

[Faint handwritten text]

[Faint, illegible text]

FACULTAD DE MEDICINA
Secretaría de Salud
★ MAYO 20 20 ★
Unidad de Servicios Especiales
de Posgrado



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

11234



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FUNDACION HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.
DEPARTAMENTO DE CORNEA

**MICROSCOPIA CONFOCAL EPITELIAL EN
PATOLOGIA CORNEAL.**

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
CIRUJANO OFTALMOLOGO
P R E S E N T A :
DRA. MARTHA PATRICIA CALVILLO RIVERO

ASESORES: DR. OSCAR BACA LOZADA *
DRA. REGINA VELASCO RAMOS**
DRA. LILIANA LOPEZ FERRA**



MEXICO, D.F.

FEBRERO DE 2001.

INDICE.

➤ ANTECEDENTES	2
➤ PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
➤ HIPÓTESIS	7
➤ OBJETIVOS	7
➤ JUSTIFICACIÓN	8
➤ MATERIAL Y METODO	9
➤ RESULTADOS	12
➤ DISCUSIÓN	21
➤ CONCLUSIONES	23
➤ CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	24
➤ BIBLIOGRAFÍA	25

ANTECEDENTES:

El epitelio corneal es de tipo escamoso estratificado, no queratinizado, con una profundidad aproximada de cinco estratos celulares, formado por tres tipos de células: células basales columnares, alares poligonales y superficiales planas. Las células superficiales constan de dos capas.

En el microscopio electrónico se observan células epiteliales planas y fundamentalmente hexagonales unidas entre sí a través de límites celulares rectos. Estas muestran numerosas microproyecciones y presentan un glucocálix fibrilar extenso, o cubierta leucoplaquetaria, en su membrana superficial. Las microproyecciones intensifican la adherencia de la película lagrimal al glucocálix. Existen uniones estrechas alrededor de todos los bordes laterales de cada célula, que ejercen una función de barrera anatómica al paso de sustancias al espacio intercelular.

La capa de células alares tiene una profundidad de tres células, cuanto más superficial esta la célula se ve más plana.

Las células basales situadas, en la profundidad componen la única capa de células columnares que descansa sobre la membrana basal. Estas células están rodeadas en su superficie anterior por núcleos ovals que se disponen perpendicularmente a la superficie. Se trata de células mitóticamente activas, y las células hijas producidas se desplazan anteriormente para transformarse en células alares.

Entre las células basales se encuentran otro tipo de células. Ocasionalmente se observa la presencia de linfocitos, pequeñas células de núcleos oscuros y múltiples prolongaciones dendríticas, periféricamente hay células de Langerhans.



Fig. 1. Esquema de las capas de la córnea.

Las células epiteliales de la córnea están interdigitadas y fuertemente unidas entre sí por numerosos desmosomas. Estas uniones proporcionan estabilidad mecánica a la capa epitelial. Existen uniones gap entre todas las células adyacentes en el epitelio.

Bajo la capa basal de células epiteliales y producida por ellas, se encuentra una lámina basal o membrana basal, tiene un espesor aproximado de 500 Å; la microscopía electrónica permite observar que esta compuesta por una zona clara anterior, la lámina lucida y una zona oscura posterior, la lámina densa. La membrana basal, junto con sus hemidesmosomas y fibrillas de anclaje, participa en la adherencia de las células epiteliales al estroma.(1,2,5), (fig 1.)

La microscopía confocal se basa en el principio que la luz incidente focalizada en un punto pequeño de un plano focal del objetivo del microscopio permite un gradiente de luz axial en el tejido. Esta reducción del área iluminada minimiza la influencia de la luz en la imagen la cual es reflejada por las estructuras

por fuera del plano focal del objetivo. El efecto de minimización es apoyado por la utilización de una apertura a nivel del plano de la imagen. La microscopía confocal se puede utilizar tanto de forma bidimensional como unidimensional.(3).

La microscopia confocal es un paradigma de imagen la cual produce una resolución lateral realzada y mayor contraste de la imagen que la microscopia convencional, y permite seccionar de forma óptica y no invasiva los tejidos vivos en tiempo verdadero.(4)

En 1955 Marvin Minsky desarrollo el primer microscopio confocal para estudiar red neuronal en el cerebro vivo, ya que tanto el condensador como el lente objetivo tienen el mismo punto focal se llamo al microscopio "confocal".

