

11234



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA
FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

Análisis Ultraestructural de Fibras Oligomiélicas
en Córneas con Queratitis Herpética.

TESIS DE POSTGRADO
Que para obtener el diplomado de especialidad en

OFTALMOLOGÍA

Presenta la

Dra. Vanessa Bosch Canto

DIRECTOR DE TESIS.

Dr. Ricardo Vargas Moreno



México, D. F.

2004.



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

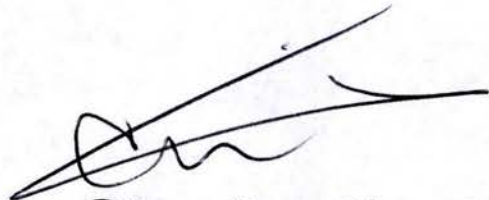
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



Dr. Enrique Graue W.



Dra. Claudia Murillo C.



INSTITUTO DE
OFTALMOLOGIA

FUNDACION CONDE DE VALTENCIANA

JEFATURA DE ENSEÑANZA

Chimalpopoca 14 México 8, D. F.

Col. Obrera



Dr. Ricardo Vargas M.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Vanessa Bosch C.

FECHA: 20/9/04

FIRMA: 

Dedicatoria

A mi mamá, por ser siempre mi ejemplo.....

A mi papá, por ser mi inspiración y mi fuerza.....

A mis hermanos, por la vida compartida.....

A mis maestros, por tanta paciencia y obstinación.....

A mis amigos por cada minuto

A todos y los que me faltan,

gracias.....

totales

Índice

1. **Introducción**
2. **Objetivo**
3. **Hipótesis**
4. **Materiales y método**
5. **Resultados**
6. **Conclusiones**
7. **Bibliografía**
8. **Figuras**

Introducción

Para estudiar la ultra estructura de un tejido es esencial el uso del microscopio electrónico. En este microscopio se utilizan electrones en vez de rayos de luz, y como lentes funcionan unos electroimanes. Cuando los electrones pasan a través de la preparación algunos son difractados creando entonces una imagen que se hace visible en una pantalla sensible a los electrones. La longitud de onda de la radiación de los electrones es mucho más pequeña que la de la luz visible y, como el poder resolutivo de un microscopio es inversamente proporcional a la longitud de onda utilizada, la resolución obtenida con el microscopio electrónico es mucho mayor que la conseguida con el microscopio óptico. Con el microscopio electrónico pueden verse fácilmente objetos de $0,001 \mu$.

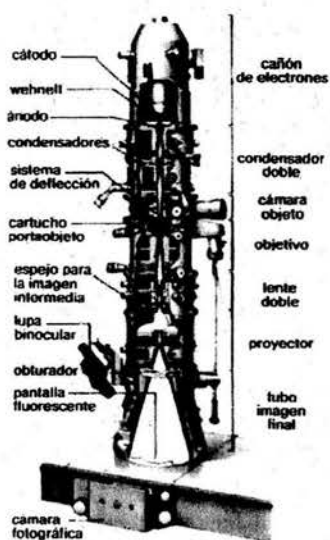


Fig 1. Anatomía microscopio

En 1982, Schimmelpfennig presentó la primera descripción detallada de fibras nerviosas de corneas humanas utilizando un microscopio de luz.

En 1989, Ueda realiza el primer reporte ultra estructural, utilizando microscopía electrónica en tejidos oculares de animales.

En 1994, Matsuda hace una descripción ultra estructural, utilizando microscopía electrónica, de fibras nerviosas y sus terminaciones en corneas humanas.

Se sabe que la cornea es una estructura densamente inervada, que recibe fibras de la primera rama del nervio trigémino, vía los nervios ciliares anteriores.

Aproximadamente 60 fibras mielínicas, penetran a la cornea. Después de 1-2 mm pierden las lamelas de mielina convirtiéndose en fibras oligomiélicas. Siguen a través del estroma corneal y atraviesan la membrana de Bowman, quedando en el epitelio como terminaciones nerviosas libres. Estas fibras han sido clasificadas como mecano receptores, aunque se sabe que en realidad se trata de receptores polimodales, que responden igual a estímulos térmicos, mecánicos y químicos. El tipo de fibras corresponde a fibras tipo A- δ y C. Las fibras A- δ transmiten la información a una velocidad de 5- 30 m/s, cuentan con un diámetro de 1-5 μ y están rodeadas de 15 a 25 lamelas de mielina.

