

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

F. SALADO¹, F. J. FERNANDEZ-TRUJILLO² Y M. ROSETY³
Cádiz, España

Desde que iniciamos las técnicas de la queratotomía radial ha sido una constante preocupación para nuestro equipo, el poder contribuir al conocimiento de la evolución cicatricial de la incisión; es decir, la respuesta del epitelio, del estroma corneal y las posibles repercusiones sobre el endotelio que en cierta medida pudieran ser las responsables del "glare", la visión fluctuante, la impredecible corrección y el propio sufrimiento endotelial al ser agredida la córnea sana. Si bien es verdad que las incisiones no son perforantes que dañen directamente el endotelio, se pueden producir lesiones "a distancia" si consideramos el espesor corneal y la cercanía de la descemet que podría sufrir la agresión quirúrgica y esta a su vez provocaría a este nivel una descompensación de las células endoteliales.

Por otra parte el estudio queda restringido a tiempos precoces de la cicatrización, conocido como es el comportamiento regenerativo de la córnea de conejo principalmente del endotelio, si queremos compararlo con lo que pudiera ocurrir en la córnea humana escindida.

Nuestro proyecto de trabajo ha quedado dividido en dos fases consecutivas:

a) Estudio morfoestructural e histoquímico de la cicatrización a nivel de epitelio.

b) Repercusiones morfoestructurales e histoquímicas a nivel de endotelio con incisiones más profundas.

-
1. Prof. de Oftalmología. Fac. Medicina. Univ. de Cádiz.
 2. Prof. Ayte. de Anatomía. Fac. Medicina. Univ. de Cádiz.
 3. Prof. de Anatomía. Fac. Medicina. Univ. de Cádiz.

En estos momentos nos limitamos al estudio del epitelio a fin de conocer los cambios morfoestructurales así como las posibles alteraciones macromoleculares y enzimáticas.

MATERIAL Y METODO

Se utilizan conejos albinos New Zeland de 2 a 3 kg de peso, operados bajo anestesia sedativa con inyección intramuscular de ketamina y anestesia tópica con Benoxinato:

Técnica quirúrgica: Marcada una zona óptica de 3 mm se realizan seis incisiones con cuchillito de experimentación al 50% de profundidad. Las incisiones fueron realizadas desde la zona óptica al limbo intentando no lesionar los vasos periféricos para evitar hemorragias. Irrigación de las incisiones comprobando que no hubo perforación. Los ojos fueron enucleados y disecadas las correspondientes córneas en los siguientes tiempos postcirugía:

1 hora, 3 horas, 6 horas, 24 horas.

3 días, 7 días, 15 días.

1 mes, dos meses, cuatro meses, seis meses y ocho meses.

Técnica de fijación e inclusión: Fijación en formaldeído al 10% tamponado con solución de fosfato pH= 7.2, 0.02 M, para un lote de córneas y líquido fijador de Bouin durante 30 min, para otro. Después de numerosos lavados se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y fueron aclarados en benzoato de metilo y benzol. Las piezas para el estudio histoenzimológico fueron congeladas a 20°C y cortadas con un criótomo de congelación.

La inclusión se realizó en parafinas semisintéticas de punto de fusión medio, 54-56 grados centígrados, realizándose cortes de 5-7 micras de espesor tanto para el estudio morfoestructural como histoquímico. Para el estudio de microscopia electrónica se fijaron en glutaraldeído al 3% y postfijación en tetróxido de osmio-tampón de Palade. La inclusión se realiza en Durcupan.

Método general de coloración: Para el estudio morfológico se empleó la técnica de Hematoxilina-Eosina de Harris modificada y Hematoxilina V. O. F. de Gutiérrez.

Métodos histoquímicos: Para la determinación de la presencia de glucógeno y o mucopolisacáridos neutros se han empleado las reacciones del PAS y Diastasa-PAS bloqueo con Dimedona-PAS.

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

Los grupos sulfatos y carboxilos de los mucopolisacáridos ácidos fueron estudiados mediante las técnicas del azul Alcian pH = 0.4, pH = 1 y pH = 2.5 y las técnicas de H. I. D. (Diamina de alto contenido en hierro) y de HALE respectivamente, así como sus correspondientes bloqueos.

La existencia de metacromasia se puso de manifiesto con Azul de Toluidina. Para el estudio de restos glicosídicos de glicoproteínas se usaron lectinas tipo concanavalin - A y WGA. Para actividad enzimática, fosfatasa ácida y alcalina (Gomori).

Resultados. Ya hemos comentado en un trabajo anterior cómo el proceso reparador es muy precoz. Igualmente sabemos que según la naturaleza del corte así será la evolución. En los cortes limpios, de bordes adosados, el epitelio salta entre ellos recubriendo la incisión. En los cortes de evolución menos favorable con bordes separados, sabemos de la presencia de un revestimiento de epitelio hasta la profundidad de la incisión, dando lugar a medida que transcurre el tiempo a un tapón epitelial que en el plazo de ocho meses será reabsorbido, no quedando vestigios significativos a nivel epitelial ni estromal.

Con hematoxilina Eosina, un día postincisión observamos la invasión epitelial en el tercio externo de la cicatriz; invasión que parece corresponder al estrato medio del epitelio. En el estroma hay aumento de queratocitos que evolucionan hacia la incisión y producen cierta retracción estromal. A las 6 horas (hematoxilina-VOF), observamos una evolución benigna de la incisión y se inicia la cicatrización desde el fondo hasta la porción más externa de la incisión.