El diseño de este microscopio tiene muchas características importantes para observar el ojo humano en vivo; 1) utiliza niveles subtóxicos de luz blanca, 2) provee imágenes en tiempo verdadero que se pueden detectar por una cámara de video o un monitor, y 3) su habilidad para seccionar provee imágenes de diferentes profundidades con un espécimen pequeño.(4)

Este microscopio tiene un disco de vidrio el cual tiene 64,000 agujeros estenopeicos de 20micras de diámetro cada uno y tiene un total de 25% de transmisión. La velocidad de rotación del disco es de 450 rotaciones por minuto. El parche de luz esta compuesto de prismas y espejos mantenidos alineados. La fuente de luz es una lámpara de mercurio de 100 W, u aumento de X24, 1.6mm de distancia de trabajo.(4,14). Toda la luz que proviene de las capas no enfocadas se corta por la segunda hendidura. Fig 2

- ✓ Una lámpara de halogeno (100 W/12V) ilumina la primera hendidura.
- ✓ Un lente colector y condensador garantiza la iluminación de la primera hendidura.
- ✓ Un tubo de lentes entre el lente frontal y la hendidura proyecta la hendidura en la córnea.

- ✓ La porción reflejada de la luz pasa a través de la segunda mitad del objetivo y es proyectada en la segunda hendidura por un segundo tubo de lentes.
- ✓ La imagen final de la córnea es proyectada en una cámara altamente sensible con un lente acromático.

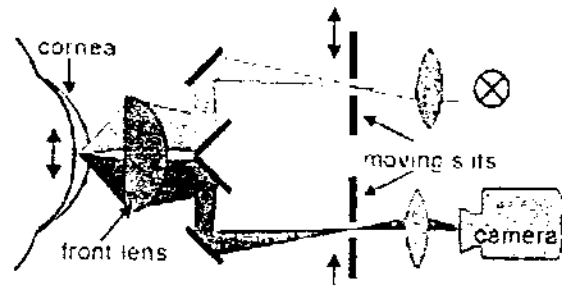


Fig. 2 Funcionamiento del Microscopio. Confocal.

Los bordes de las células de la superficie epitelial se observan como núcleos brillantes. También se observa el plexo nervioso subepitelial por debajo de membrana basal del epitelio; Se han visto que las células basales, las células aladas y el plexo subepitelial, y de estas estructuras se ha observado que las células basales, los nervios epiteliales y elementos celulares no identificados tienen movimiento centripeto.(4,6) (Fig.3)



Fig.3 Microscopia confocal en paciente sano.

Por microscopia confocal se ha podido observar que 6 semanas después de Queratomileusis láser in situ (LASIK) se observa un área de cicatrización a nivel de la zona central de ablación que se evidencia por la reflexión de la luz por la matriz extracelular; También aparece que el plexo subepitelial normal no se ha regenerado en el área ablatida. En los usuarios de lentes de contacto blandos el epitelio aparece anormal, se observa una superficie rugosa, organizada (a cual no puede definirse bien, los núcleos celulares se ven poco, no se puede ver un patrón regular de células esto demuestra que la superficie de células epiteliales ha sido removida por la abrasión.(4)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Debido a que el epitelio es una barrera de la córnea y es el primero en afectarse en diversas patologías, se intentó conocer las alteraciones a nivel celular por medio de la microscopia confocal epitelial, tratando de establecer un patrón de cambio celular para posteriormente poder implementar un tratamiento o conocer mejor el comportamiento del epitelio corneal.

HIPOTESIS.

Las células del epitelio corneal se afectan ya sea en su estructura o en su disposición en respuesta a las diferentes patologías que lo afectan directa o indirectamente, por lo que la microscopia confocal epitelial nos ayudara a establecer o determinar estos diferentes patrones de acuerdo a la patología.

Hipótesis falsa:

Las células epiteliales no alteran su estructura o disposición por las diferentes patologías que lo afecten , por lo tanto la microscopia confocal epitelial no nos seria útil para determinar un patrón de cambio en estas.

OBJETIVOS:

El objetivo de este estudio fue determinar si existe un patrón de cambio en la disposición o estructura de las células epiteliales de acuerdo a las diferentes patologías que lo afectan directa o indirectamente, y saber si se puede determinar este por medio de la microscopia confocal epitelial.

Conocer la eficacia de la microscopia confocal epitelial para la determinación de estos patrones.

