



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

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

**CITOLOGIA DE IMPRESIÓN CON TÉCNICA
INNOVADORA EN EL DIAGNÓSTICO DE
OJO SECO**

TESIS DE POSGRADO
Que para obtener el diplomado de especialidad en
OFTALMOLOGÍA

Presenta
DRA. ALEJANDRA SABINA RUIZ FRANCO

DIRECTORES DE TESIS:
DR. ELLERY LÓPEZ STAR.
DR. LEONARDO VILLALVAZO CORDERO
DRA. JUDITH ESPINOSA NAVARRO
DRA. TERESA VALDEZ GONZALEZ





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.

Dra Gloria Alicia Campomanes Eguiarte

Jefa de Enseñanza FHNSL

Dr. Jaime Lozano Alcazar.

Profesor Titular de la Especialidad de Oftalmología UNAM.

Dr. Ellery Marino López Star.

Asesor de Tesis

AGRADECIMIENTOS.

A dios por proporcionarme a mi familia, amigos, profesores, pacientes y todas las circunstancias que han servido para enriquecer mi vida y llenarla de felicidad.

ÍNDICE

Antecedentes.....	5
Hipótesis.....	7
Justificación.....	7
Material y métodos.....	8
Resultados.....	13
Gráficas.....	15
Conclusiones.....	17
Bibliografía.....	18

ANTECEDENTES

La citología de impresión es una técnica que consiste en la aplicación de un filtro de acetato de metilcelulosa, que remueve las capas superficiales del epitelio conjuntival. Las células obtenidas pueden ser utilizadas para examen histológico, inmunohistológico y análisis molecular. Es un método no invasivo fácil de realizar y proporciona gran cantidad de información acerca de las alteraciones celulares de la superficie ocular. Algunas más de sus aplicaciones consisten en: monitorización de los efectos de tratamiento sobre la superficie de la cornea y conjuntiva, detectar metaplasia escamosa en el epitelio conjuntival y análisis de marcadores inmunológicos específicos.

El síndrome de ojo seco es un grupo heterogéneo de trastornos de la superficie ocular caracterizados por un fallo en los mecanismo de hemostasia entre la película lagrimal y el epitelial, resultando en una disminución de la capacidad de responder normalmente a las agresiones externas provocando daño en la superficie ocular.

El ojo seco se clasifica en 2 categorías: deficiencia de la producción acuosa y aumento de la evaporación. El síndrome de Sjögren es una alteración autoinmune con alteración en las glándulas lagrimales y salivales siendo una de las principales causas de deficiencia en la producción acuosa.

La evaluación del ojo seco ha estado basada históricamente, en las manifestaciones clínicas de los pacientes apoyadas en ciertas pruebas clínicas como: el tiempo de ruptura lagrimal, valores de las pruebas de Schimer y las tinciones de fluoresceína y rosa de bengala.

Recientemente se han desarrollado técnicas de laboratorio como son la osmolaridad y la presencia de lisosimas lagrimales. Sin embargo estos métodos son de un alto costo y requieren reactivos y personal calificado para su realización. Por lo que se ha propuesto la

citología de impresión para el estudio de la superficie ocular en el diagnóstico de ojo seco, donde se puede evidenciar disminución en la densidad de células caliciformes como lo ha demostrado estudios de enfermedades primarias oculares como pénfigo y quemaduras por álcalis.

A diferencia de la biopsia conjuntival, la citología de impresión es un método más fácil de realizar y menos invasivo. Tiene el inconveniente de que, si bien el material utilizado para realizarla en la técnica convencional, no es tan costoso como las pruebas antes descritas, la facilidad para realizarla no estaría al alcance de la población en general.