La figura No. 1 es un detalle de un tapón epitelial de 7 días (H-E). Vemos como salta la porción más superficial del epitelio, la capa basal del tapón es similar a la basal del epitelio, la zona central del tapón es muy anárquica y está formada por la porción media del epitelio. En el estroma observamos la emigración de los queratocitos hacia los bordes de la incisión, estando por debajo del tapón muy desordenados en el proceso de cicatrización. En la H-VOF de un mes se confirma lo anterior (Fig. 1 bis). La capa basal del epitelio forma la basal del tapón, la porción central corresponde a la capa media del epitelio. En el estroma, una cierta ordenación de las laminillas, mostrándose desestructurada y retraída la zona de cicatriz.

Las observaciones recogidas respecto al estudio histoquímico quedan reflejadas de la siguiente manera:

-- Con respecto a la reacción del PAS diferenciamos (Figs. 2 y 2 bis) a las 6 y 24 horas una capa superficial de una intensidad débil al igual que la capa basal y

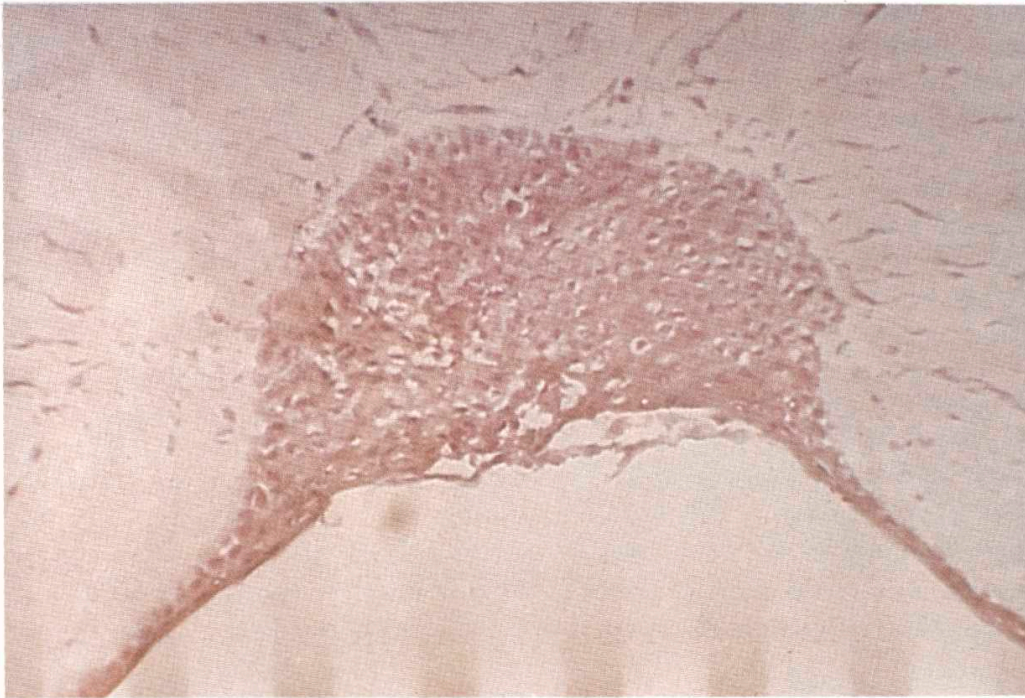


FIGURA 1
Hematoxilina - Eosina 7 días.
25 X Detalle de tapón epitelial.

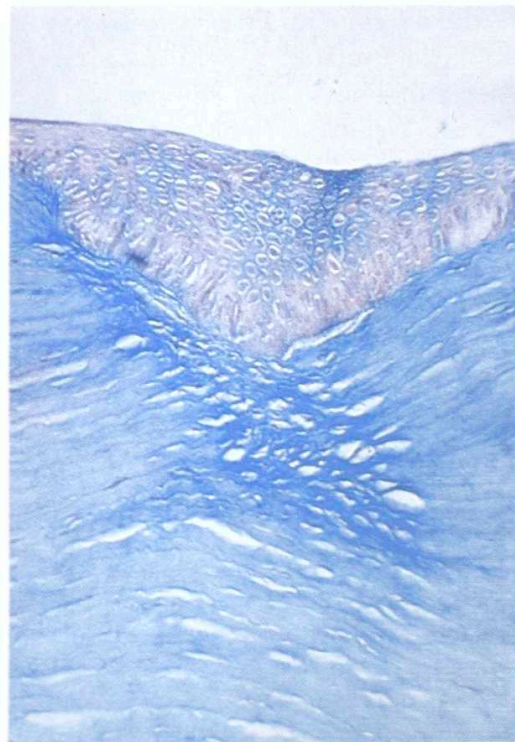


FIGURA 1 Bis
Hematoxilina - VOF
1 mes. 25 X.