JUSTIFICACION:

Ya que se estudiarán pacientes con diferentes patologías que afectan el epitelio corneal se pudo establecer un patrón de cambio en la estructura o disposición de las células epiteliales en respuesta a estas patologías, por medio de la microscopia confocal epitelial, además de que existen pocos reportes en la literatura de esta técnica podremos conocer la eficacia de la misma.

TIPO DE ESTUDIO: prospectivo, transversal, observacional, descriptivo.

MATERIAL Y METODO:

Previo consentimiento informado de los pacientes que ingresen al FHNSL de Marzo a Septiembre 2000, o que ya sean pacientes del departamento de córnea de dicha institución y que cumplan con los criterios de inclusión se les realizara historia clínica y exploración oftalmológica completa así como microscopía confocal epitelial.

Se le explicó al paciente el estudio, se le colocaron gotas de anestesia tópica (tetracaína sol oftálmica), se sentó comodamente enfrente del microscopio confocal, se le pidió que colocará su barba en la mentonera y se acomodó la mesa y la mentonera de modo que quede en buena posición para el exámen y comodo el paciente, se colocó una gota del tamaño de un guisante sobre el lente frontal comenzando desde la parte superior hasta que cubra completamente el lente con gel (viscotears de CIBA Vision), esta técnica es llamada DIP (principio de inmersión en distancia) por lo que el lente frontal debe ser cubierto completamente por el gel. Fig 4.

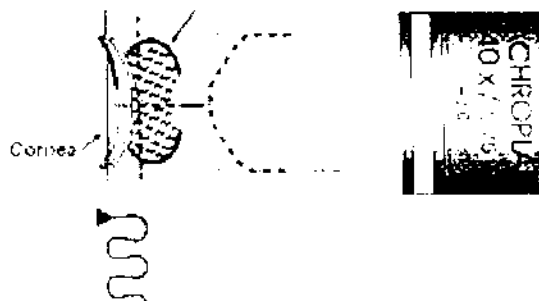


Fig. 4 Movimiento ondulante de lente frontal

Se colocaron en la pantalla los datos del paciente y se pasó a la pantalla para realizar un nuevo estudio, el microscopio se ajusta para que solo revise a una

profundidad de 240 micras con 10 tomas; con el joystick se mueve hacia delante el microscopio de modo de alinearlo con el ojo del paciente, debe quedar la gota de gel sobre el eje pupilar del paciente y completamente centrada, en este momento se comenzará a ver una imagen blanca brillante en la pantalla y se enfocará el microscopio con movimientos pequeños hacia arriba-abajo, derecha e izquierda hasta que se vean las células, una vez obtenida la imagen se graba la misma, y se procede a repetir el mismo procedimiento con el otro ojo.

Una vez tomadas las microscopias se analizan de forma morfológica, y cuantitativa las células en su densidad celular y su área en una región de interés (ROI), y se cuentan de forma manual las células comprendidas en esta región de interés (ROI). Una vez obtenidos estos datos se vaciaran en la hoja de recolección de datos por paciente y a la general, para así poder analizar los datos obtenidos realizar tablas y gráficas de los mismos.

CRITERIOS DE INCLUSION:

Se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de queratocono, usuarios de lentes de contacto, y diabéticos.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

Todos aquellos pacientes que tuvieran alguna infección ocular activa, que no dieran su consentimiento informado, y que no cooperen con el estudio.

RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES:

Microscopio confocal Confoscan 2 (Fortune Technologies)

Tetracaína sol oftálmica.

Hojas de recolección de datos.

Videocassett para grabar los estudios.

ANALISIS ESTADISTICO:

Se analizarón los resultados por medio de pruebas estadísticas para determinar su validez.

PRINCIPIOS ETICOS:

De acuerdo con la Declaración de Helsinki para la investigación biomédica en seres humanos, este estudio cumple con todos los principios éticos en ella señalada, y se cumplieron completamente durante la realización del mismo.

RESULTADOS:

Se realizaron microscopías confocales epiteliales a 41 pacientes (82 ojos), se excluyeron 12 microscopías que no salieron bien por falta de cooperación de los pacientes.