En el laboratorio de patología del Hospital “Nuestra Señora de la Luz” intentamos idear una técnica de citología de impresión en la que se pudiera sustituir el papel de metilcelulosa empleado en la técnica convencional por otro material que nos permitiera obtener los mismos resultados en cuanto a calidad y que fuera mucho más barata y accesible. De este modo, sustituimos el papel de metilcelulosa por papel bond utilizando tinción diff quick (técnica innovada por el Dr. Leonardo Villalvazo jefe del depto. de patología del hospital) para realizar la citología del epitelio conjuntival.

Se ha encontrado en pacientes con ojo seco, reportados en estudios previos, cambios metaplásicos los cuales corresponden a aumento en el volumen de las células epiteliales y de su relación núcleo citoplasma.

RESUMEN

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de la citología de impresión con técnica innovadora en el diagnóstico de ojo seco.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal, aleatorizado, comparativo a los pacientes que acudieron a consulta externa del Fundación Hospital “Nuestra Señora de la Luz”.

RESULTADOS

Se incluyeron 48 pacientes, con un total de 96 ojos, de los cuales 52 correspondieron a pacientes control, 44 a ojo seco. En cuanto al grado de afectación histológica se encontró que el 100% de los pacientes control se encontraban en grado 0, en el grupo de ojo seco el 6.8% (3) en grado 0, grado I con 10 (22.7%), grado II con 12 (27%). grado III con 5 (11.3%) y por ultimo el grado IV con 14 (32%) . Grafica 1

Se observó diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros de todos los pacientes sanos y los y ojo seco. Observándose la diferencia mayor entre la relación núcleo citoplasma y la densidad de células caliciformes $p < 0.001$.

Se determinó sensibilidad y especificidad de la prueba observando una sensibilidad del 88% para el ojo seco IC 95(0.84-0.92).) y una especificidad del 100%.

CONCLUSIONES.

La técnica innovadora presenta una alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de ojo de seco, resultando más accesible para su realización por su rapidez y costo.

PALABRAS CLAVE: Citología de Impresión, ojo seco, técnica innovadora

IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es verdad que la técnica de citología de impresión con técnica innovadora es eficaz en el diagnóstico de ojo seco?

HIPÓTESIS

Si la técnica de citología de impresión estándar tiene una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de ojo seco, la cual equivale a un 90 y 95% respectivamente según lo reportado por Marube. et. al., entonces la técnica de citología con técnica innovadora deberá mostrar una sensibilidad y especificidad similar para ser considerada un método de diagnóstico eficaz.

JUSTIFICACIÓN

La citología de impresión es un método no invasivo, que aporta características importantes de la superficie ocular teniendo el inconveniente de que el papel de metilcelulosa utilizado regularmente para realizarla, es de alto costo lo que la hace no ideal para todo tipo de población.

El presente trabajo está dirigido a determinar los cambios en el epitelio conjuntival encontrados en pacientes con ojo seco utilizando la técnica de citología de impresión creada por el Dr Villalvazo y comparar los resultados obtenidos con aquéllos reportados para la técnica convencional. Así como determinar la eficacia de la técnica innovadora en el diagnóstico de ojo seco.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la eficacia de la citología de impresión con técnica innovadora en el diagnóstico del síndrome de ojo seco.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio prospectivo, longitudinal, aleatorizado, comparativo a los pacientes que acudieron a consulta externa del Fundación Hospital “Nuestra Señora de la Luz”.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

- Variable independiente: Presencia de ojo seco
- Variable dependiente: Presencia de metaplasia escamosa en el epitelio conjuntival

CRITERIOS INCLUSIÓN

Se incluyó a los pacientes que acudieron a la consulta externa del Hospital de la Luz de cualquier edad y sexo con las siguientes características correspondientes con diagnóstico de ojo seco:

- Cuadro clínico característico: ardor, sensación de cuerpo extraño, prurito, hiperemia, visión borrosa no permanente, parpadeo frecuente y fotofobia.

- Pruebas clínicas para el diagnóstico de ojo seco: tiempo de ruptura lagrimal menor a 8 seg prueba de Schirmmer II anormal (menos de 5mm en 5 min).