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

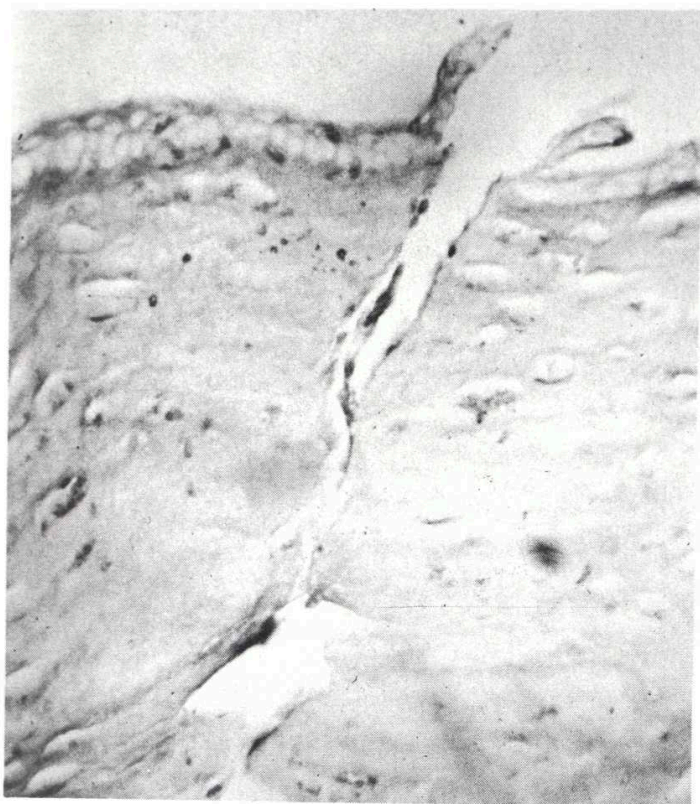
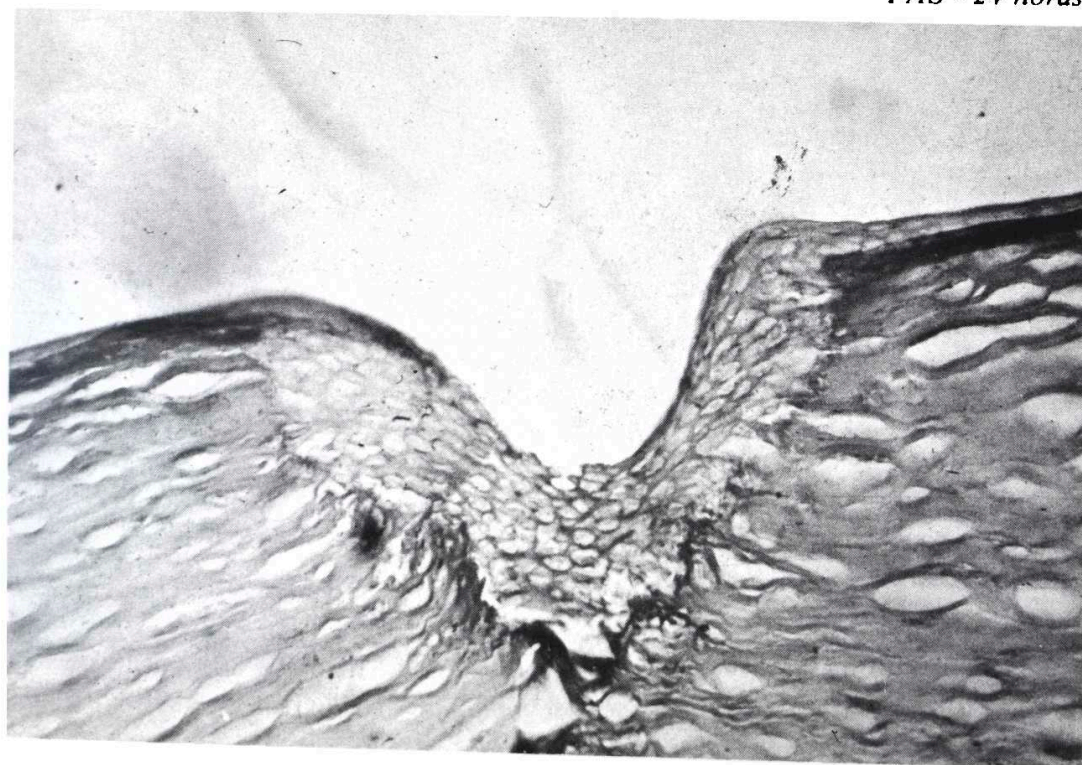


FIGURA 2
PAS - 6 horas.



FIGURA 2 Bis
PAS - 24 horas.



una capa media muy débil para las primeras seis horas. El estroma es PAS positivo y los queratocitos son discretamente positivos. A partir de las 24 horas y hasta los 8 meses estas intensidades aumentan algo más. Cuando existe tapón epitelial, la porción superficial así como la basal se comportan de manera semejante, ocupando el resto del tapón células emigradas de comportamiento similar a la capa intermedia del epitelio. La reacción estromal sigue una intensidad media durante la evolución.

— Con respecto a las tinciones con Azul Alcian a pH= 2.5, pH= 1 y pH= 0.4 una hora, y 24 horas. (Figs. 6 y 6 bis).

A pH= 0.4 el Azul Alcian determina los grupos sulfatados de las mucosustancias ácidas. En la primera hora no se observa invasión epitelial en la incisión, el epitelio en su porción superficial es negativo y la capa basal algo más positiva. El estroma es positivo pero más débil que a pH= 2.5. A las 24 horas el epitelio superficial es positivo discretamente y el tapón epitelial negativo como la porción media del epitelio. (Fig. 3 y Fig. 3 bis).

El Azul Alcian a los 3-15 días (Figs. 4 y 4 bis pH= 0.4) muestra la capa superficial del epitelio intensamente positiva cubriendo la incisión, mientras que la porción media es de menor intensidad. El tapón epitelial es de muy débil intensidad y se muestra en retracción y fase de eliminación. A los 15 días observamos el mismo comportamiento.

— Con respecto al Azul de Toluidina se observa metacromasia solo a nivel del estroma (Figs. 5 y 5 bis, una hora y 15 días).

— Con el uso de la lectina Wheat Germ AGG (WGA) (Fig. 6 y 6 bis, 24 horas y 7 días), ponemos de manifiesto a nivel de epitelio glicoproteínas que contienen radicales D-N Acetil-Glucosamina o Acido N-Neuroamínico. La WGA marca la superficie de la célula y lo que identificamos son los azúcares que están en las membranas celulares y membranas del aparato de Golgi entre otras. El epitelio superficial es positivo así como la porción basal. Se ven residuos de epitelio en la incisión (24 horas), confirmando la presencia de epitelio. Los queratocitos son positivos emigrando hacia la zona de cicatriz.