11 pacientes fueron diabéticos, 12 con queratocono y 6 usuarios de lentes de contacto.(fig.5)

El promedio de edad fue de 41.4 años, siendo 15 femeninos y 14 masculinos, con un promedio de número de células por mm² fue de 1988.68 células en los diabéticos, 1479.89 en los pacientes con queratocono y de 2716.06 céls/mm² en los usuarios de lentes de contacto. (fig. 6)

En los pacientes con diabetes mellitus no se encontró diferencia en la morfología celular, se ven las células claras, intermedias y oscuras que coincide con las descritas por Tsubota en la microscopia especular epitelial. (fig. 7, 8).

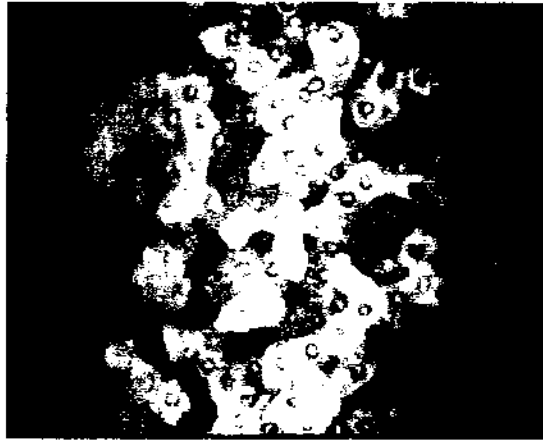


Fig 7. Microscopia confocal en paciente diabético.

PACIENTES POR PATOLOGIA

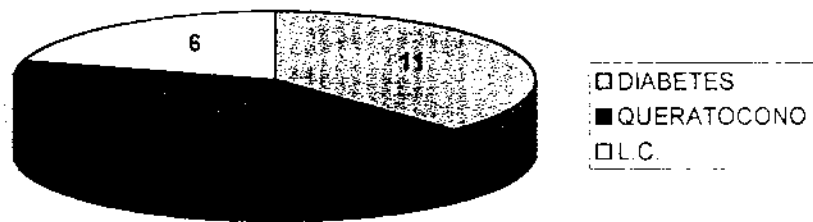


Fig. 5 Pacientes por patología

DENSIDAD CELULAR POR PATOLOGÍAS.

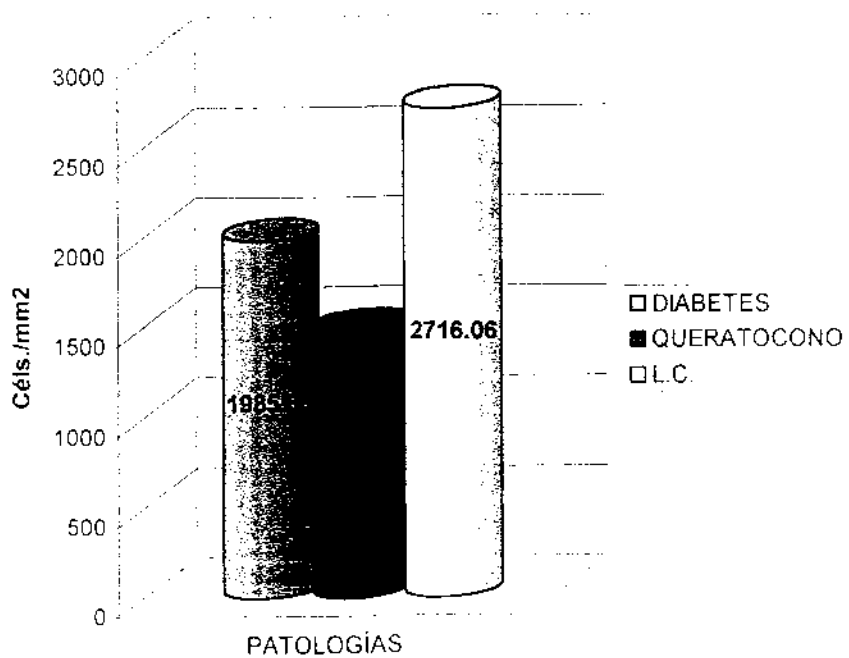
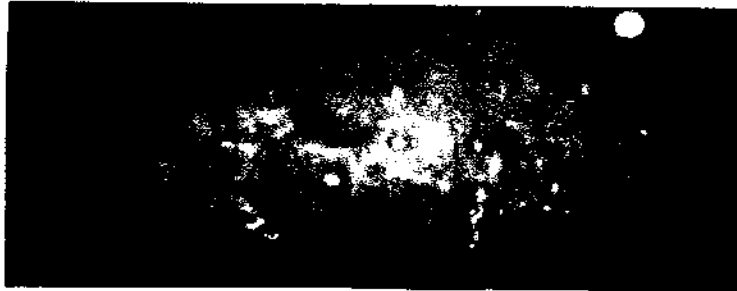


Fig. 6 Gráfica Densidad celular por patologías.