CRITERIOS EXCLUSIÓN.

Se excluyéron pacientes con:

- Conjuntivitis tanto infecciosa como alérgica.
- Antecedente de quemaduras químicas o radiación.
- Blefaritis, usuarios de lentes de contacto.
- Antecedente de cirugía ocular dentro de los 3 meses previos.
- Tratamiento farmacológico tópico o sistémico que incluyó uso de esteroides previo durante las últimas 2 semanas.

METODOLOGIA

Se solicitó consentimiento informado a cada paciente o tutor para su ingreso al estudio.

Se dividió a los pacientes en dos grupos. En el grupo 1 se incluyeron a los pacientes con características clínicas de ojo seco y en el grupo 2 pacientes asintomáticos, sin ningún dato de anormalidad al examen biomicroscópico, el cual sirvió de control.

A todos los pacientes se les realizó revisión oftalmológica completa la cual incluyó: agudeza visual, determinación de Presión Intraocular, valoración de fondo de ojo y examen biomicroscópico determinando:

- El tiempo de ruptura lagrimal estándar después de la instilación de fluoresceína. Realizando 3 mediciones y tomando el promedio de estas como valor final. Valor menor de 8 segundos como anormal.
- Tinción con rosa de bengala para determinar las células desvitalizadas en la conjuntiva temporal, nasal y cornea. Evaluación por separado para cada una de estas. Una escala de 1 es dada cuando hay pocos puntos de tinción separados y dispersos, 2 si los puntos de tinción son abundantes, pero separados y 3 si los puntos de tinción eran múltiples y confluentes. Con una escala de uno hasta nueve. Determinando como prueba anormal aquella igual o mayor a 3 puntos.
- Prueba de Shimmers II. Utilizando papel Whatman, colocado en el fondo de saco inferior en tercio externo de este, previas instilación de tetracaína tópica. La lectura reportada en milímetros de humedad a los 5 minutos. Teniendo como resultado anormal menor de 5 mm.

Se realizó la citología de impresión utilizando la técnica ideada por el Dr. Villalvazo utilizando papel bond de 10 mm x 20mm, estéril, colocándolo previa instilación de anestésico tópico, sobre la conjuntiva bulbar superior, utilizando una pinza para su aplicación firme pero gentil sobre esta por 10 segundos y se retira el papel, que arrastrará

adheridas a él 2 capas superficiales del epitelio conjuntival. Posteriormente se realizó tinción Dift Quick.

A los pacientes en el grupo control se realizó la citología de impresión mediante la técnica convencional utilizando membrana biopore, la cual consiste en papel celulosa fijada a un artefacto tubular de plástico estéril (millicell 0.4 micras PIM012550), colocada directamente sobre la conjuntiva bulbar superior y la cual recogerá también 2 capas de epitelio conjuntival, posteriormente se fijan en etanol 96% y se tiñen con ácido peryódico de Schiff (PAS) y hematoxilina y por último se separan de su base y se colocan permanentemente en un portaobjetos con un cubre objetos. Las muestras ya teñidas se analizaron al microscopio óptico, por un solo médico histopatólogo el cual no conocía el tipo de paciente al que pertenecía la muestra, prestando una especial atención al número de células epiteliales conjuntivales mucosecretoras (células caliciformes) así como al área del citoplasma y núcleo de las células no-secretoras, las alteraciones y tinción citoplásmicas, las alteraciones nucleares y la relación núcleo- citoplasma (N/C).

Los hallazgos citológicos fueron determinados y clasificados de acuerdo a las características del epitelio conjuntival, determinando de forma cualitativa la cantidad de células epiteliales clasificándolas por grados de acuerdo a la densidad de la muestra en: abundantes, moderadas, escasas o ausentes. El tamaño de células epiteliales clasificándolas en pequeñas (1), normales (2) y grandes (3) de acuerdo a su volumen estimado y la densidad de células caliciformes, clasificándola en 0 ausentes, 1 escasas, 2 moderadas y abundantes. Relación núcleo citoplasma, clasificándola en grado I cuando la relación era 1:2, II en 1:3, III en 1:4 y IV 1:5 o mayor.