A los 7 días el epitelio tiene igual comportamiento y la parte central del tapón se comporta como la zona media del epitelio. El tapón está retraído y la incisión cubierta por epitelio. Estroma cicatricial no muy ordenado con aumento de queratocitos hacia la zona de incisión.

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

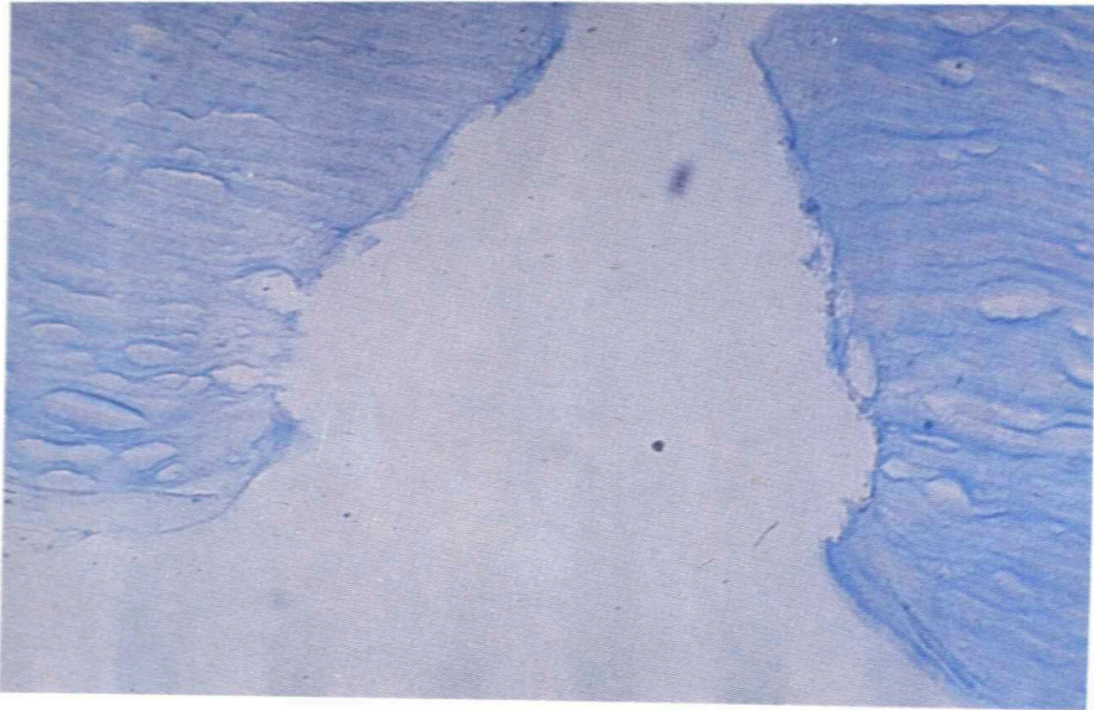


FIGURA 3
Azul Alcian Ph = 0.4. 1 hora

