

SECCIÓN DE TRABAJOS CIENTÍFICOS ORIGINALES

Microscopía electrónica y fluorangiografía en neovasos corneales: estudio descriptivo

Dra. Miriam Betech Hanono*, Dr. Oscar Baca Lozada*, Dra. Regina Velasco*, Dr. Arthur Levine*,
Dr. Abelardo Rodríguez Reyes**, QFB. Ma de la Luz Rosales Montaña***

RESUMEN

Objetivo: Estudiar las diferencias entre los vasos proximales y distales en la microanatomía de la neovascularización corneal y correlacionarlos con los hallazgos fluorangiográficos.

Metodos: Se realizó un estudio descriptivo, transversal, observacional y prospectivo en el Departamento de Córnea de nuestra institución junto con el departamento de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el período comprendido entre marzo de 2001 y diciembre de 2002. Seleccionamos aquellos pacientes candidatos a queratoplastia penetrante con neovascularización corneal. Realizamos cuatro pasos en cada córnea del receptor: 1. Fluorangiografía corneal, 2. Queratoplastia penetrante, 3. Microscopía electrónica y 4. Correlación de datos.

Resultados: Once ojos fueron estudiados, 8 (73%) ojos con queratitis intersticial, uno (9%) con rechazo corneal, uno (9%) con injerto fallido primario y uno (9%) con pannus corneal. Diez ojos mostraron las imágenes en bulbo (filtración de los vasos distales) en la fluorangiografía corneal y solamente el caso de pannus no presentó fuga. En la microscopía electrónica observamos un mayor número de vacuolas en los vasos distales, de menor calibre, alteraciones en las uniones de las células endoteliales tipo *zonulae occludens*, menor número de poros nucleares, interrupciones en la membrana, menor cantidad de filamentos intermedios de la pared vascular, responsables de la movilidad celular, menor número de células pinocíticas, responsables del transporte de sustancias; en los vasos proximales de mayor calibre observamos una membrana con mayor continuidad, así como en los filamentos intermedios, mayor número de poros nucleares y vesículas pinocíticas. Estos hallazgos son similares en todas las córneas estudiadas excepto la córnea con pannus.

Conclusiones: La microscopía electrónica muestra evidencia de menos alteraciones en la pared vascular de los vasos con mayor calibre en comparación con los de menor calibre. En los neovasos con mayor calibre la pared vascular presenta características similares a las de un vaso normal. La presencia de poros nucleares puede estar directamente relacionada con una mejor estructura vascular y como consecuencia con una menor fuga en la fluorangiografía corneal en los vasos de mayor calibre.

Palabras clave: Neovascularización corneal, microscopía electrónica, fluorangiografía corneal.

SUMMARY

Purpose: To search the microanatomic differences of proximal and distal vessels in corneal neovascularization and correlate them with corneal fluorangiography.

Methods: A descriptive, transversal, observational and prospective study was carried out in the Cornea Department of our Institution, along with the Electron Microscopy Department at the Universidad Nacional Autonoma de Mexico (UNAM), between March 2001 and December 2002. We selected patients for penetrating keratoplasty with corneal neovascularization. Four steps were followed in each cornea: 1. Corneal fluorangiography, 2. Penetrating keratoplasty, 3. Electron microscopy and 4. Result correlation.

Results: Eleven eyes were studied, 8 (73%) eyes with interstitial keratitis, one (9%) with graft rejection, one (9%) with primary graft failure and one (9%) with corneal pannus. Ten eyes showed bulb images (leakage in the distal vessels) in the corneal fluorangiography, and only one did not had leakage patterns (pannus eye). With the electron microscope in the small caliber vessels we observed a higher number of vacuoles, alterations in the *zonulae occludens* junction between endothelial cells, less number of nuclear pores, discontinuity of the membrane, less filamentary structures (responsible of the cell mobility), less pinocytic vesicles (responsible of substance transportation). In proximal high caliber vessels we observed a more continuous membrane, better filamentary structures, a higher number of nuclear pores and more pinocytic vesicles. These findings were similar in all corneas studied except the cornea with pannus.

Conclusions: Electron microscopy shows evidence of less damage in the vascular wall of high caliber vessels in comparison with the smaller vessels. The vascular wall in high caliber neovessels present similar characteristics to those found in normal vasculature. The presence of nuclear pores may be directly related with a better vascular structure and in consequence less leakage in the fluorangiography in high caliber vessels.