Fig. 8. Microscopía confocal en paciente diabético

En los pacientes con queratocono en donde se encontraron células poco deformadas en su estructura, con núcleos brillantes, las imágenes en estos pacientes dependen de lo avanzado de la enfermedad (fig 9, 10, 11).



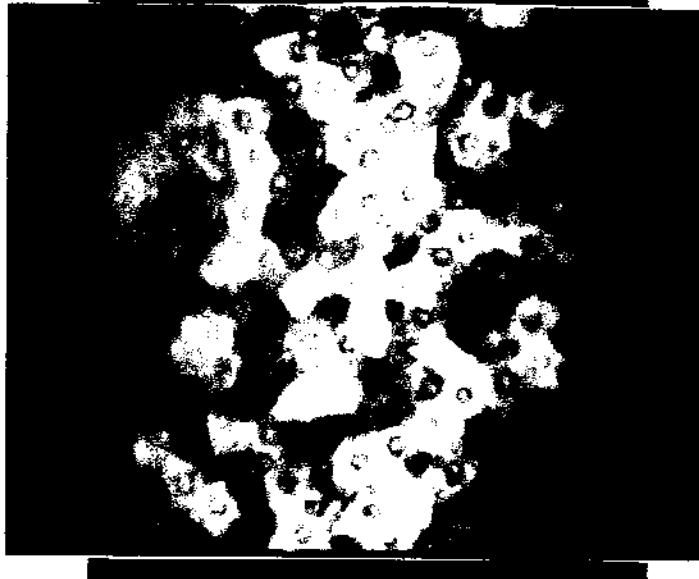


Fig. 10. Algunas células triangulares, y detritus.