Por otro lado sabemos que la velocidad de transmisión de las fibras C es de 1m/s, estas tienen un diámetro de 0.2 -2 μ y están rodeadas por 2 a 6 lamelas. Ambos tipos de fibras contienen microtúbulos, neurofilamentos y organelos.

Las fibras C se bifurcan por debajo del epitelio, mientras que las fibras A- δ corren paralelas entre las células epiteliales.

La inervación sensorial de la córnea ejerce una influencia trófica sobre el epitelio corneal. Los neurotransmisores involucrados (detectados por estimulación antidrómica) son la sustancia P principalmente y en menor proporción el péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Estos neurotransmisores son liberados por la excitación de la terminación nerviosa, difundiéndose en el área estimulada. La sustancia P es principalmente secretada por las fibras C y se asocia a dolor crónico.

En la córnea, la sustancia P se ha asociado a un aumento en la proliferación de las células epiteliales. La denervación sensorial de la cornea resulta en una depleción de este neurotransmisor y a su vez en una disminución del metabolismo y de la mitosis celular. Este tipo de daño se traduce en una disminución de la sensibilidad corneal y en una empobrecida capacidad de recuperación epitelial. Esta entidad clínica es conocida con el nombre de queratitis neurotrófica.

Este tipo de queratitis produce inicialmente una hipoestesia localizada o en parches, que evoluciona a una anestesia generalizada.

Entre las causas de la queratitis neurotrófica están: daño a la rama oftálmica, generalmente secundaria a daño quirúrgico (Ej.: neuralgia trigémino, neurinoma del acústico, etc.), trauma y enfermedades desmielinizantes (Diabetes mellitus) pero la principal etiología de la queratitis neurotrófica es la infección por herpes virus.

El Herpes virus es un DNA virus que consta de una doble cadena y que de aproximadamente 152 kb.

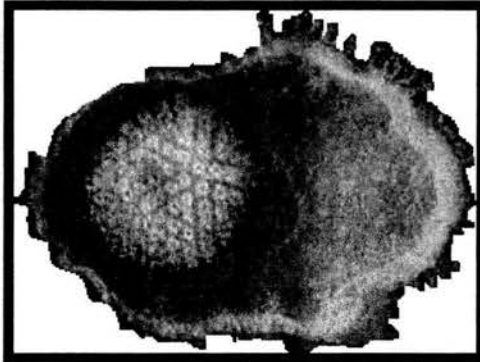


Fig2. Microscopia electrónica del HVS

Existen dos grupos principales de enfermedad herpética ocular: la oftalmia por Herpes Virus Simplex tipo I (HSV) y por Herpes zoster. Los humanos son el único hospedero y reservorio natural del virus. El primer contacto ocurre entre los 6 meses y los 5 años de edad y es subclínico en el 90% de los casos. (3,4,5) La mayoría de las infecciones observadas en la clínica son producto de la reactivación de la replicación viral desde su estado de latencia, en presencia de estrés fisiológico. En los casos recurrentes, la primera estructura ocular involucrada es la superficie corneal.

El HVS es esencialmente un virus neurotrófico que puede permanecer latente indefinidamente en el ganglio trigeminal. El virus viaja por transporte axoplásmico al núcleo de neuronas sensitivas, incluso se sabe que algunas neuronas son destruidas por la replicación viral.

Cavanagh en 1989, propone una teoría que intenta explicar que la disminución de la sensibilidad en corneas con queratitis herpéticas se debe a una disminución en el número de fibras nerviosas. Sin embargo otros autores han intentado asociar esto con cambios morfológicos a nivel de las terminaciones libres en la cornea.

En estudios realizados en entidades que se acompañan de hipoestesia, como el síndrome de insensibilidad congénita al dolor y el trastorno obsesivo-compulsivo, entre otros, se ha podido demostrar una disminución en el número de las fibras oligomiélicas y cambios morfológicos en las terminaciones libres. Estos cambios incluyen aumento en el diámetro de la porción distal de la terminal nerviosa.