Key words: Corneal neovascularization, electron microscopy, corneal fluorangiography

*Fundacion Hospital de Nuestra Señora de la Luz I.A.P. Departamento de Córnea. Ezequiel Montes 135, Col. Tabacalera Del. Cuauhtemoc C.P. 06030, México D.F. Tel. 51281140. E.Mail: miriamb72@yahoo.com

**Departamento de Patología Ocular, APEC.

***Departamento de Patología, Laboratorio De Microscopía Electrónica, Facultad de Veterinaria y Zootecnia UNAM.

INTRODUCCIÓN

Gracias a los estudios realizados previamente por Baca y cols. en las tres etapas previas con fluorangiografía corneal y el sistema de Imagen Digital, hoy día podemos identificar con mayor facilidad la presencia o ausencia de vasos corneales de neoformación, ya sea superficiales o profundos, y con ello establecer el patrón de fuga de estos vasos (Figs. 1 y 2). Esta fuga se lleva a cabo en las “asas” vasculares ya descritas, donde da la impresión de un retorno vascular que pudiera ser el cambio de arteria a vena, y éste nuevamente regresa con dirección al limbo. Estas no se encuentran en los troncos vasculares, los cuales no muestran patrón de fuga (1).

Muchos han sido los estudios que se han realizado para entender mejor el origen, fisiopatogenia, inmunohistoquímica, manifestaciones clínicas y tratamientos para la neovascularización corneal, la mayoría de ellos realizados de forma experimental en animales. Sin embargo, son pocos los estudios realizados en córneas humanas donde se describan a detalle la histopatología y la microscopía electrónica de estos vasos, esto debido a la dificultad para obtener estos tejidos. Por otra parte, realizar un estudio invasivo en pa-

cientes que serán sometidos a un tratamiento específico, en este caso quertoplastia penetrante, resulta difícil debido al poco número de pacientes que aceptan someterse a ellos y que al mismo tiempo cumplan con las características necesarias para su estudio.

Los vasos arteriales que tienen una capa muscular media uni o bilaminada y una membrana elástica interna bien identificada son las denominadas arterias pequeñas. Cuando la capa media se encuentra discontinua y la membrana elástica interna se pierde parcialmente se conocen como arteriolas. Finalmente el vaso arterial puede estar reducido a una capa endotelial y ocasionalmente una capa muscular media con ausencia de la capa elástica y se le nombra metaarteriola o arteriola terminal, esta última motivo de nuestro estudio. Estos vasos están provistos de una pared de células endoteliales bien formadas, que pueden variar en cuanto a su altura y estructura de acuerdo con la tonicidad de la capa muscular, influyendo en el diámetro de la luz vascular. Las células endoteliales están íntimamente interdigitadas y las condensaciones citoplásmicas refuerzan algunas áreas de las uniones intercelulares (2).

En cuanto a los capilares, las relaciones de las células endoteliales son de primera importancia en la permeabilidad de los vasos. El contacto de estas células puede variar entre una aposición de las superficies celulares hasta un patrón en gancho que en ocasiones se ve reforzado por una fusión de las células de membrana en contacto.

Las uniones intercelulares pueden existir en varias formas, siendo la más compleja la de tipo *zonulae occludens*, que conforman uniones muy estrechas en forma de un cinturón morfológico presente de forma completa en la unión intercelular. El término *macula occludens* se utiliza frecuentemente para referirse a las uniones estrechas que no son tan extensas como la *zonulae occludens*.

El segundo tipo de unión intercelular es la *zonula adherens*, que muestra un fino, uniforme y delgado espacio intercelular con contenido amorfo, y las membranas de cada célula mantienen su individualidad. Finalmente, una unión localizada llamada desmosoma tiene un espacio intercelular más amplio que contiene una condensación central (2).

La permeabilidad capilar es un término que denota la resistencia de la pared vascular al paso de diferentes sustancias. Fisiológicamente, la pared capilar actúa como una membrana semipermeable, sujeta a las leyes de difusión y filtración, así como a factores de presión hidrostática y osmótica. Los únicos capilares del cuerpo que realmente son impermeables en su totalidad se encuentran en el ojo y en el cerebro, ya que constituyen barreras hematotísulares. Se sabe que la mala formación de la pared vascular ocurre en los vasos de neoformación, sin embargo, no se ha descrito la razón de fuga de estos neovasos a nivel distal y no a nivel del tronco vascular.