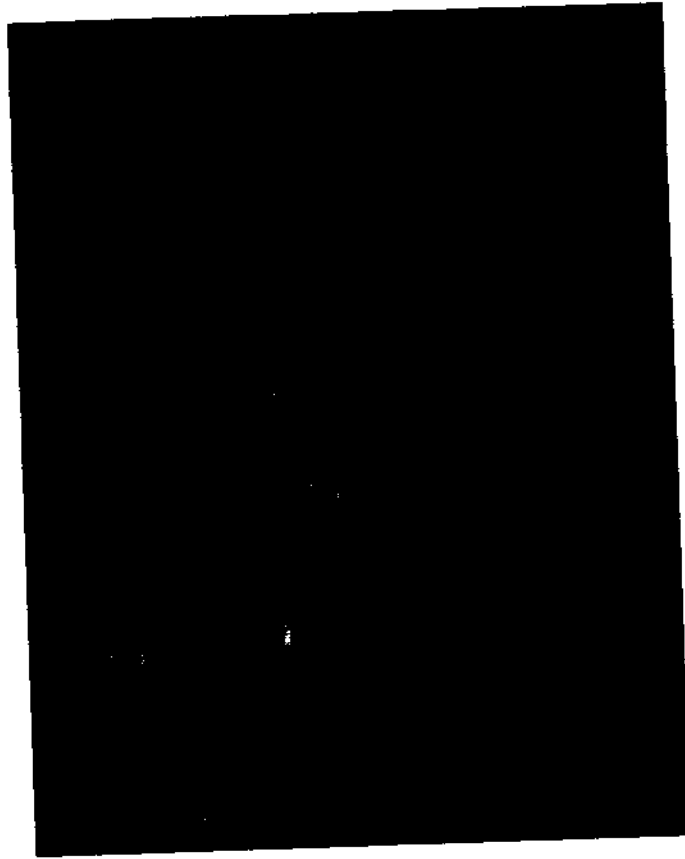


Fig. 11 Membrana basal en queratocono

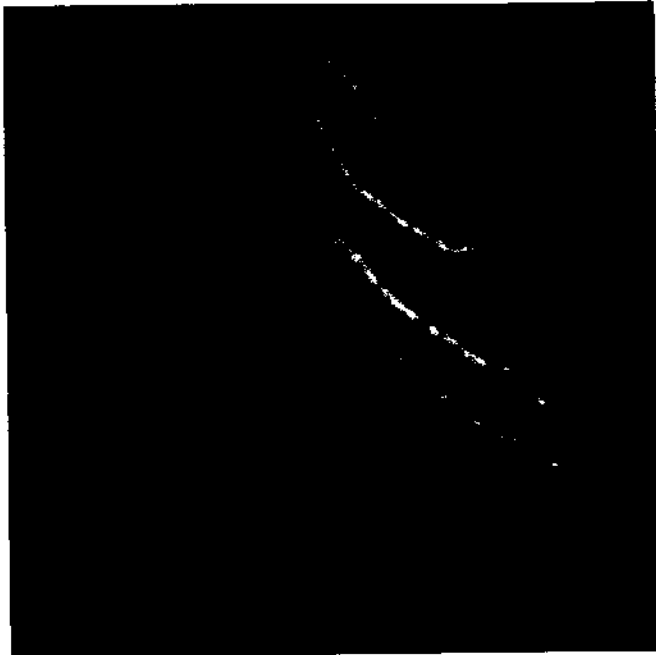
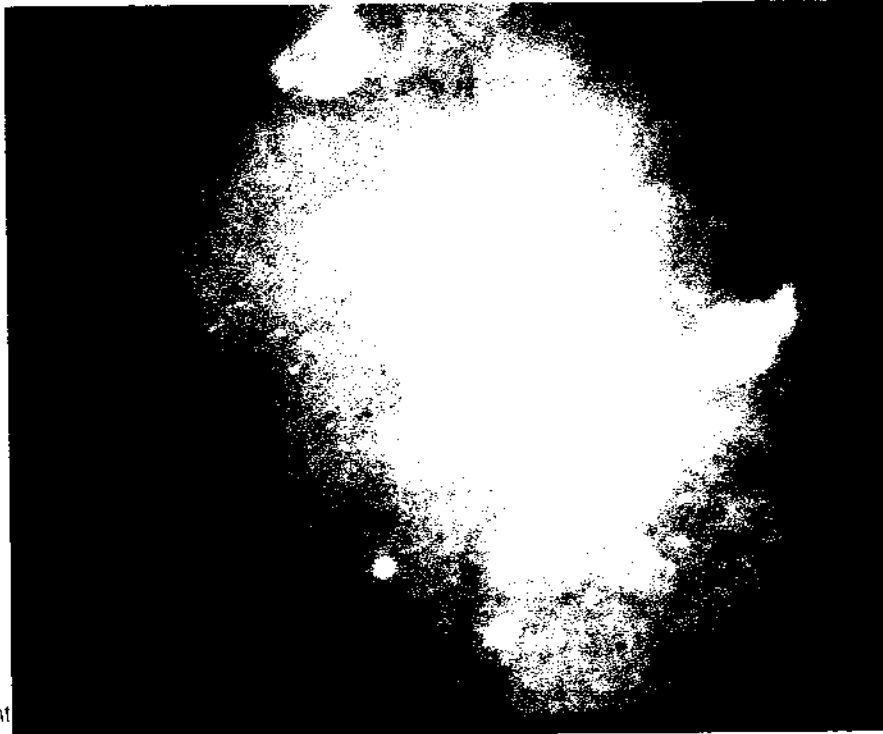


Fig. 12 Nervios corneales en queratocono

En los pacientes usuarios de lentes de contacto se encontraron cambios importantes como alteraciones en la morfología perdiendo su estructura poligonal y con múltiples cuerpos brillantes, así como un aumento en las células superficiales que se observan más brillantes (fig 13). En esta figura observamos las células más grandes sin estructura poligonal y se observan algunas células claras y oscuras, siendo las mas brillantes las más superficiales a punto de descamarse. Fig 14,15.



cont

Fig 13. Microscopía confocal en pacientes usuarios de lentes de contacto

DESA...
...
...