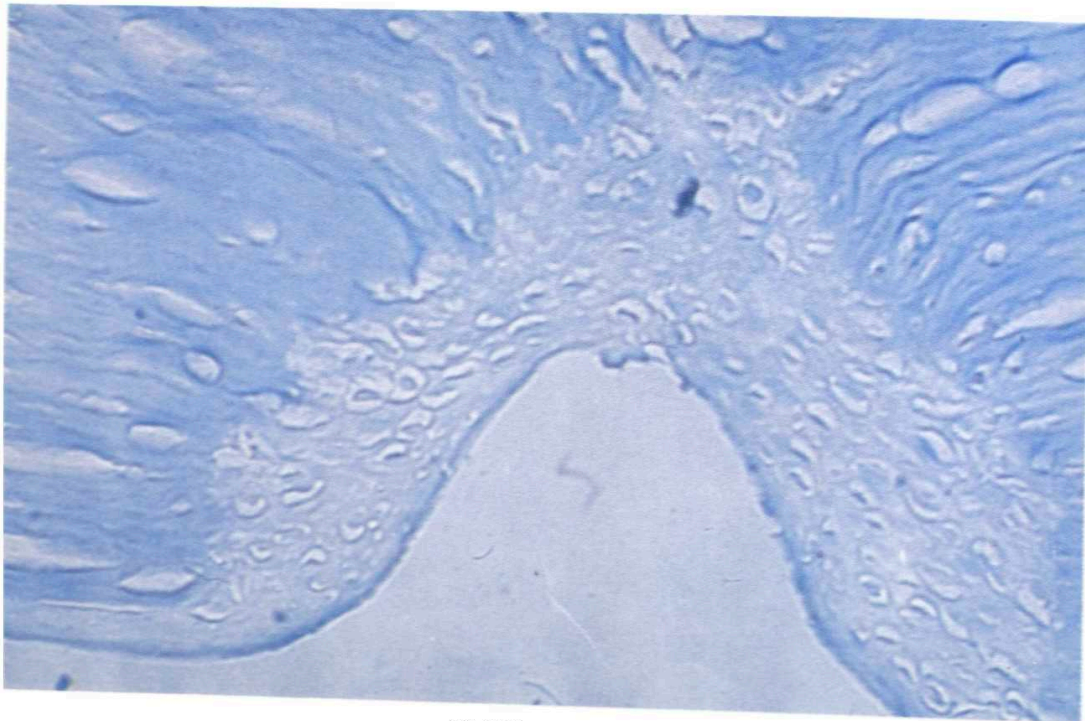


FIGURA 3 Bis
Azul Alcian Ph = 0.4. 24 horas

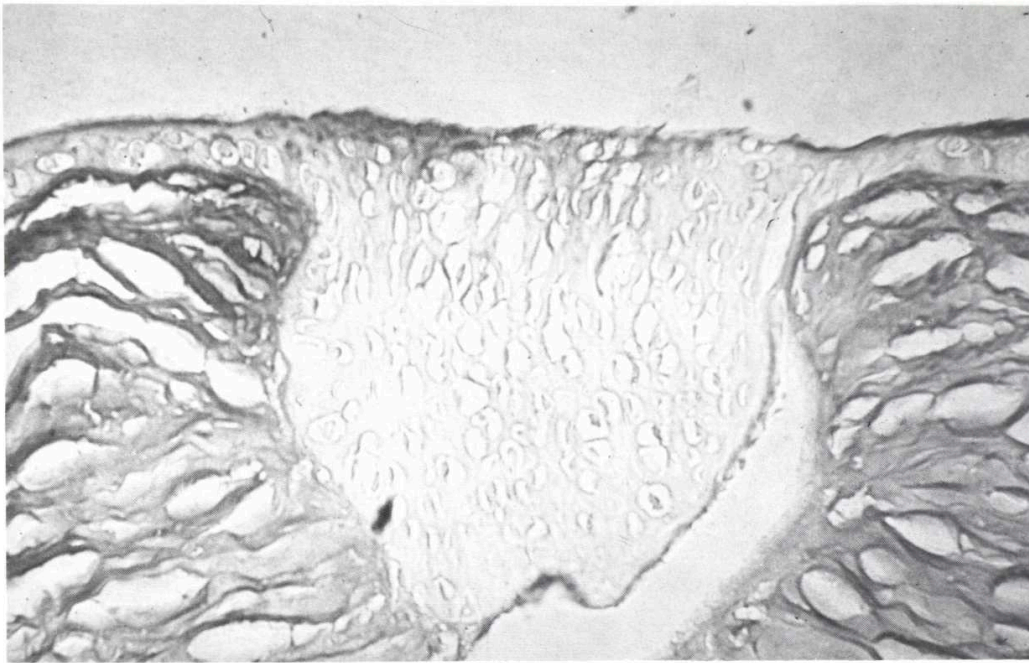


FIGURA 4
Azul Alcian Ph = 0.4. 3 días



FIGURA 4 Bis
Azul Alcian Ph = 0.4. 15 días

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

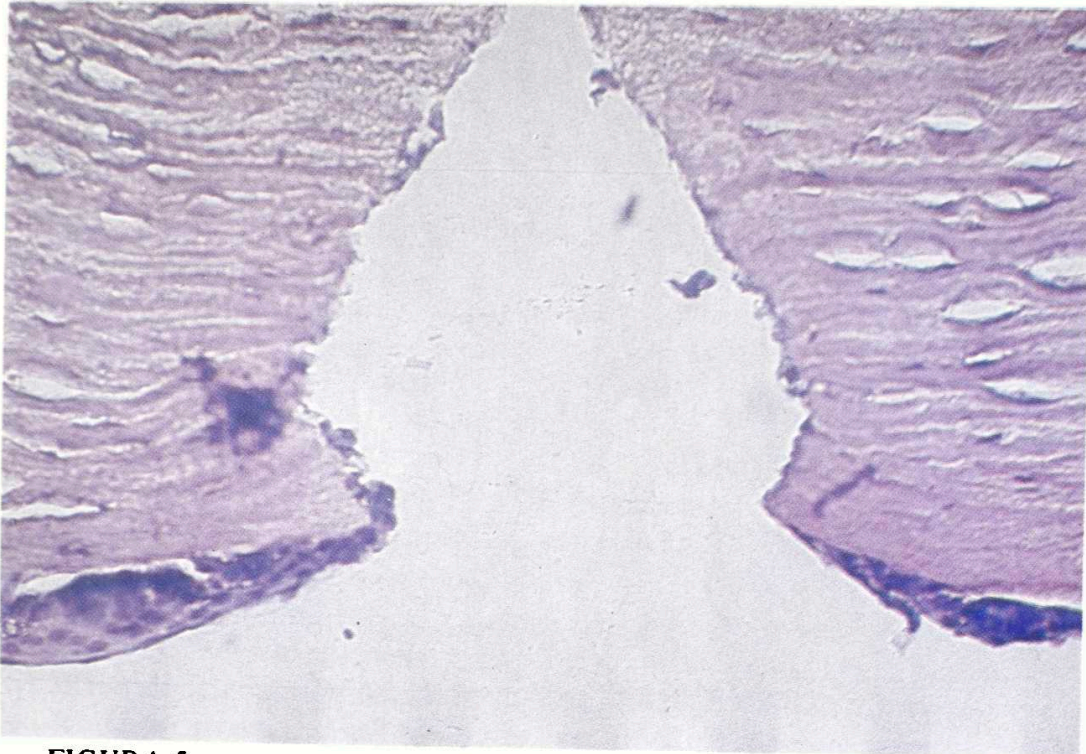


FIGURA 5
Azul de Toluidina.
1 hora 25 X



FIGURA 5 Bis
Azul de Toluidina 15 días.
25 X metacromasia
a nivel de estroma.

