

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P.

DEPARTAMENTO DE RETINA Y VÍTREO

**EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LAS PROLIFERACIONES VITREORETINIANAS EN
PACIENTES CON RETINOPATÍA DIABÉTICA PROLIFERATIVA TRATADOS CON
BEVACIZUMAB (AVASTIN®).**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
CIRUJANO OFTALMÓLOGO**

PRESENTA:

DR. MANUEL RIVERA PÉREZ

ASESORES:

Dr. Arthur Levine Beribichez

Dr. Benito Celis Suazo

Dr. Abel Ramírez Estudillo

MÉXICO. D.F.

FEBRERO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos.

A ti Señor, por el gran regalo de la vida y acompañarme en mi vivir diario. Mil gracias Señor y amigo.

A mis padres por haberme regalado la alegría de vivir y por su amor incondicional para conmigo y mis proyectos, por todos esos momentos que solo Chuy sabe cuánto han luchado para brindarme una oportunidad de estudiar, en mi corazón los llevo y en mi viven y vivirán siempre, los amo.

A mis hermanos, que con sus palabras y enseñanzas y con su compañía la vida es mucho mejor, los quiero y amo mucho.

A mi Esposa Erika amor de mi vida, que siempre estás conmigo, te amo! Gracias por coincidir, en tantos mundos y espacios.

A todos mis amigos de especialidad y subespecialidad, todos ellos fueron mi familia, los quiero y aprecio mucho, sigamos juntos siempre!

A todos mis Maestros, agradezco su paciencia, dedicación, su entrega desinteresada, consejos y ejemplo que atesoro, Dios los colme de bendiciones a todos ustedes y sus familias.

A mis Asesores: Dr. Abel Ramírez Estudillo, Dr. Arthur Levine Berebichez, Dr. Benito Celis Suazo, Dr. Leonardo Villalvazo Cordero; por su apoyo y orientación para la elaboración de esta tesis.

Dra. Gloriaalicia Campomanes, su gran corazón y entrega estimula siempre a dar lo mejor. Dios la bendiga y cuide siempre.

Índice.

Agradecimientos.....	2
Introducción.....	4
Objetivo.....	8
Material y métodos.....	9
Resultados.....	12
Discusión.....	13
Conclusión.....	15
Bibliografía.....	16
Ilustraciones.....	18

Introducción.

En la retinopatía diabética proliferativa, se cree que el crecimiento de nuevos vasos de la retina o nervio óptico se presenta en respuesta al factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) liberado por la isquemia hacia la cavidad vítrea ⁽¹⁾. La isquemia ocurre debido a que la diabetes causa oclusión microvascular en el ojo lo que conduce a una hipoperfusión local. La retina isquemica secreta FCEV, que a la vez éste conduce a un número de eventos relacionados en el ojo. El FCEV induce fuga vascular y niveles elevados de este factor producen edema macular ^(2, 3). Los niveles elevados del FCEV también pueden contribuir a la formación de nuevos vasos a nivel del plano de la retina que por definición es la Retinopatía Diabética Proliferativa, sin embargo no es el único factor ^(1, 2).

El FCEV tiene también una propiedad interesante que consiste en la formación de telangiectasias, microaneurismas y causar oclusión microvascular; todos ellos característicos de la retinopatía diabética. La oclusión microvascular puede conducir a una isquemia importante formando así un círculo vicioso

Los vasos de nueva formación son acompañados de tejido fibrogliol, el cual junto con el vítreo, pueden contraerse y ocasionar una hemorragia por la misma tracción de los vasos.

La panfotocoagulación láser es la terapia principal para la retinopatía diabética que amenaza la visión, amenos que el paciente tenga una hemorragia vítrea extensa que impida aplicar el láser; por lo tanto una de las principales complicaciones de la RDP consiste en bloquear su propio tratamiento ^(1,4).

La hemorragia vítrea como complicación de la RDP, es manejada en base a dos opciones: Observación esperando que a sangre se reabsorba lo suficiente para

poder aplicar la panfotocoagulación, ó la intervención quirúrgica para remover la sangre y el tejido fibrovascular y al mismo tiempo realizar la PFC; sin embargo existe una tercera opción puede ser la inhibición del FCEV. Actualmente se encuentra disponible un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra el FCEV (bevacizumab, Avastin, Genetech) para la terapia del cáncer ^(4,5).