Planteamiento del problema

La queratitis herpética constituye la principal causa de ceguera de origen infeccioso en los países desarrollados. Esto debido a la capacidad del HSV-1 de permanecer en estado de latencia en sus hospederos y de causar recidivas frecuentes que originan una hiposensibilidad corneal que va provocando cicatrización de la misma y disminución progresiva de la agudeza visual.

En la actualidad aun no se sabe si la infección corneal por HVS -1 resulta en una disminución de las fibras nerviosas y por lo tanto en una depleción de sus neurotransmisores, o si sucede una alteración en la cito estructura de estas fibras y en consecuencia una incapacidad para la transmisión de la información sensitiva.

Objetivo general

Describir alteraciones ultra estructurales en fibras oligomiélicas en córneas con queratitis herpética

Objetivos específicos

- 1.- Visualización mediante microscopio electrónico de fibras nerviosas en muestras corneales con diagnóstico comprobado de HVS – 1.
- 2.- Visualización mediante microscopio electrónico de fibras nerviosas de muestras corneales sin patología.
- 3.- Comparación de hallazgos ultra estructurales entre ambos grupos.

Hipótesis:

En las córneas con queratitis herpéticas existen cambios estructurales en las fibras oligomiélicas encargadas de la transmisión sensitiva

Hipótesis nula:

En las córneas con queratitis herpéticas **no** existen cambios estructurales en las fibras oligomiélicas encargadas de la transmisión sensitiva

Materiales y métodos

A. Tipo de estudio:

- × Observacional
- × Descriptivo
- × Comparativo
- × De variables nominales

B. Criterios:

1. Criterios de inclusión:

Se incluyeron botones corneales de pacientes que se sometieron a queratoplastia penetrante y que contaran con diagnóstico confirmado de queratitis herpética previo al procedimiento quirúrgico.

Por otro lado se incluyeron botones corneales sin antecedente de patología corneal, que se obtuvieron de ojos que fueron enucleados por trauma o herida perforante.

2. Criterios de exclusión:

Se excluyeron botones corneales con diagnóstico dudoso de queratitis herpética.

Así mismo, se excluyeron botones corneales de donadores con antecedente de:

- Diabetes Mellitus
- Cirugía con manipulación del nervio trigémino o ganglio ciliar
- Uso crónico de lentes de contacto

3. Criterios de eliminación:

Fueron eliminados botones corneales que sufrieron daños durante el proceso de fijación o el corte.

C. Ubicación espacio-temporal:

Las muestras se obtuvieron en el Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana" a partir de septiembre 2003 a noviembre 2004

Se procesaron y revisaron en el laboratorio de Neurofisiología del Instituto Nacional Psiquiatría

D. Escalas de medición:

- × Integridad de lamelas de mielina
- × Estado de organelos
- × Estado de microtúbulos y neurofilamentos
- × Densidad gránulos neurotransmisores

E. Recolección de muestras

Este estudio contó con un total de 13 muestras corneales.

Se recolectaron muestras de 4 mm de 6 córneas con diagnóstico de herpes, corroborado por PCR y muestras de 4 mm de 7 córneas sin patología previa.

F. Procesamiento de las muestras

- a. Inclusión de las muestras en solución de glutaraldehído 1.25% y paraformaldehído 1% en un buffer de cacodilato de sodio al 0.08 M.
- b. Fijación durante 5 días a una temperatura de -2 grados centígrados.
- c. Postfijación en tetraóxido de osmio al 1%, suplementado con ferrocianida al 1.5 % en un buffer de cacodilato de sodio al 0.1M. La osmolaridad es mantenida dentro de un rango 475 a 500 mOsm.
- d. Deshidratación de las muestras en etanol a distintas concentraciones.
- e. Inclusión de las muestras en resina epóxica.
- f. Se realizan micro cortes de 90 nm, a intervalos de 20 μ .
- g. Estos cortes se tiñen con acetato de uranilo y citrato.
- h. Se inspeccionan utilizando un microscopio Philips EM 201.
- i. Se toman fotografías de los tejidos analizados. Mismas que posteriormente son reveladas con técnicas convencionales.
- j. Análisis de microfotografías.