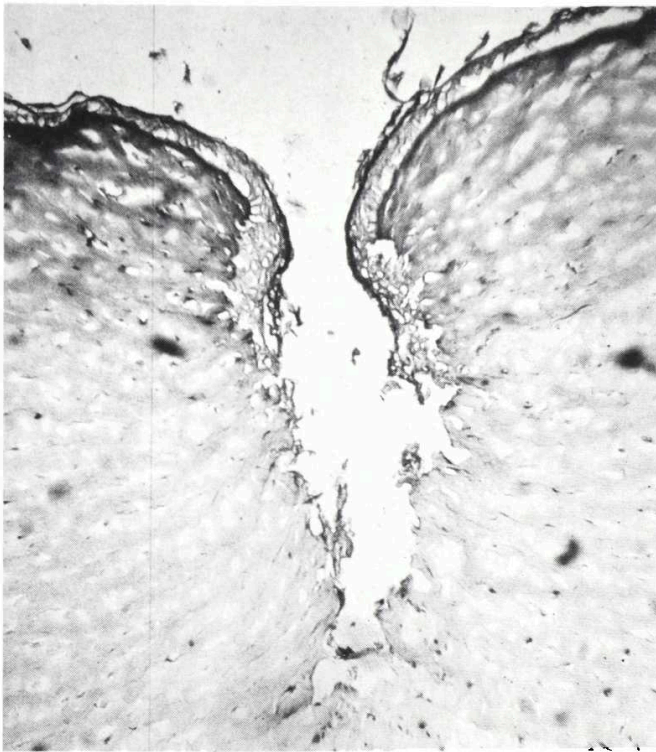


FIGURA 6
Wheat Germ AGG
(WGA). 24 horas

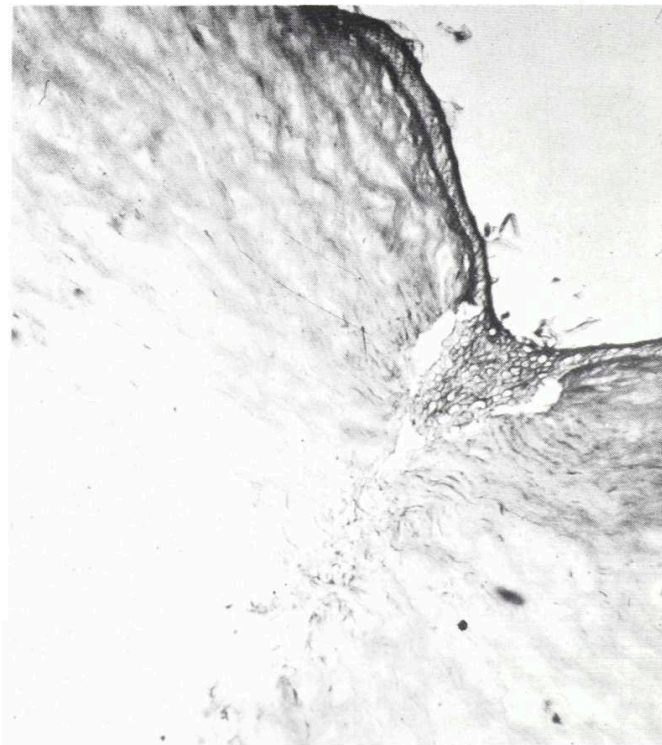


FIGURA 6 Bis
W.G.A. 7 días

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

— La utilización de la Concanavalin-A (residuos manosídicos y glucosídicos) pone en evidencia cierta intensidad a nivel del epitelio diferenciando las capas, valorando que el tapón se comporta como la capa media (Fig. 7, 7 días). Es inespecífica en cuanto a la evolución de la cicatriz; no marca los queratocitos como la WGA.

— La actividad enzimática para las fosfatasaas ácidas (Fig. 8, 24 horas) se muestra muy marcada en el epitelio cuyas capas se comportan prácticamente igual, decreciendo hasta la negatividad según profundizamos en los estratos de la córnea, donde el estroma es negativo y los queratocitos muestran una fuerte actividad.

Con las fosfatasaas ácidas a los 15 días (Fig. 9) el epitelio se muestra positivo aunque la basal es menos positiva. El tapón epitelial igual. Queratocitos positivos emigrados hacia la cicatriz. El estroma cicatricial está desorganizado.

La fosfatasa alcalina (Fig. 10, 7 días) muestra una positividad en epitelio superficial con zona media de menor actividad. Mostrándose la zona superficial del tapón con igual comportamiento que la zona superficial del epitelio e indicando la procedencia del mismo de la zona media. El estroma es negativo, con discreta positividad de los queratocitos.

A los dos meses cuando el proceso reparador está finalizando, la actividad fosfatásica ácida de los queratocitos decrece (Fig. 11) y hay menor cantidad; en la zona de cicatriz se ven algunos puntos positivos de queratocitos. A los 6 meses (Fig. 12 bis), el epitelio y sobre todo su zona media es muy positiva, con tapón en período de eliminación. El estroma sano tiene un comportamiento idéntico al de la zona cicatricial desestructurada y retraída pero no tiene signos histoquímicos que la diferencien del resto del estroma sano. A los 8 meses se observa el residuo final del tapón epitelial como un engrosamiento de la capa media (Fig. 13, F. alcalina). La actividad fosfatásica ácida (Fig. 14) a los 8 meses muestra una zona media epitelial engrosada y estromal cicatricial sana, reparada sin signos histoquímicos de actividad excesiva.

La observación a nivel de Microscopia Electrónica de la córnea, muestra los siguientes datos:

a) A nivel del epitelio corneal se observan dos zonas bien diferenciadas, una de células en empalizada, poliédricas, que se diferencian hacia el exterior en dos capas más, bien diferenciadas. Otra de células epiteliales poliformes con un aumento de uniones interdigitales y de desmosomas, correspondiendo estas a la zona del tapón epitelial, en todos los días estudiados (Figs. 15 y 16).