La retinopatía diabética proliferativa (RDP), la vitreoretinopatía proliferativa (VRP), y la membrana epirretiniana (MER); son patologías intraoculares que se caracterizan por migración, adhesión, y proliferación celulares que conllevan a la formación de membranas prerretinianas traccionales. Mediante la utilización de la microscopía electrónica, estas membranas aparecen como láminas de tejido conjuntivo bien desarrollado en el cual se pueden observar varios tipos celular: a) células diferenciadas tales como las del epitelio pigmentado de la retina, astrocitos fibrosos, fibrocitos, células de origen plasmático, así como las células endoteliales y pericitos de los capilares de neoformación de membranas de la RDP; b) células indiferenciadas con aspecto semejante a fibroblastos o miofibroblastos ; y c) células similares a macrófagos^(6, 7).

La composición celular de estas estructuras ha sido evaluada mediante microscopía electrónica donde se reporta lo siguiente:

Características ultraestructurales en membranas prerretinianas

	AF	EPR	FIB	M	Mi	MLI	CAP	CP
RDP (n = 4)	Todos	2(50)	Todos	Todos	2(50)	Ninguno	Todos	3(75)
MER (n = 6)	5(83)	4(67)	3(50)	2(33)	5(83)	4(67)	Ninguno	1(17)
VRP (n = 12)	6(50)*	10(83)	8(67)	6(50)	Todos	2(17)	1(8)	2(17)

AF, astrocito fibroso; EPR, células del epitelio pigmentario de la retina; FIB, fibroblastos; M, macrófagos; Mi, miofibroblastos; MLI, membrana limitante interna; CAP, capilares; CP, células plasmáticas. VRP, vítreo retinopatía proliferativa; MER, membrana epirretiniana; RDP, retinopatía diabética proliferativa.

* n (%)

Estos hallazgos indican que las células pueden derivar de diversas fuentes intraoculares y una fracción celular específica en las membranas puede estar relacionada con el desarrollo de las manifestaciones patológicas que determinan las características clínicas observadas en cada entidad.

Aunque estudios de membranas prerretinianas después de que éstas se han contraído representan una fuente limitada de información para entender los mecanismos de diferenciación y remodelación de la superficie retiniana, estos datos encontrados en el estudio de Casaroli-Marano Ricardo y col.⁽⁶⁾, sugieren que el evento inicial ante un daño al tejido intraocular es la proliferación celular, seguido por la diferenciación con la síntesis y secreción de la matriz de tejido conectivo.

Los capilares de neoformación en las membranas por RDP muestran características singulares: a) células endoteliales unidas mediante uniones estrechas; b) fenestraciones que se comunican por diafragmas; c) membranas basales estratificadas y procesos de los pericitos que los rodean. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios reportados³.

^{4,33} aunque los capilares fenestrados no son una característica de todas las membranas prerretinianas. La función de las fenestraciones en condiciones patológicas es desconocida, pero puede estar relacionada con los estados de permeabilidad elevados observados tanto en condiciones no patológicas y de reparación. Más sin embargo, el aumento en la permeabilidad está reforzado por el sangrado intraocular observado frecuentemente en la evolución clínica de la

enfermedad; esto puede explicar los elementos plasmáticos frecuentemente observados en la matriz ^(6, 7).

Las membranas por RDP se caracterizan por una baja relación célula/matriz y presentan una bien desarrollada y estabilizada matriz de colágeno. Éste tejido fibrogliovascular es reconocido por ejercer fuerzas traccionales leves sobre la retina subyacente ⁽⁸⁾, similar al tejido post-contráido en la reparación heridas; por estas razones se piensa que la neovascularización que se observa en las membranas por RDP contribuye a la organización temprana de la matriz extracelular, y la presencia de los capilares fenestrados y el sangrado, permiten el acceso de células y sustancias de origen plasmático. Sin embargo también se observa un rápido crecimiento de la matriz en estadios iniciales, seguido por la organización del colágeno con el mantenimiento funcional del tejido fibrogliovascular.