En el estudio realizado previamente los hallazgos histopatológicos y de microscopía electrónica nos muestran datos no descritos anteriormente. Observamos que las córneas con y sin fuga de fluoresceína muestran las mismas características en el trayecto de los neovasos: alteración en las zo-

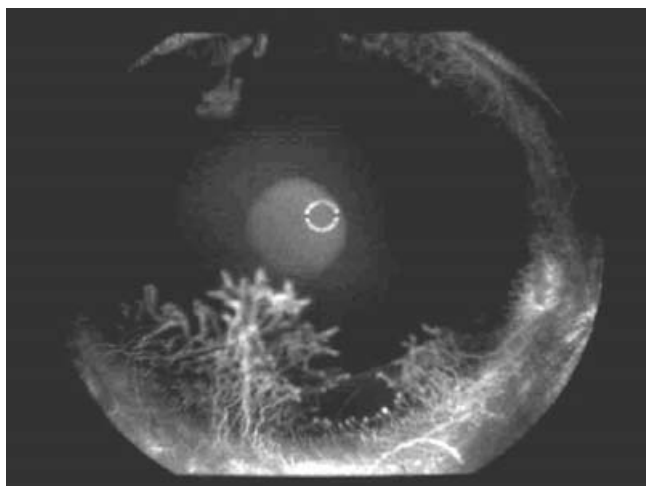


Fig. 1. Definición de patrón arteriovenoso y asas vasculares.

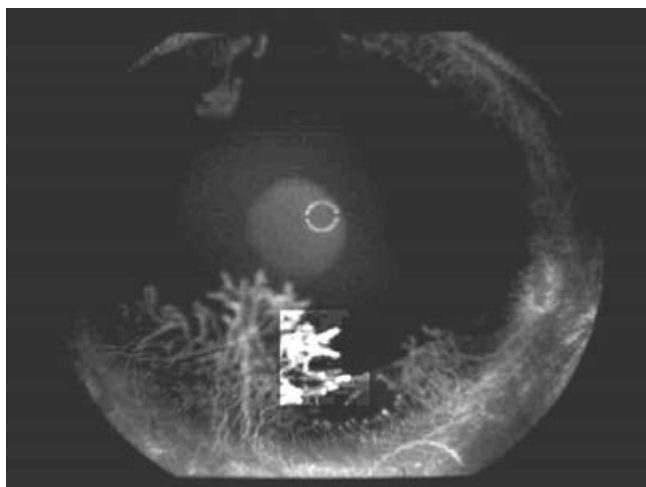


Fig. 2. Filtración de asas vasculares. Imagen en bulbo.

nas de unión o *zonulae occludens* en vasos de menor calibre, la irregularidad de la pared vascular, formada por una sola capa de células endoteliales, la anormalidad en los núcleos y nucleolos de las células endoteliales vasculares que muestran características similares a las de un vaso embrionario (3).

OBJETIVO

Investigar las diferencias anatomopatológicas por microscopía electrónica de transmisión de los vasos de mayor calibre o troncos vasculares y los vasos de menor calibre que forman asas vasculares y correlacionar los mismos con los resultados de la fluorangiografía corneal en botones corneales con neovascularización.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realiza un estudio prospectivo, transversal, descriptivo y observacional, el cual se lleva a cabo en el departamento de Córnea de la FHNSL, en conjunto con los departamentos de Retina de la FHNSL para la realización de la Fluorangiografía corneal y de Microscopía Electrónica en la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, para la realización del estudio histopatológico con microscopía de luz y microscopía electrónica, respectivamente, durante el período de marzo a noviembre de 2002.

Estudiamos los botones corneales obtenidos de pacientes con neovascularización corneal y fluorangiografía previa, que requieren de rehabilitación visual y son sometidos a tratamiento con queratoplastia penetrante (QPP). Incluimos todos aquellos pacientes de cualquier género, mayores de 15 años para facilitar su colaboración durante la fluorangiografía corneal, con la presencia en la biomicroscopía de neovascularización corneal total o parcial, superficial o profunda. Se excluyeron aquellos pacientes que presentan alergia a la fluoresceína, descompensación corneal, adelgazamiento corneal importante, datos de actividad inflamatoria corneal severa, así como alteraciones en el botón corneal sufridas durante la cirugía o posterior a ella.