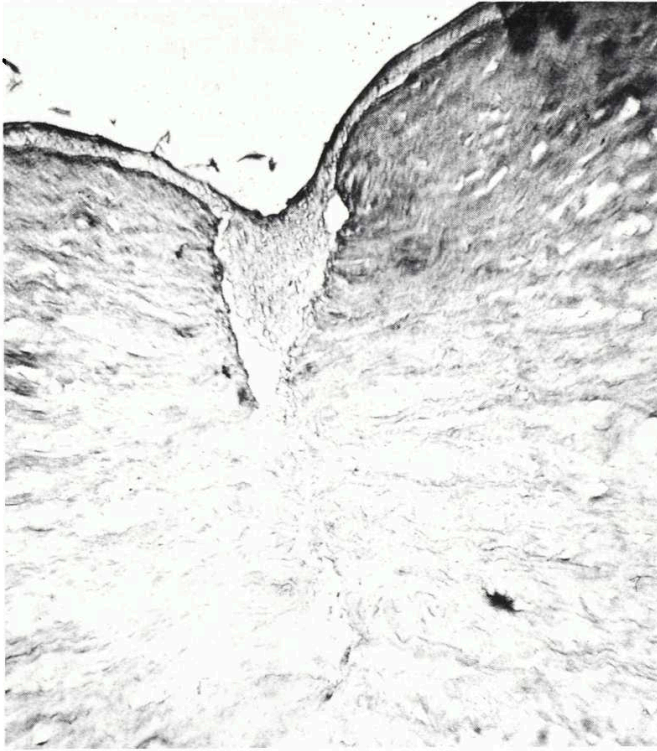


FIGURA 7
Concanavalin A. 7 días

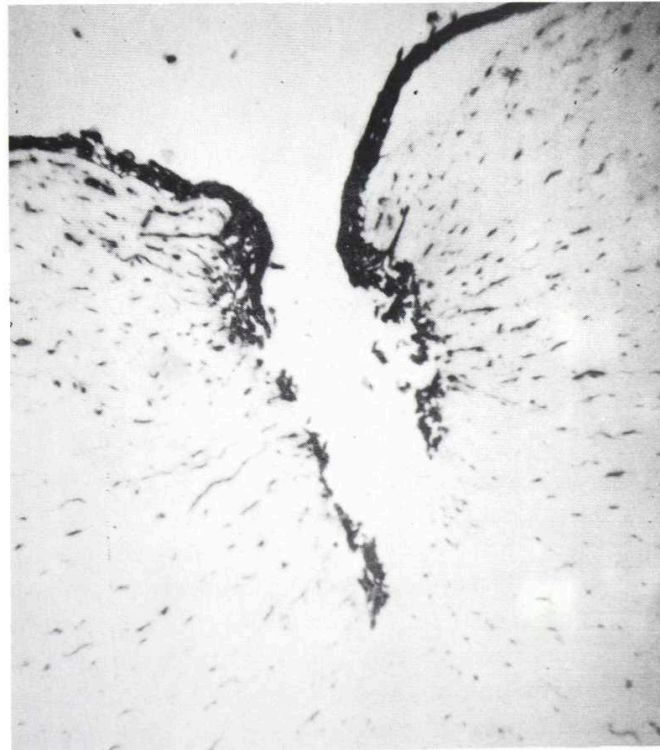


FIGURA 8
Fosfatasas ácidas. 24 horas

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

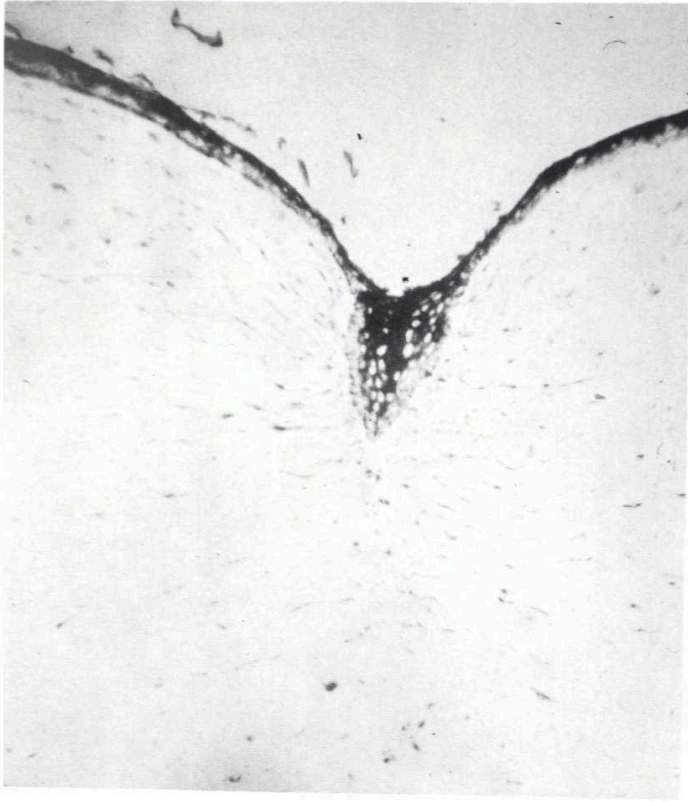


FIGURA 9
Fosfatasas ácidas. 15 días