Información obtenida por microscopía electrónica ha demostrado que el colágeno representa el mayor componente estructural de la matriz extracelular; su disposición compacta en fibrillas paralelas sugiere un evento de maduración en el material de matriz.

Éste componente de colágeno, secretado por células, tiene un papel estructural fundamental, no solo en estabilizar el esqueleto sino también en proporcionar una fuerza tensional ^(6, 8).

Objetivo.

Evaluar mediante microscopía de luz, los cambios histológicos de las proliferaciones fibrogliovasculares de pacientes con RDP avanzada a quienes se les aplicó bevacizumab (Avastin®) intravítreo, comparado con un grupo control.

Material y Métodos.

Se realizó un estudio prospectivo, transversal, descriptivo, comparativo y observacional, en el periodo de Marzo a Octubre de 2006, para la realización del estudio se tomaron en cuenta los siguientes criterios.

Criterios de inclusión.

- Pacientes con retinopatía diabética proliferativa avanzada, de acuerdo a la clasificación del DCCT con o sin aplicación de bevacizumab intravítreo.
- Periodo postaplicación de panfotocoagulación ≥ 3 meses.
- Periodo postaplicación de Avastin de ≥ 1 semana.
- Pacientes que se sometieron a vitrectomía pars plana con retiro de la proliferación fibrovascular.

Criterios de no inclusión:

- Pacientes con patología ocular asociada (glaucoma neovascular).
- Ojo único.

Criterios de Eliminación:

- Muestra insuficiente.
- Todos aquellos pacientes que no cumplieron los criterios de inclusión.

Se integraron para el estudio dos grupos:

Grupo 1

Grupo control: pacientes con RDP avanzada, operados de vitrectomía vía pars plana y retiro de la membrana, sin la aplicación previa del fármaco.

Grupo 2

Pacientes con RDP avanzada en quienes se les aplicó bevacizumab intravítreo y se sometieron a vitrectomía vía pars plana con retiro de la membrana.

De cada paciente se obtuvieron ciertos datos generales, como edad, sexo, y periodo aplicación-cirugía en el caso del grupo 2.

Todos los pacientes se sometieron a vitrectomía parsplana 3 puertos y mediante técnica de delaminación se obtuvo una mayor porción de tejido, las proliferaciones vítreoretinianas a través de una de las esclerotomías; posteriormente se fijaron con formol al 10% y glutaraldehído a una concentración de 3 %, se llevó a cabo su procesamiento por el departamento de patología de nuestra institución mediante técnica histológica habitual y mediante microscopía de luz se llevó a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de la muestra con los objetivos 10, y 40 X respectivamente.

Se tomó aleatoriamente un fragmento del tejido teniendo en cuenta un tamaño equiparable para todas las muestras y de esa forma evitar sesgos. Los datos que se buscaron en cada una de las muestras se llevaron a cabo teniendo presente los hallazgos que previamente se han descrito de estas proliferaciones por Casarol-Marano y col. ⁽⁶⁾

Análisis estadístico.

Se utilizó estadística descriptiva para variables como edad, sexo, número de pacientes y periodo aplicación-cirugía; se aplicó estadística inferencial con la prueba de T para dos muestras suponiendo varianzas iguales, del paquete estadístico Microsoft Excel 2003® al comparar las variables numéricas.

Resultados.

Se incluyeron un total de 14 muestras de 14 ojos, (7 para el grupo 1 y 7 para el grupo 2), se eliminaron dos muestras por mal procesamiento de la muestra en el grupo 1, por lo que en la tabla no. 1 se describen la conformación de los grupos y las características generales de los pacientes.

Los hallazgos histológicos para ambos grupos se presentan en la tabla no.2.

Se observó que la cantidad de fibroblastos, fue semejante en ambos grupos, así como lo fue la presencia de células del epitelio pigmentario de la retina, y células inflamatorias. Se observó una mayor cantidad de fibroblastos en el grupo 2 y por el contrario un número mayor de macrófagos en el grupo 1. En ambos grupos no se identificó la presencia de membrana limitante interna, y de forma relevante la cantidad de capilares fue mayor en el grupo 1 (Fig. no. 1), duplicando al número de capilares encontrado en el grupo 2 (Fig. no. 2), sin ser estadísticamente significativo ($p=0.16$).

