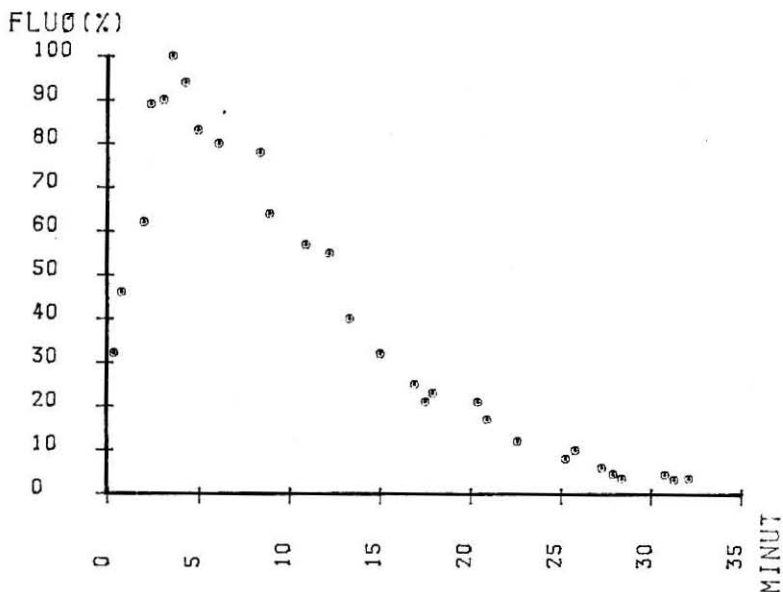
Coefficiente de correlación

(tiempo/ln concentración) = 0'907

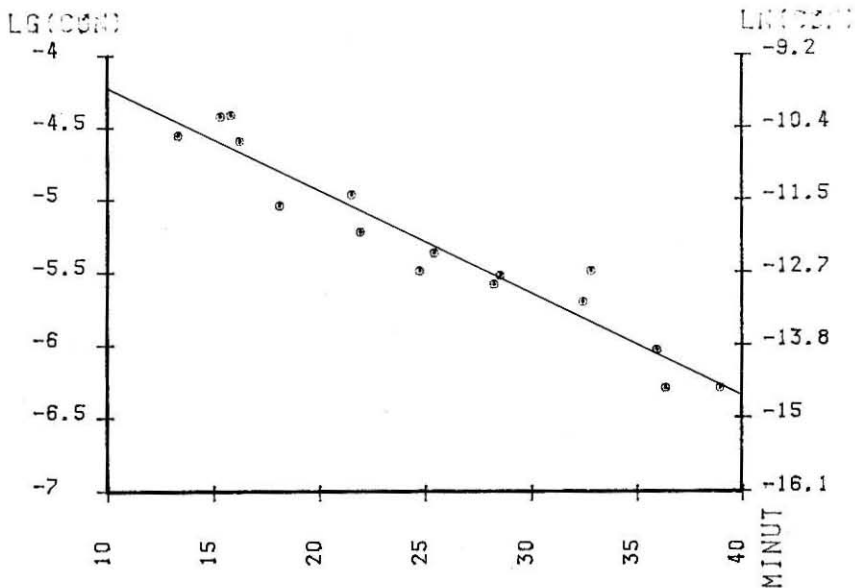
Pendiente de la recta =  $0'1089 \pm 0'0531$

El flujo lagrimal podrá de esta forma calcularse respecto al volumen total de lágrimas presentes en el saco conjuntival (V) por la fórmula:

$$Q = 0'1089 \times V$$



Evolución de la fluorescencia en el rívis lagrimal en uno de los casos. Después de una rápida fase ascendente, la dilución alcanza la máxima eficacia fluorescente para luego descender más lentamente.



Una vez estabilizado el volumen lagrimal del rívis (despreciando los primeros minutos de la prueba), la concentración de la fluoresceína disminuye de forma lineal con respecto al tiempo.

Si V es el 100% del volumen presente en un momento dado en el saco conjuntival podemos decir que en el transcurso de un minuto se renueva el  $10'89 \pm 5'31\%$  del volumen lagrimal total.

La hipersecreción refleja inicial, bastante variable de unos pacientes a otros, nos llevó a considerar que la medida del volumen del rivus podría estar también artefactada por exceso y en consecuencia, lo estarían también el cálculo de las concentraciones a partir de las fluorescencias y la estimación del flujo.

Teniendo esto en cuenta, hemos definido los posibles límites máximos y mínimos del volumen del rivus y calculado el flujo teórico para seis volúmenes comprendidos entre estos valores extremos, comprobando que la incertidumbre en el cálculo del volumen no afecta a nuestra estimación de la tasa de renovación, en más de un 2%

#### VOLUMEN LACRIMAL TOTAL

MISHIMA (1966) observó la evolución de las concentraciones durante los primeros minutos de una prueba fluorofotométrica y dedujo que el volumen total era de unos 7 microlitros.

Estudió la correlación entre el tiempo y las concentraciones respectivas de colorante y, de la ecuación de la línea de regresión resultante, calculó por extrapolación la concentración "en tiempo 0". De este dato podría deducirse el volumen total de lágrimas conociendo la concentración y el volumen de la fluoresceína administrada al paciente, según la ecuación:

$$V \times C = V' \times C'$$

Nosotros hemos tratado de repetir la experiencia pero pudimos comprobar

que la correlación era mala, apareciendo los resultados muy dispersos a consecuencia de la respuesta hipersecretora inicial, que resultó ser muy irregular y variable.

Seleccionando los casos que presentaban una hipersecreción refleja mínima, encontramos un volumen lagrimal total de unos 10 microlitros, lo que nos llevaría a cuantificar el flujo lagrimal en 1'1 microlitros/minuto. Sin embargo, reconociendo las dificultades que presenta el cálculo del volumen total, creemos que es preferible la utilización de la tasa porcentual de renovación, dato mucho más fiable y de idéntica utilidad clínica.

#### AGRADECIMIENTO.

Nuestra profunda gratitud a todos los componentes de los Servicios Técnicos del Instituto de Astrofísica de Canarias y en particular a don MAXIMINO GALAN NUÑEZ, don SERGIO GONZALEZ MARTIN-FERNANDEZ y don PEDRO ALVAREZ MARTIN que han dirigido respectivamente los aspectos óptico y mecánico, electrónico e informático del proyecto.

#### BIBLIOGRAFIA.

GONZALEZ DE LA ROSA M., DEL ROSARIO CEDRES D., CARDONA GUERRA P. y SERRANO GARCIA M. "Fotómetro clínico computarizado para espectrofotometría y fluorodensitometría". St. Opht. 2:105-109, 1.980.

MAURICE D.M.- "A new objective fluorophotometer" Exp. Eye Res. 2:33-38, 1963.

MISHIMA S., GASSET A., KLYCE S.D. y BAUM J.L. "Determination of tear volume and tear flow". Invest. Ophthalm. 5:264-276, 1966.