De acuerdo a los datos reportados previamente se dividieron en 5 clases, basándose en la clasificación por Nelson modificada :

- Grado 0: células epiteliales pequeñas abundantes, N/C 1:1 con abundantes células caliciformes, uniones estrechas entre ellas.
- Grado I: células epiteliales abundantes, pequeñas con N/C hasta 1:3 y células caliciformes moderadas.

- Grado II: Células epiteliales de tamaño moderado con N/C 1:4, y células caliciformes moderadas.
- Grado III: Células epiteliales grandes con relación N/C 1:4 y células caliciformes escasas
- Grado IV: Células epiteliales grandes con relación N/C 1:5 y células caliciformes ausentes.

ANALISIS ESTADISTICO.

Se realizó análisis estadístico ortogonal por la prueba de chi cuadrada para comparación de proporciones múltiples (utilizando las frecuencias relativas de cada parámetro y entre los 2 grupos con los resultados obtenidos) estableciendo un nivel de significancia estadística el menor de 0.05. Se estableció una potencia de prueba de 90%. Cuando fue necesario se construyeron intervalos de confianza al 95%.

Se determinó la sensibilidad general y especificidad de la prueba así como para el diagnóstico de ojo seco y conjuntivitis alérgica. Se analizó por regresión binomial la clase de alteración citológica y el grado de alteración de las pruebas diagnósticas de ojo seco.

RESULTADOS.

Se incluyeron un total de 48 pacientes, con un total de 96 ojos, de los cuales 52 muestras correspondieron a pacientes control, 44 a ojo seco. La distribución por edad en pacientes control abarcó de los 13- 17años con una media de 15.6 años, en el grupo de ojo seco un rango de 17-35 con media un de 28.5 años. No hubo diferencia en cuanto a distribución por sexo.

En cuanto al grado de afectación histológica se encontró que el 100% de los pacientes control se encontraban en grado 0, en el grupo de ojo seco el 6.8% (3) en grado 0, con 10 (22.7%) en el grado I, grado II con 12 (27%), grado III con 5 (11.3%) y por último el grado IV con 14 (32%) . Grafica 1

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros de todos lo pacientes sanos y los de ojo seco. Observándose la diferencia mayor entre la relación núcleo citoplasma y la densidad de células caliciformes $p < 0.001$.

Se observaron diferencias significativas en 4 de los seis parámetros medidos a excepción de la densidad de células epiteliales y relación núcleo citoplasma. Tabla1

Se determinó sensibilidad y especificidad de la prueba y se observó una sensibilidad del 88% para el ojo seco IC 95(0.84-0.92).) y una especificidad del 100%.

En análisis de regresión binomial simple se encontró una $r=0.88$ con coeficiente de determinación de 0.77.

En cuanto a la técnica de membrana no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de células epiteliales, calciformes ni en relación núcleo citoplasma pero cabe mencionar que en esta las estructuras como los núcleos y las células calciformes son de mayor accesibilidad para el histopatólogo por el tipo de tinción.