Realizamos el estudio fluorangiográfico a los pacientes previamente seleccionados que cumplieron con los criterios de inclusión, estableciendo los patrones fluorangiográficos ya descritos anteriormente. Posteriormente se tomaron los botones corneales de estos pacientes por medio de QPP, incluyéndolos en formol al 10% buferado y se enviaron al Departamento de Patología y Microscopía Electrónica de la Facultad de Zootecnia y Veterinaria de la UNAM, donde fueron sometidos a un estudio de microscopía electrónica encaminado a la neovascularización corneal.

Previo a la realización de la fluorangiografía solicitamos el Consentimiento Informado a los pacientes estudiados, posteriormente utilizamos el sistema digital ImageNet 2000 (TOPCON) con cámara fluorangiográfica y fluoresceína al 20%. Se coloca la cateterización en la vena cubital anterior preferentemente del mismo lado del ojo a estudiar. Poste-

riormente tomamos imágenes anéritas, a continuación se inyectan 3cc de fluoresceína en 2 segundos y durante los 4 minutos siguientes tomamos fotografías seriadas. En un segundo tiempo analizamos las imágenes. Una vez establecidos los patrones de las fluorangiografías estudiadas, de acuerdo con las fases ya descritas por Vieyra y Baca (1), se establece una correlación descriptiva con los hallazgos histopatológicos, y se uniforman criterios en la medida de lo posible.

RESULTADOS

Incluimos once pacientes con neovascularización corneal diagnosticada por biomicroscopía. Todos ellos fueron sometidos a fluorangiografía corneal con ImageNet y posteriormente a queratoplastia penetrante. Los diagnósticos clínicos de estos pacientes fueron: Queratitis Intersticial en 8 de ellos, uno con pannus corneal, rechazo de queratoplastia penetrante en uno y fallo primario en otro.

En la fluorangiografía corneal se observaron asas vasculares con patrón de fuga o imagen en bulbo en diez de ellos (Figs.1 y 2). Solamente un paciente no presentó fuga de fluoresceína, mismo que fue diagnosticado con pannus.

En la microscopía electrónica de los diez especímenes con fuga de fluoresceína se observaron cambios en la pared del endotelio vascular en distintas presentaciones de acuerdo con el calibre de los vasos: en los vasos de mayor calibre o troncos vasculares encontramos mayor número de vesículas pinocíticas a nivel de la pared de la célula endotelial, así como mayor número de filamentos intermedios en la pared vascular, las uniones intercelulares tipo *zonulae occludens* no presentaron alteraciones importantes, y en el núcleo de las células endoteliales existió un mayor número de poros nucleares (Fig. 3).

Los vasos de menor calibre o metaarteriolas, mismas que forman las asas vasculares, presentaron mayor número de vacuolas (Fig. 4), lo que puede estar relacionado con alteraciones en el transporte intercelular, uniones intercelulares tipo *zonulae occludens* interrumpidas y discontinuas, menor número de poros nucleares y escasas vesículas pinocíticas.

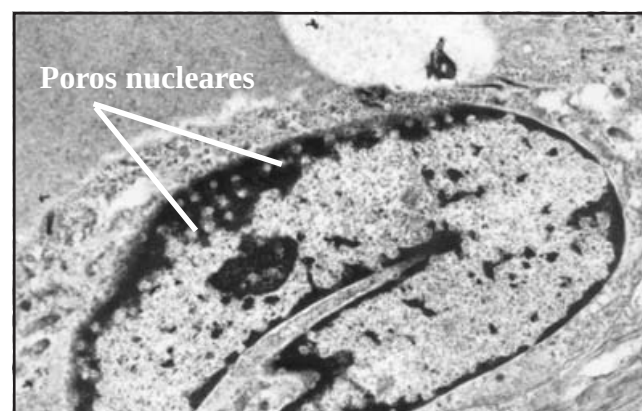


Fig. 3. Fotomicrografía del núcleo de la célula endotelial.