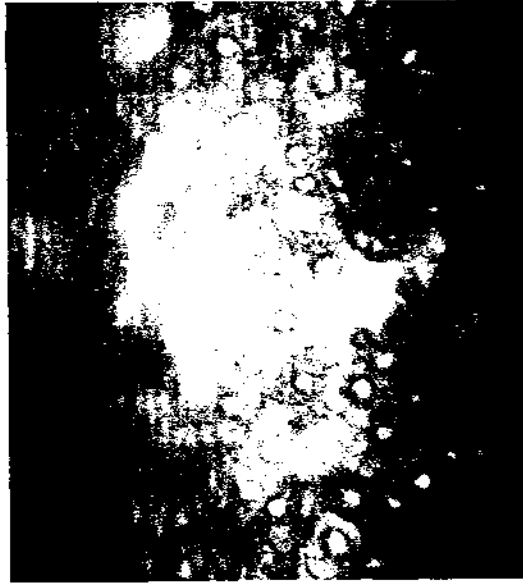


Fig. 14 Cuerpos brillantes en usuario de lentes de contacto.

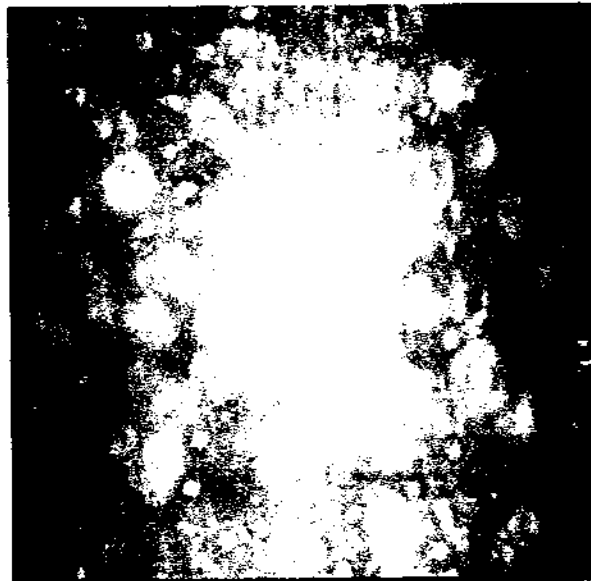


Fig. 15 Células brillantes superficiales.

DISCUSIÓN:

Con este tipo de microscopia confocal se puede observar el tejido en vivo y así poder ver todas las capas de la córnea, aunque en este trabajo solo se observó el epitelio corneal para poder determinar si existen diferencias o cambios significativos entre tres patologías como lo son la diabetes, el queratocono y los usuarios de lentes de contacto.

Con los resultados obtenidos vemos que el grupo de lentes de contacto no fue significativo para poderlo comparar con los otros dos grupos, de los cuales observamos que no hubo diferencia importante en el número de células de cada grupo, más sin embargo existe una diferencia importante al analizar la densidad celular donde podemos observar que los pacientes con queratocono tienen una menor densidad celular que los pacientes diabéticos.

Lo mismo ocurre al observar los cambios en el área celular y se ve que los pacientes con queratocono tienen menos área celular que los diabéticos. Estos cambios se pueden deber a los cambios degenerativos de la córnea con el queratocono, lo que no ocurre con los diabéticos.

En cuanto a la morfología se encontraron cambios significativos en los usuarios de lentes de contacto, no así en los otros grupos, estos cambios morfológicos encontrados corresponden a lo descrito en la literatura revisada. No se encontraron diferencias en cuanto al número de células, pero sí en cuanto a la densidad teniendo mayor densidad los pacientes usuarios de lentes de contacto.

Todos los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los descritos en la literatura, sobre todo aquellos descritos en cuanto a la morfología celular en el queratocono aunque no encontramos todos los cambios descrito creemos que esto depende de lo avanzado que se encuentre la enfermedad; lo mismo ocurrió en los pacientes usuarios de lentes de contacto, sin embargo no se encontrarón reportes de los cambios de los pacientes diabéticos. (7,10,11,12,13)

CONCLUSIONES:

Este es un buen método diagnóstico, fácil, rápido y no molesto para el paciente, en el que podemos ver las células con mayor definición y más detalles de las mismas si la comparamos con la microscopia especular epitelial.

En este estudio se demostró que existen cambios significativos en la morfología celular en las diferentes patologías estudiadas, y se requieren de mayores estudios en este mismo campo para poder determinar patrones de cambios morfológicos de acuerdo con la patología.

Así mismo se demostró la utilidad de esta técnica para la observación de las células epiteliales y el poder identificarlas de acuerdo a la profundidad a la que se observen, y correlacionarlas con lo descrito.

Se debería de seguir utilizando esta técnica para el mejor conocimiento de las células corneales, para identificar y establecer patrones de cambio en cuanto a su morfología.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE.