Discusión.

La retinopatía diabética, ocupa un gran número de la consulta de los servicios de Retina de las instituciones oftalmológicas del país, de ahí su relevancia.

Las proliferaciones tanto fibrovasculares que caracterizan a la retinopatía diabética proliferativa, y las membranas epirretinianas de otras entidades como la vitreorretinopatía proliferativa y Membrana epirretiniana han sido analizadas con detalle, remarcando diferencias importantes de las primeras respecto a las otras, principalmente en la cantidad de capilares, ausencia de membrana limitante interna, y presencia de fibroblastos; teniendo presente lo anterior, se desarrolló este estudio con la inquietud de valorar específicamente las proliferaciones por RDP, en quienes se les aplicó un antiangiogénico (bevacizumab), valorar que cambios se encontraban respecto al grupo control, apoyado en el conocimiento previo de la estructura que caracteriza a estas proliferaciones, se logró obtener información y traducir de manera histológica, lo que clínicamente se observa con la regresión de la Neovascularización.

Observamos que si bien los capilares disminuyen en número, no desaparecen por completo, pues se encontró capilares en involución y otros con sus características habituales en el grupo 2 (Fig. 2). Encontramos que este medicamento tuvo efecto principalmente en la composición vascular de la membrana sin embargo, en la composición celular no logramos demostrar diferencias en ambos grupos; sin embargo la experiencia de profesores de Retina de nuestra institución (experiencia no reportada), encuentran que pacientes en quienes se les aplica el medicamento, presentan mayor fibrosis de estos tejidos, pues éstos son mas difícil de diseccionar y retirar, comparado con los que nos se les aplica el medicamento; por lo que es

válido pensar que el espacio que deja la involución del vaso sea sustituido por tejido de reparación lo cual aumentaría la fuerza tensil del tejido sin embargo no logramos demostrarlo; es necesario emplear otro tipo de auxiliares de investigación para lograr dicho objetivo.

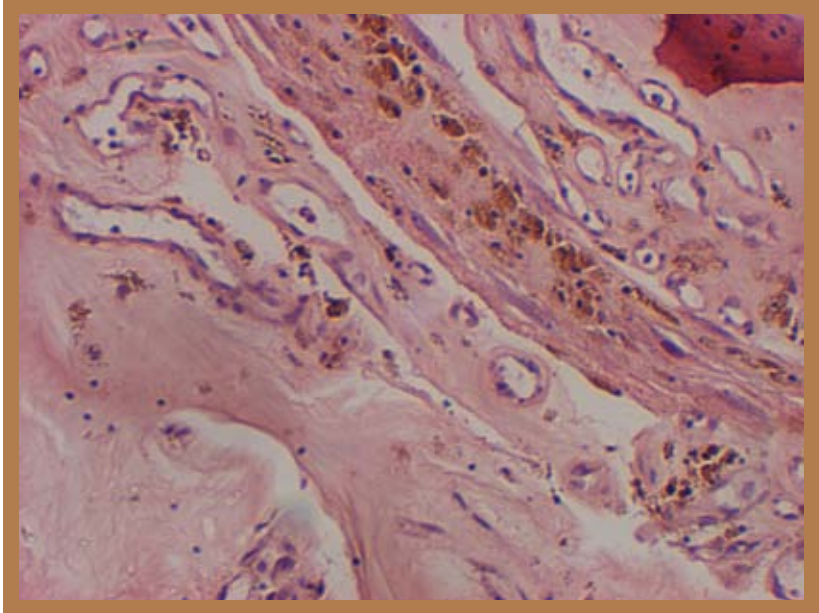
Conclusión.

El bevacizumab intravítreo redujo la cantidad de capilares de las proliferaciones fibrovasculares de pacientes con RDP, sin embargo éstos no desaparecen por completo.

Es posible que el bevacizumab modifique la composición celular y estructural del tejido de sostén de estas proliferaciones.

Ilustraciones.