G. Ética

Este protocolo se apega a los lineamientos de la Declaración de Helsinki sobre métodos y seguridad en la utilización de tejidos humanos.

Resultados

- × Se recolectaron 8 botones con queratitis herpética confirmado por PCR (casos).
- × Fueron 10 botones corneales sin patología (controles).
- × Se eliminaron 3 botones corneales por mala fijación de las muestras.
- × Se encontraron fibras nerviosas oligomielínicas que corren paralelas a las fibras de colágena, cruzando el estroma corneal.
- × La mayor parte de las fibras contaban con diámetros de entre 0.5 a 2 μ , correspondiendo a fibras C. Sin embargo también se observaron algunas fibras de mayor diámetro, compatible con fibras A- δ .
- × Hasta el momento se han encontrado diferencias en las estructuras nerviosas de ambos grupos.
- × Existen más fibras mielínicas en las muestras tomadas en la periferia de las corneas que aquellas muestras obtenidas del centro.

- × Los daños más evidentes se encontraron en las estructuras internas de las fibras C de las córneas con queratitis herpética.

- × Estos daños consisten principalmente en licuefacción del contenido de la fibra nerviosa (microtúbulos y neurofilamentos).

- × Las lamelas de mielina en las fibras A- δ de las córneas con queratitis herpéticas se encontraron peor conservadas que las de las fibras C

- × No se observó diferencia en el número de fibras nerviosas en las corneas observadas.

Discusión

La córnea es una de las estructuras más sensibles del cuerpo.

Hasta el momento, la descripción anatómica de la inervación corneal ha representado un reto para los especialistas, debido a que las técnicas de evaluación han resultado insuficientes. La ayuda que en la actualidad brinda la microscopía electrónica plantea nuevas interrogantes acerca de la ultra estructura de las fibras y de la patología de las mismas.

Por otro lado la obtención de muestras, plantea el problema de obtener tejido en óptimo estado para su utilización en microscopía electrónica y así asegurar la visualización de las estructuras que lo conforman. Otro reto representa la rápida inclusión de las muestras en solución para fijarlo, ya que esta solución debe de contar con un máximo de 5 horas desde su preparación para poder lograr una buena fijación del tejido.

Todo esto delimita la obtención de muestras, por lo que no es posible determinar el tiempo de recolección para lograr obtener un número adecuado de muestras.

Conclusión

1. La córnea cuenta con dos tipos de fibras nerviosas: las fibras A- δ y las fibras C.
2. Las fibras C son las que se encuentran en mayor número, y su localización mas común es en el centro de la cornea.
3. En las corneas infectadas por el HVS existe un daño en las lamelas de mielina de las fibras, asi como en el contenido de estas.
4. No se encontró diferencia en el numero de fibras por campo en ambos grupos.
5. La hipo sensibilidad que se presenta en la queratopatía por herpes puede ser explicada por la alteración estructural de las fibras encargadas de la transmisión sensitiva y no por la depleción de neurotransmisores

Bibliografía

1. Schimmelpfennig B. Nerve structures in human central corneal epithelium. Arch Clin Exp Ophthalmol, 1982; 218: 14 – 20.
2. Ueda S, et al. Peptidergic and catecholaminergic fibers in the human corneal epithelium. Acta Ophthalmologica, 1989; 67 : 80 -89.
3. Kinoshita S, Nishida K, Dota A, et al. Epithelial barrier function and ultrastructure of gelatinous drop-like corneal dystrophy. Cornea (United States), Jul 2000, 19(4) p551-5
4. Radner W, Skorpik C, Loewe R, et al. Effect of trephination technique on the ultrastructure of corneal transplants: guided trephine system v posterior punch technique. Br J Ophthalmol (England), Oct 1999, 83(10) p1172-7
5. Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ, et al. Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. Exp Eye Res (England), Jun 2003, 76(6) p735-43
6. Wagner E. Herpes Simplex virus research. Disponible en: URL: Ophthalmology, 1986, 76 (8) p 354
7. Rumelt S, Cohen I, Skandarani P, et al. Ultrastructure of the lamellar corneal wound after laser in situ keratomileusis in human eye. J Cataract Refract Surg (United States), Aug 2001, 27(8) p1323
8. Miyagawa A, Kobayashi M, Fujita Y, et al. Surface ultrastructure of collagen fibrils and their association with proteoglycans in human cornea and sclera by atomic force microscopy and energy-filtering transmission electron microscopy. Cornea (United States), Aug 2001, 20(6) p651-6
9. Remeijer L, Maertzdorf J, Buitenwerf J, et al. Corneal herpes simplex virus type 1 superinfection in patients with recrudescant herpetic keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci (United States), Feb 2002, 43(2) p358-63