El procedimiento al que voy a ser sometido en la Fundación Hospital Oftalmológico Nuestra Señora de la Luz, IAP es un procedimiento diagnóstico por medio del cual se evaluará la forma celular de mi epitelio corneal, y se verá si estas células se encuentran dañadas de alguna forma por la patología que padezco.

La microscopia confocal epitelial es un procedimiento diagnóstico no invasivo, el cual se realiza con la instilación de anestesia tópica (tetracaína sol oftálmica), y se hace el estudio con un microscopio confocal. El procedimiento no lleva más de 20 minutos aproximadamente para su completa realización y una buena toma de todo el epitelio corneal. No requiriendo ningún cuidado posterior al mismo y terminado el mismo se podrá seguir con los trámites que requiera ya sea para una cirugía o podré seguir con mi tratamiento, este estudio no interfiere de ninguna manera con el tratamiento que estoy recibiendo actualmente o con la cirugía que me hallan realizado, es solamente una forma complementaria al estudio completo de mi padecimiento.

Por lo tanto acepto de forma voluntaria realizarme este estudio y me doy por enterado del mismo así como de su procedimiento y de que no tiene consecuencia alguna y que no interfiere o altera el resultado de mi cirugía (en caso de haber sido operado o de estar bajo algún tratamiento).

FIRMA Y NOMBRE DEL PACIENTE.

BIBLIOGRAFIA:

1. GRAYSON, ENFERMEDADES DE LA CORNEA. 2ª. Edición, Editorial Panamericana Brasil 1985, pp 1-24.
2. Laing,R.A.; Oak,S.S.; Leibowitz,H.M. Specialized microscopy of the cornea Specular Microscopy en Leibowitz,H.M. and Waring,G.O. Corneal Disorders Clinical diagnosis and managment. 2ª edición W.B Saunders company USA 1998. Pp 83-89.
3. Wiegand,W.; Thaer,A.A.; Kroll,P.; Geyer,O.; García,A. Optical Sectioning of the cornea with a new confocal in vivo slit-scanning Videomicroscope. *Ophtalmology* 1995;102:568-575.
4. Cavanagh,D.; Petroll,M.; Alizadeh,H.; Guang he,Y.; McCulley,J.; Jester,J. Clinical and diagnostic use of in vivo vonfocal microscopy in patients with corneal disease.*Ophtalmology* 1993;100:1444-1454
5. Lohman,L.E.; Rao,G.N.; Aquavella,J.V. Normal Human Corneal Epithelium In vivo Microscopic Observations. *Arch Ophtalmol* 1982;100:991-993.
6. Auran,J.; Hoester,Ch.; Kleiman,N.; Rapaport,R.; Bomann,S.; Wirotsko,B.; Florakis,G.; Koniarek,J. Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophtalmology* 1995;102:33-41

7. Lohman,L.E.; Rao.G.N.; Aquavella,J.V. In vivo microscopic observations of human corneal epithelial abnormalities. AMJO 1982; 93:210-217.
8. Lemp,M.A.; Gold,J.B.; Wong,S.; Mahmood,M.; Guimaraes,R. AMJO 1984; 98:426-428.
9. Mathers,W.D.; Sachdev,M.S.; Petroll,M.; Lemp, M.A. Morphologic effects of contact lens wear on the corneal surface. CLAO J. 1992 Jan;18 (1): 49-52. ABS.
10. Tsubota,K.; Toda,I.; Fujishima,H.; Yamada, M.; Sugawara,T. Extended wear soft contact lenses induce corneal epithelial changes. Br J Ophthalmol 1994 Dec; 78(12): 907-11 Abs.
11. Tsubota,K.; Mashima,Y.; Murata,H.; Sato,N.; Ogata, T. Corneal epithelium in keratoconus. Cornea 1995 Jan; 14(1):77-83.Abs.
12. Tseng,S.H.; Yu,C.H.; Wang,S.T. Morphometric análisis of corneal epithelium in normal subjects and soft contact lens wearers. J Formos Med Assoc 1995 Jun; 94 suppl 1:S 20-5 Abs.
13. Lemp,M.A.; Gold,J.B. The effects of extended-wear hidrophilic contact lenses on the human corneal epithelium AMJO March,1986; 101:274-277.
14. Cho,B.; Gross,S.; Pfister,D.; Holland,E. In vivo confocal microscopic analysis of corneal allograft rejection in rabbits. Cornea 1998; 17(4): 417-422