GRAFICA 1 RELACIÓN DE TIPO DE PACIENTES Y GRADO CITOLÓGICO

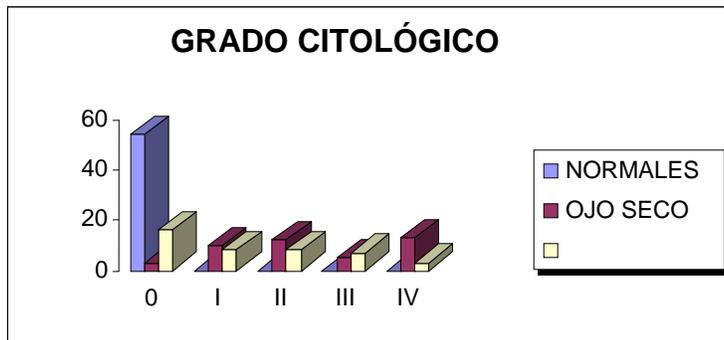


Tabla 1 Comparación de chi cuadrada múltiple.
Tabla tendencia relativa

PACIENTES	DEN. EPIT	P	TAMAÑO	P	DEN. CALI	P	REL N/C	P	QUERATI	P	CEL INFLA	P
NORMAL	0.57	0.03	0.12	0.03	0.42	0.001	1	0.001	0.72	0.03	0.72	0.03
OJO SECO	0.28	NO SIGN	0.59	0.05	0.09	0.02	0.59	NO SIG	0.70	0.05	0.75	0.001

DISCUSION

El síndrome del ojo seco es una alteración de la superficie ocular que afecta una buena parte de la población mundial causando síntomas crónicos. Las alteraciones relacionadas a la producción de mucina han sido implicadas en la génesis de la alteración de la película lagrimal. Una significativa reducción en la producción de mucina conduce a la creación de áreas hidrofóbicas sobre la cornea y conjuntiva lo que puede modificar la superficie e incrementar el riesgo de infección y esto llevar a la presencia de síntomas característicos de ojo seco en estos pacientes.

Nuestro resultados coinciden con los reportados Goto (11) donde reporta disminución de células caliciformes y alteraciones en pruebas de función lagrimal, en nuestros resultados se muestra una variable muy significativa la cual fue la presencia de células inflamatorias en especial linfocitos, células plasmáticas y polimorfonucleares, no encontrando en nuestras muestras eosinófilos, los cuales son ampliamente reportados en series previas(10). Esto puede ser debido al tipo de técnica que nosotros utilizamos, que no haya logrado una correcta tinción o a la real ausencia de este tipo celular.

En cuanto a densidad de células caliciformes y morfología de células epiteliales nuestros resultados fueron semejantes a los encontrados por Fillipello (6) el cual reporta en pacientes control abundantes células caliciformes aproximadamente 210 por mm y células pequeñas epiteliales de 20 microlitros de volumen.

Estudios realizados por Murube demuestra grados citológicos semejantes a nuestros resultados en los que resalta la metaplasia escamosa caracterizada por disminución de células caliciformes y aumento de volumen de células epiteliales así como su aumento en la relación núcleo citoplasma. Algunos de los hallazgos que encontramos en los 3 grupos son variaciones en la forma de los núcleos, los cuales predominaban en pacientes con ojo seco. Estos son cambios inespecíficos que solo revelan procesos de estrés celular.

Cada grado de metaplasia escamosa muestra valores homogéneos con diferencias significativas entre ellos y presenta una relación estadística con un grado concreto de severidad clínica la cual determinamos con la pruebas de la película lagrimal. Así, estas son paralelas en la mayoría de los casos, es decir, cada grado de severidad clínica se corresponde con el mismo grado de metaplasia escamosa. Esto ayuda grandemente a establecer una buena clasificación clínica.

La mayor utilidad de la citología de acuerdo a nuestros resultados fue para discriminar a sujetos sanos de aquellos con patología ocular. Con una buena sensibilidad y especificidad

CONCLUSIONES

La citología de impresión con técnica innovadora es eficaz en el diagnóstico de ojo seco.

Esta técnica es relativamente nueva no invasiva, la cual permite analizar las células de las capas superficiales de la conjuntiva y cornea y puede ser de gran utilidad en el diagnóstico complementario del ojo seco y de muchas otras aplicaciones como en procesos tumorales.

La Técnica que se presentó con papel bond es una opción factible ya que es barata y más fácil de realizar que la técnica estándar, sin embargo se deben seleccionar bien a los pacientes a estudiar y realizar estudios posteriores para ir dilucidando nuevos usos y sobre todo determinar su sensibilidad y especificidad en estos.