Fig. no. 1 a)



b)

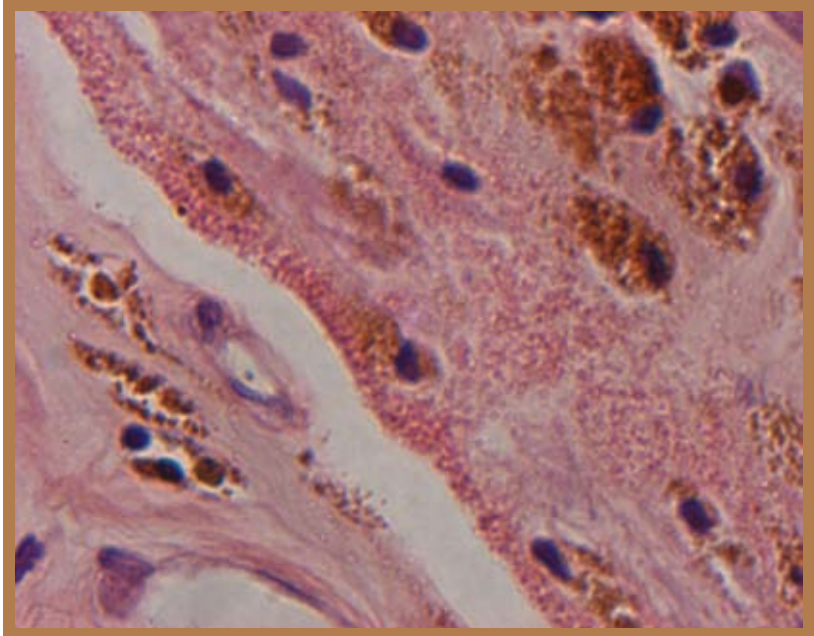
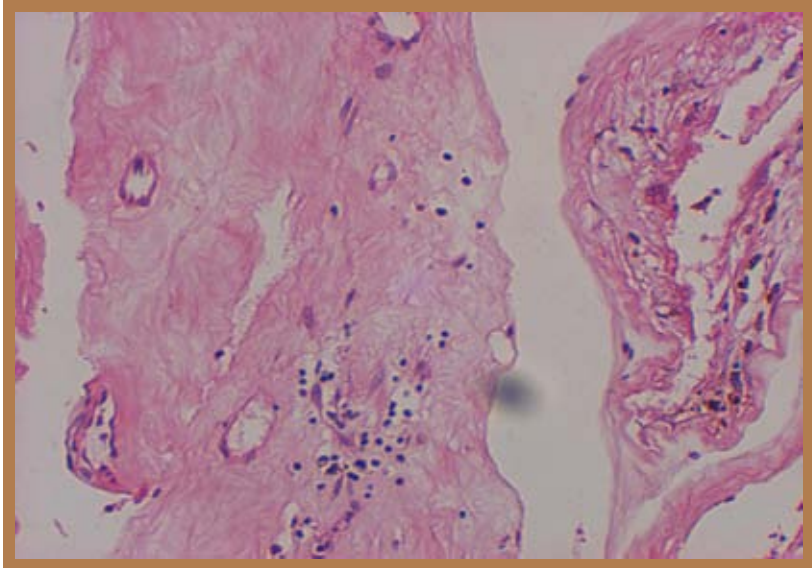
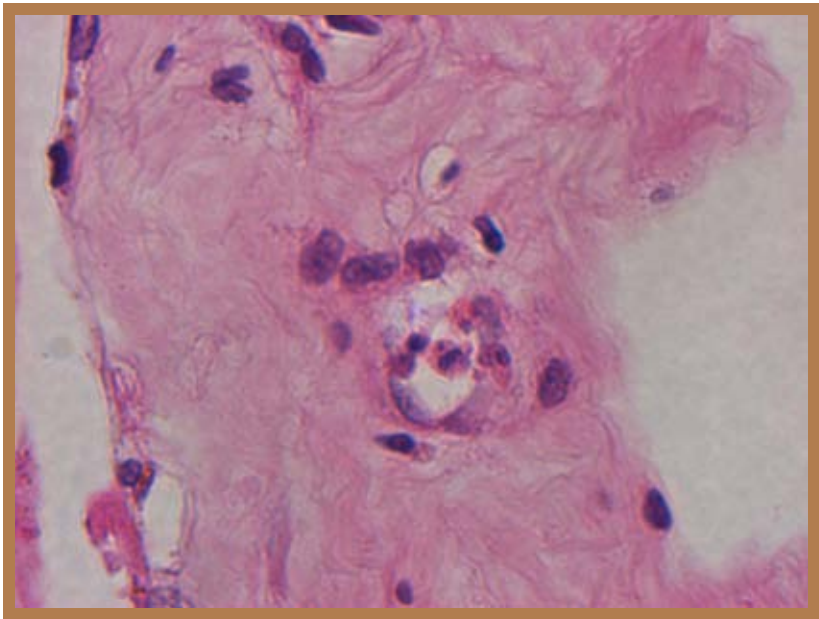