10. Remeijer L, Maertzdorf J, Buitenwerf J, et al.
Corneal herpes simplex virus type 1 superinfection in patients with recrudescant herpetic keratitis.
Invest Ophthalmol Vis Sci (United States), Feb 2002, 43(2) p358-63

11. Yagev R, Levy J, Shorer Z, et al.
Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: ocular and systemic manifestations.
Am J Ophthalmol (United States), Mar 1999, 127(3) p322-6

Figuras

Controles



Fig 1. Control

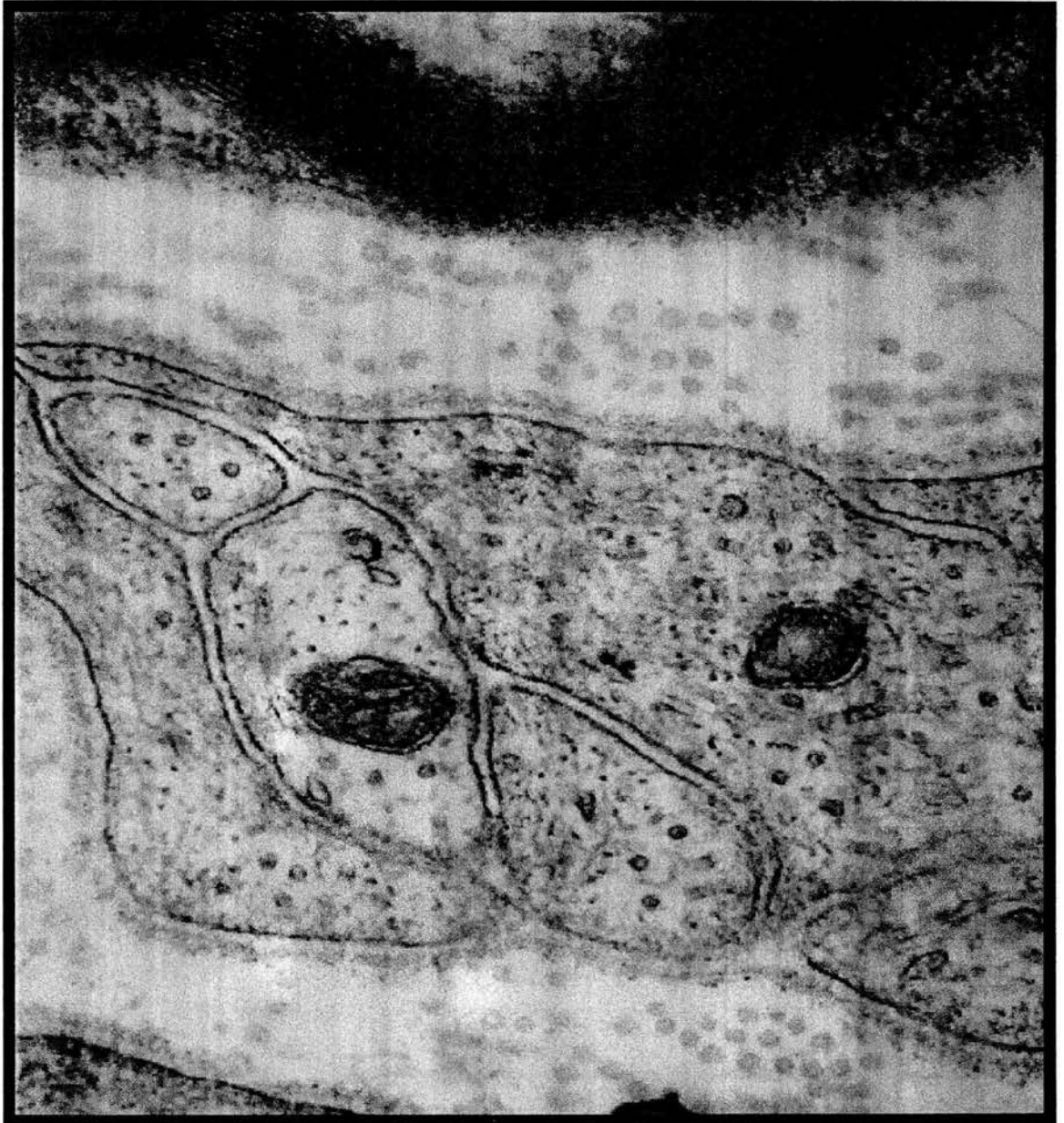


Fig 2. Control



Fig 3. Fibras C y A- δ . Control

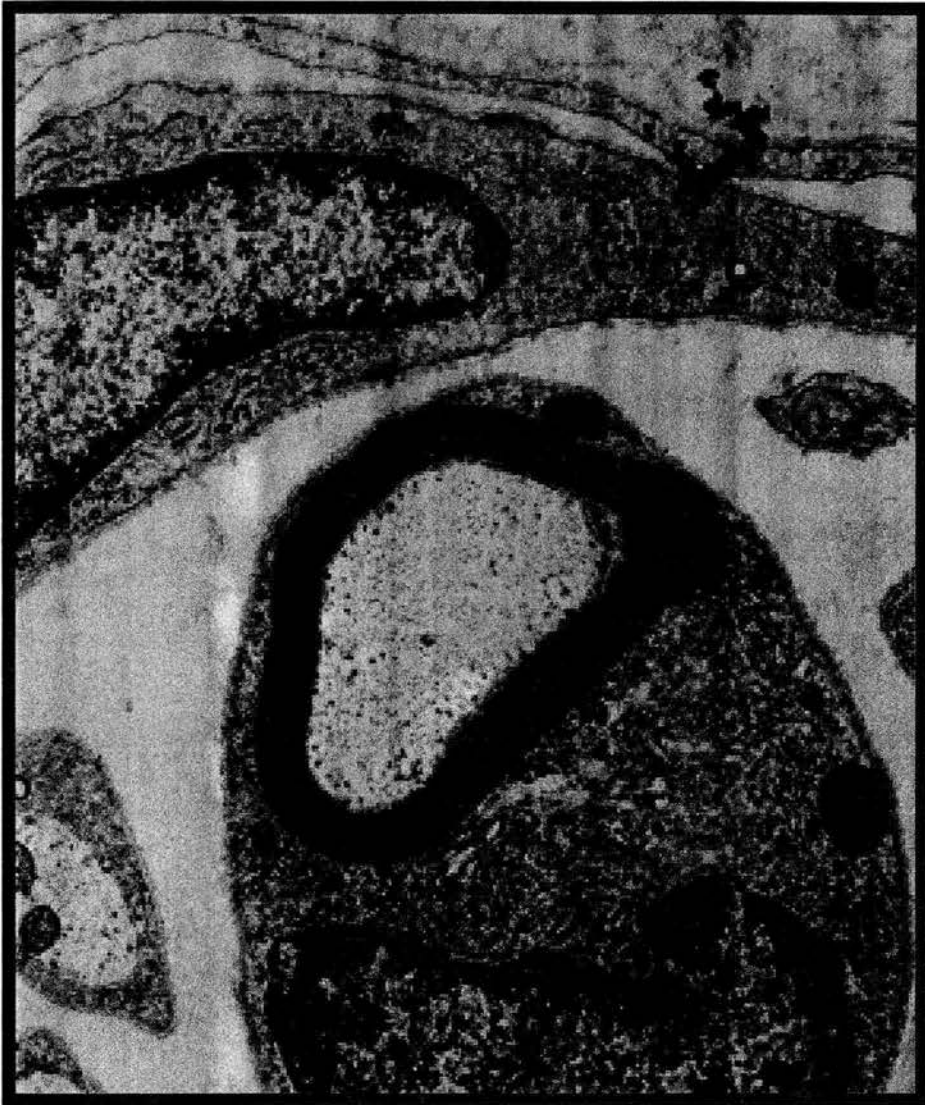


Fig 4. Control