ILUSTRACIONES, ESQUEMAS Y DIBUJOS.

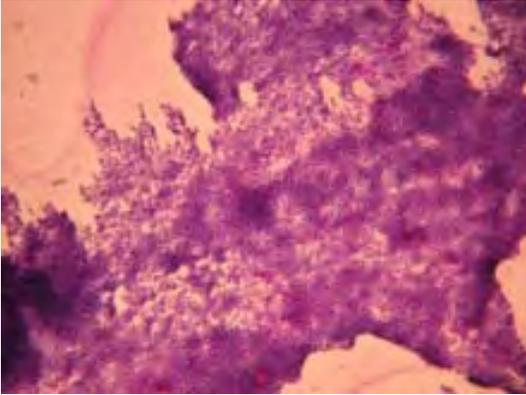


Figura 1 citología de impresión paciente grado 0 con tinción PAS

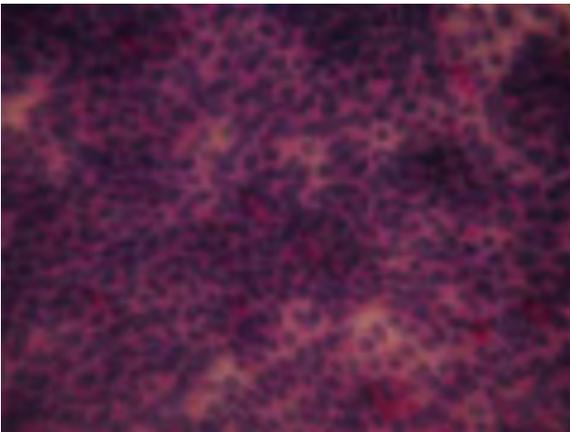


Figura 2 citología de impresión paciente grado 0 con tinción Dift Quick

CUADROS Y GRÁFICOS (TÍTULOS)

Grafica 1 relación de tipo de pacientes y grado citológico

Tabla 1 Comparación de chi cuadrada múltiple. Tabla tendencia relativa

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Suzuki et. al. Tear Film Lipid Layer Alterations in Allergic Conjunctivitis. *Cornea* . Volume 25, Number , April 2006 pp. 277-280.
- 2,-Stephen. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Current Eye Research* 1999, Vol. 19, No. 3, pp. 201–211.
- 3.- Marube. *Dry eye: clinical and impression cytology classification* *Am J Ophthalmol* 1977; 81: 798-801.
- 4.- Singh. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol* 2005;89:1655–1659. doi: 10.1136/bjo.2005.073916
- 5.- Derek. Reliability of impression cytology for the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia employin.the Biopore membrana. *Br J Ophthalmol* 2001;85:154–158
- 6.- Filipello. Impression cytology in Down's síndrome. *British Journal of Ophthalmology* 1997;81:683–685
- 7.- Reddy Madhavati. Conjunctival impression cytology in dry eye status . Sarojini Devi Eye Hospital, Hyderabad-500 028
India
8. Masaico. Diagnosis of Dry Eye . *Seminars in Ophthalmology*, 20:53–62, 2005

9.-Begley C, Zhuo J, Wilson G. Characterisation of cells from the ocular surface in normal eyes. In: Sullivan DA, Dartt DA, Meneray MA (eds.). Lacrimal Gland.

10.-Blades K, Doughty MJ, Patel S. Pilot study of the use of impression cytology specimens for quantitative assessment of the surface area of bulbar conjunctival cells. *Optom Vis Sci* 1998; 12: 41-45.

11.-Nelson JD, Wright JC. Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 1049-1051.

12.-Tseng SCG. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985; 92: 728-733.

13.-Álvarez MI, Rivas L, Toledano A, Rodríguez JJ, Oroza MA, Murube J. Estudio ultraestructural de la conjuntiva en pacientes con queratoconjuntivitis seca. *Arch Soc Españ Oftalmol* 1996; 70: 431-436.