Fig. no. 2

a)



b)



Pie de ilustración.

Fig. no. 1

a) Magnificación 10 X, Paciente del grupo 1 sin tratamiento previo.

H-E, se observa la gran cantidad de tejido fibroso asociado con una numerosa cantidad de capilares y macrófagos cargados de pigmento.

b) Magnificación 40 x. misma foto con mayor magnificación donde se observa, lumen vascular, pared del vaso rodeada con un gran número de macrófagos con pigmento.

Fig. no. 2.

a) Magnificación 10X. Paciente del grupo 2, previa aplicación de bevacizumab, se aprecia una disminución el número de vasos, persistencia de algunos, y en estado involutivo otros, aumento de la matriz extracelular.

b) Magnificación 40X, paciente del grupo 2, aplicación del fármaco. Se observa persistencia de algunos lúmenes vasculares, la mayoría en estado involutivo y, el vaso central con numerosas células inflamatorias y en proceso de involución.

Tablas y Gráficos.

Tabla no. 1 Datos generales		
	Grupo 1	Grupo 2
Pacientes (n)	7	5
Edad (a)	53.1	51.6
Sexo	Femenino (n = 6) 86 %	Femenino (n = 4) 80%
Aplicación-Qx (días)	43	No aplicación

Tabla no. 2 Hallazgos histológicos para ambos grupos

	Astrocitos Fibrosos	Células del EPR	Fibroblastos	Macrófagos	Células mioepiteliales	MLI	Capilares	Células inflamatorias	Relac C/M	Medida del tejido (mm2)
Grupo 1 (n = 5)	++	+	+	++	+	Ausente	38.2 ¶	Linfocito Eosinofilos	01:04	2.7x1.8
Grupo 2 (n = 7)	++	+	++	+	+	Ausente	16.42 ¶	Linfocitos	01:04	2.4x1.8

¶ p=0.16 al comparar no. Capilares

C/M: Célula/Matriz, EPR, epitelio pigmentario de la retina.

+ equivale a escasos, ++ moderados, +++ abundantes

Bibliografía.

1. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative, diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 445-450.
2. Fankhauser Franz, Kwasniewska Sylwia, Van Der Zypen, Niederer Peter.: Pathogenesis of Diabetic Retinopathy and iridopathy-The Biochemical Basis of Microvascular Disease. *An. Inst. Barraquer, (Barc)* 2005; 34(1-2): 99-7126.
3. Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, et al, Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetología* 1997; 40: 726-730.
4. Spaide, Richard F; Fisher, Yale L. Intravitreal Bevacizumab (Avastin) Treatment of Proliferative Diabetic Retinopathy Complicated by Vitreous Hemorrhage. *Retina* 2003; 26(3) 275-278.
5. Ferrera Napoleone.:Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25(4): 581-611.
6. Casaroli-Marano Ricardo P, Vilaró Senén, García-Valero José. Proliferative Vitreoretinopathy and Proliferative Diabetic Retinopathy Ultrastructural Characteristic and Stereologic Study on Proliferative Preretinal Membranes. *An.Inst. Barraquer, (Barc)* 26: 61-78 (1997).
7. Kampik Anselm, MD; Kenyon Kenneth R., MD; Michels Ronald G., MD; Green W. Richard, MD; De la Cruz Zenaida C.: Epiretinal and Vitreous Membranes. *Arch Ophthalmol* 1981; 99: 1445-1454.

8. Hamilton CW, Chandler D, Klintworth GK, Machemer R: A transmission and scanning electron microscopic study of surgically excised preretinal membranes proliferations in diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 1982; 94: 473-488.