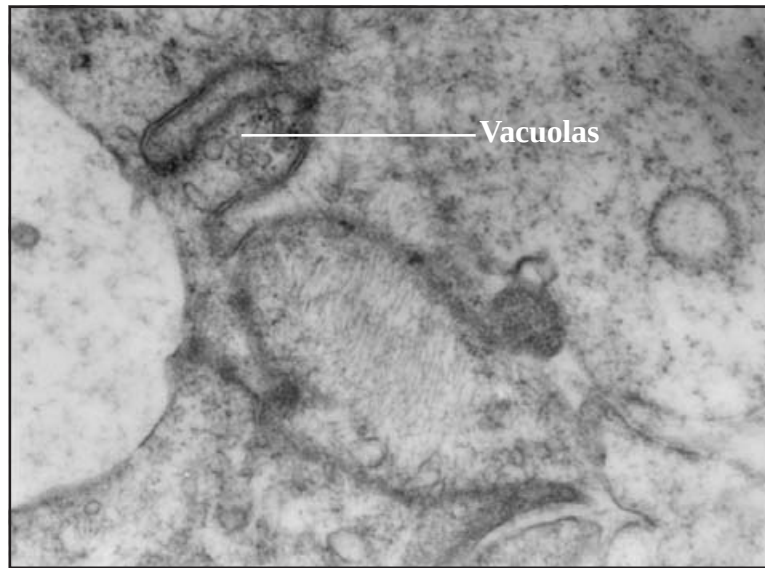


Fig. 4. Fotomicrografía de metaarteriola



Fig. 5. Fotomicrografía de unión tipo *zonulae adherens*.

DISCUSIÓN

La neovascularización corneal es un tema que aún despierta muchas dudas en la investigación médica ya que continúa siendo una patología incapacitante visualmente de difícil manejo y, en la mayoría de los casos, de etiología desconocida así como evolución tórpida.

El estudio de esta entidad por medio de microscopía electrónica de transmisión se ha llevado a cabo de forma importante en animales no así en córneas humanas por la dificultad para obtener especímenes aptos para su estudio y que no sufran cambios durante su obtención o conservación.

Un estudio realizado en 1983 por Burger y colaboradores (4) en ratas reportó que 27 horas después de inducir lesión corneal los vasos corneales emergen de los vasos limbales pericorneales así como de los capilares. Posteriormente, a las 72 horas, se observó un crecimiento importante de los mismos y la formación de anastomosis firmes con crecimiento de arteriolas. Sin embargo, no observaron crecimiento de

nuevos vasos a partir de las arteriolas. En otro estudio realizado por los mismos autores en 1985 utilizaron conejos para observar los neovasos corneales con fluorangiografía donde las asas vasculares están formadas por vasos musculares o arteriolas que transportan la sangre en sentido distal y vénulas o vasos no musculares que retornan la sangre a los vasos limbales, confirmando que los neovasos surgen de capilares venosos en el limbo (5). Al observar los neovasos corneales por medio de un microscopio, Hayashi y colaboradores (6) encontraron que los vasos de neoformación corneal inducidos por quemaduras por álcali en animales presentan una pared vascular simple a nivel distal mientras que la pared de los troncos vasculares está cubierta por pericitos.

Aun así, no encontramos reportes que distingan de forma específica los troncos vasculares de las asas distales de acuerdo con los resultados fluorangiográficos, como lo describimos en nuestros resultados. La filtración de las asas vasculares se debe probablemente a las alteraciones en la pared vascular tanto en su soporte, dado por los filamentos interme-

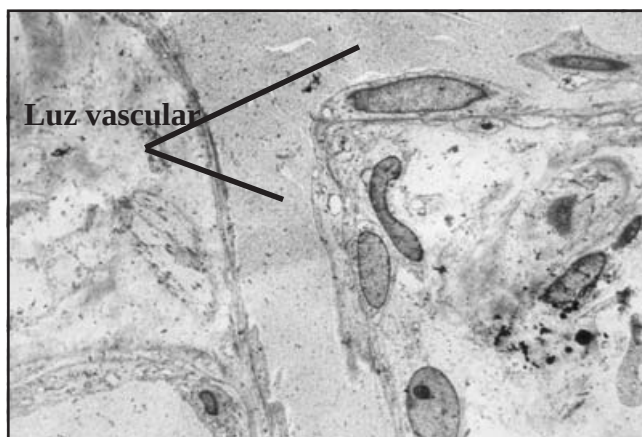


Fig. 6. Fotomicrografía de dos vasos de menor calibre.