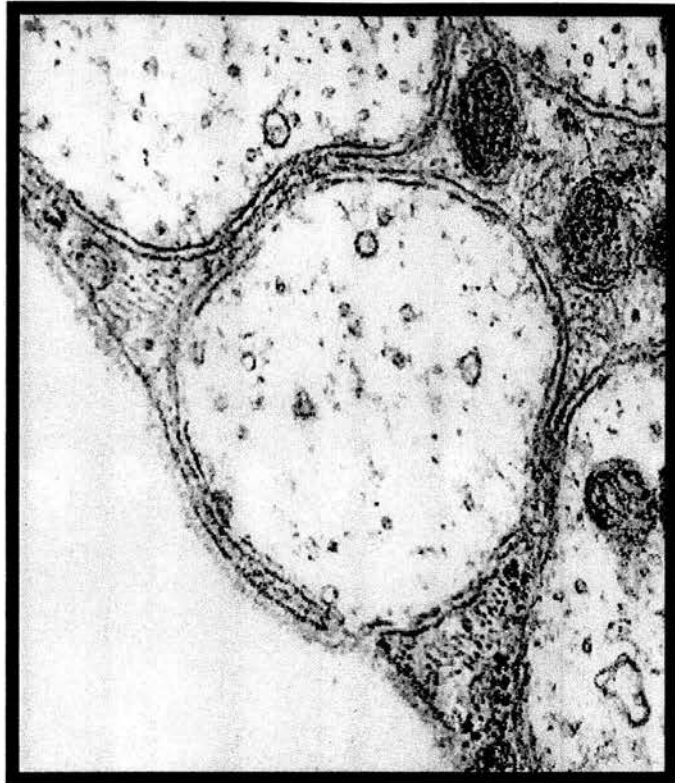


Fig 5. Fibra C. Herpética



Fig 6. Fibra C. Control



Fig 7. Fibra C Herpética



Fig 8. Fibra C. Controles



Fig 9. Fibra A- δ . Herpetica

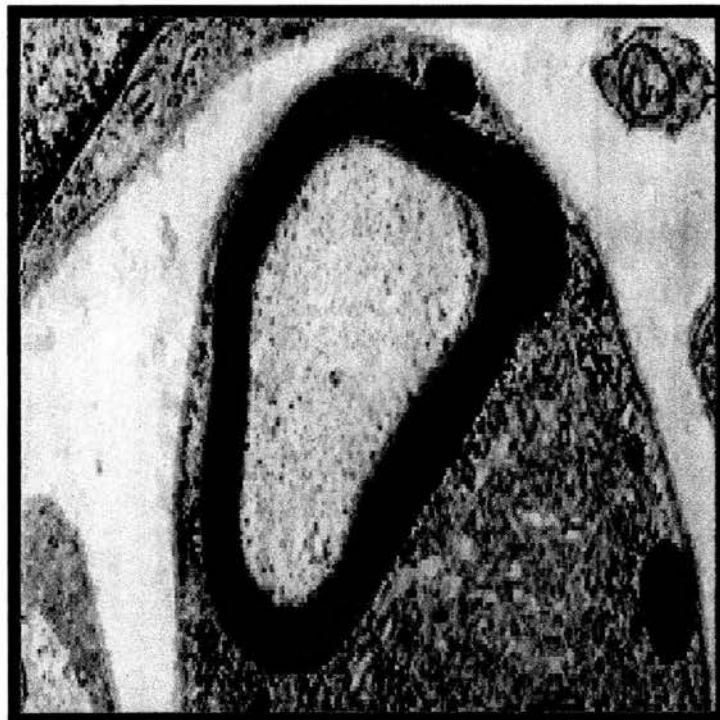


Fig 10. Fibra A- δ . Control



Fig 11. Fibra C. Herpetica



Fig 11. Fibra C. Control