dios y las uniones intercelulares tipo *zonulae occludens*, como en el transporte intercelular y a través de la luz vascular, reflejada en el menor número de vesículas pinocíticas y el mayor número de vacuolas. La presencia de poros nucleares en mayor cantidad observada en los vasos de mayor calibre o troncos vasculares podría estar relacionada con una mayor protección en la pared vascular de los mismos, hallazgo que no se encuentra en los vasos de menor calibre o vasos terminales (Figs. 5 y 6). Los vasos de mayor calibre se pueden considerar prácticamente de características normales si los comparamos con otros vasos del mismo calibre a nivel perilimbal, lo que nos llama la atención por tratarse de vasos de neoformación (8-13).

Otra pregunta por resolver es entender de qué forma influye esta fuga a nivel distal en la persistencia y proliferación de estos vasos de neoformación y su influencia en el transporte de factores relacionados con la inflamación corneal. Entender la anatomía microscópica de estos vasos nos ayuda a entender cómo puede llevarse a cabo la fisiopatología de esta entidad, siendo éste un eslabón más en la investigación de la neovascularización corneal.

CONCLUSIONES

- La microscopía electrónica de transmisión muestra evidencia de menor daño a nivel de la pared vascular en los vasos de mayor calibre en comparación con los de menor calibre.

- La pared vascular de los vasos de neoformación de mayor calibre presenta características muy similares a las de la vasculatura normal.
- La presencia de poros nucleares puede estar directamente relacionada con una mejor estructura a nivel de la pared vascular y, como consecuencia, a una menor fuga de fluoresceína en los troncos vasculares.
- Los vasos de menor calibre presentan características anormales en su pared vascular tanto en las uniones intercelulares como en el soporte de pared que están en estrecha relación con la fuga de fluoresceína.

REFERENCIAS

1. Vieyra M, Baca O, Velasco R y cols. Fluorangiografía corneal: Fase III. ARVO, IOVS, 2000.
2. Kottow MH. Anterior Segment fluorescein angiography. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1978. Caps. 1, 3 y 5.
3. Betech M, Baca O, Velasco R, Viggiano D. Hallazgos histopatológicos de la neovascularización corneal y su correlación con la fluorangiografía corneal, ARVO, IOVS, 2002.
4. Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK. Corneal neovascularization as studied by scanning electron microscopy of vascular casts. Lab Invest 1983; 48(2):169-80.
5. Burger PC, Chandler DB, Klintworth GK. Experimental corneal neovascularization: biomicroscopic, angiographic, and morphologic correlation. Cornea 1985-86; 4(1):35-41.
6. Hayashi K, Ishibashi T. In vivo observations on experimental corneal neovascularization with newly developed microscope. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1991; 229(5):473-9.
7. Daxer A, Ettl A. Corneal vascularization and its relation to the physical properties of the tissue, Curr Eye Res 1995;14(4):263-8.
8. Eliason JA. Leukocytes and experimental corneal neovascularization. IOVS 1978; 17(11):1087-95.
9. Schanzlin DJ, Cyr RJ, Friedlaender MH. Histopathology of corneal neovascularization. Arch Ophthalmol 1983; 101(3):472-4.
10. Hemady RK, Baer JC, Foster CS. Biomicroscopic and histopathologic observations after laser photocoagulation in a rabbit model of corneal neovascularization. Cornea 1993; 12(3):185-90.
11. Alzamora JB y col. Photodynamic therapy with green indocyanine in corneal neovascularization, ARVO, IOVS, 2002.
12. Vidan A y col. Corneal neovascularization in two models of chemical burn: alkali and sulfur mustard, ARVO, IOVS, 2002.
13. Saura R, Matsubara T, Mizuno K. Inhibition of neovascularization in vivo by gold compounds. Rheumatol Int 1994; 14(1):1-7.

Cita histórica:

En el Siglo XII, **Sams-ad-Din** del Cairo, describe el cuadro clínico del glaucoma: dolor ocular, hemi-cránea, dilatación pupilar, catarata y ceguera.