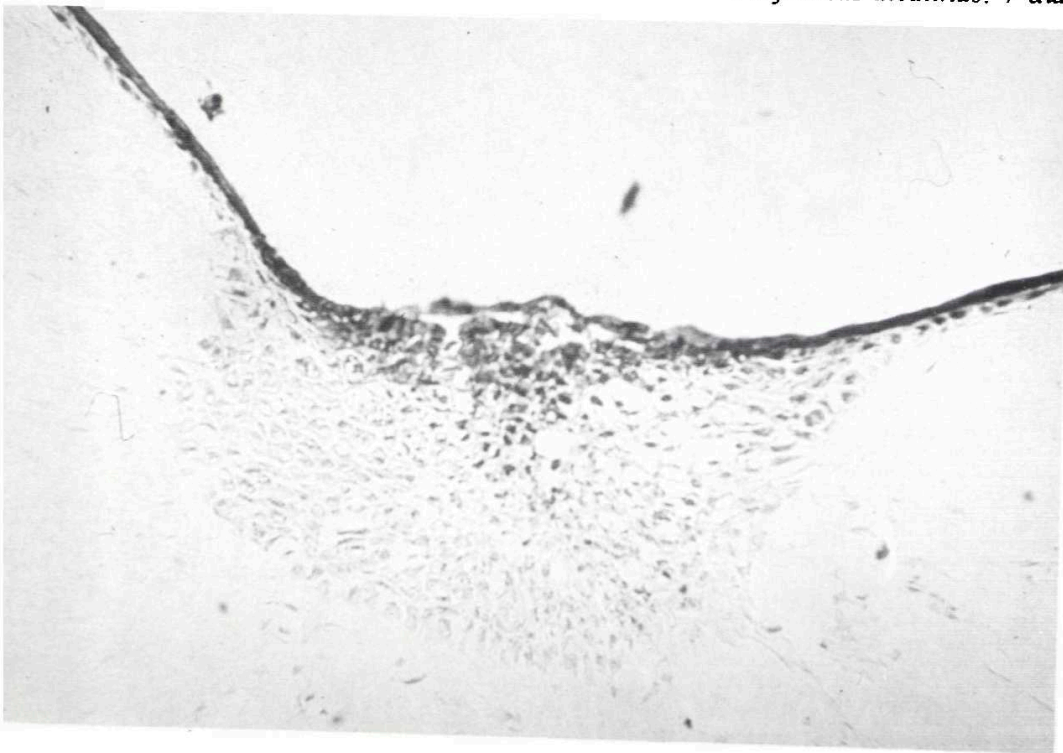


FIGURA 10
Fosfatasas alcalinas. 7 días

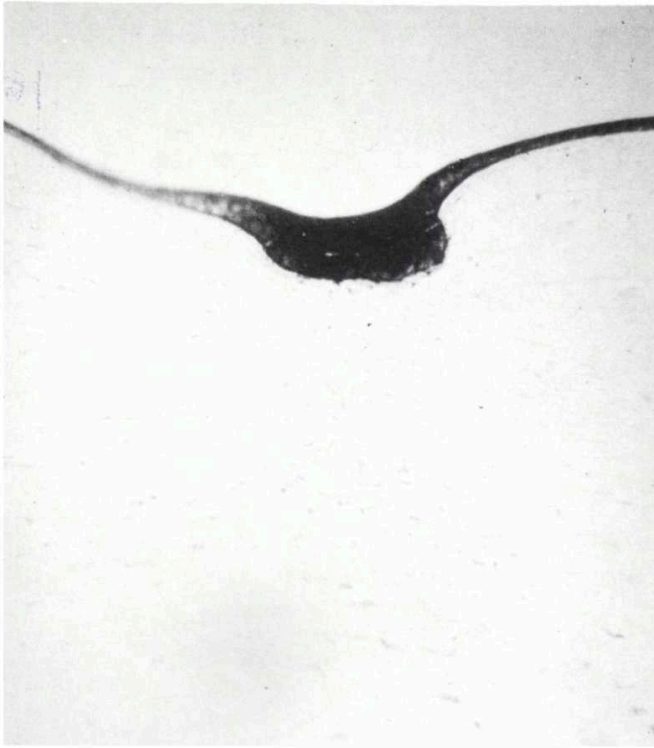


FIGURA 11
Fosfatasas ácidas. 2 meses

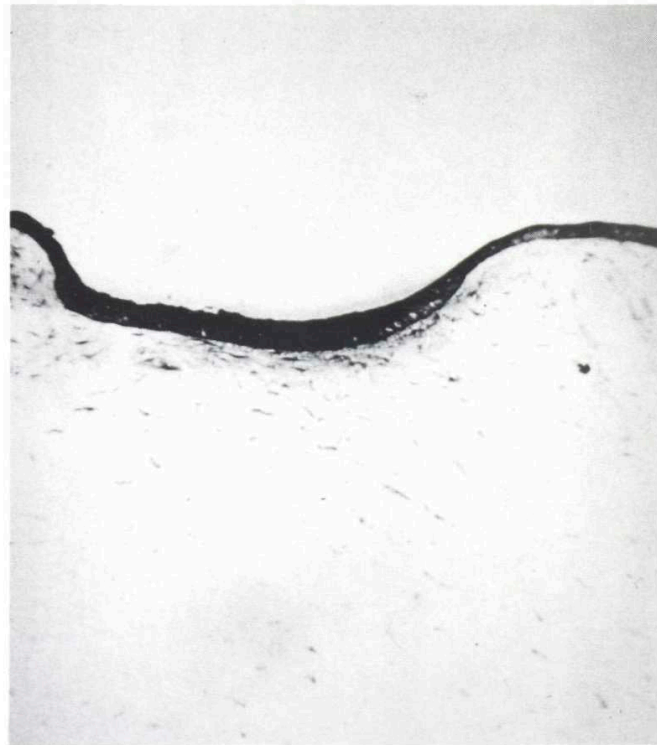


FIGURA 12
Fosfatasas ácidas. 6 meses

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

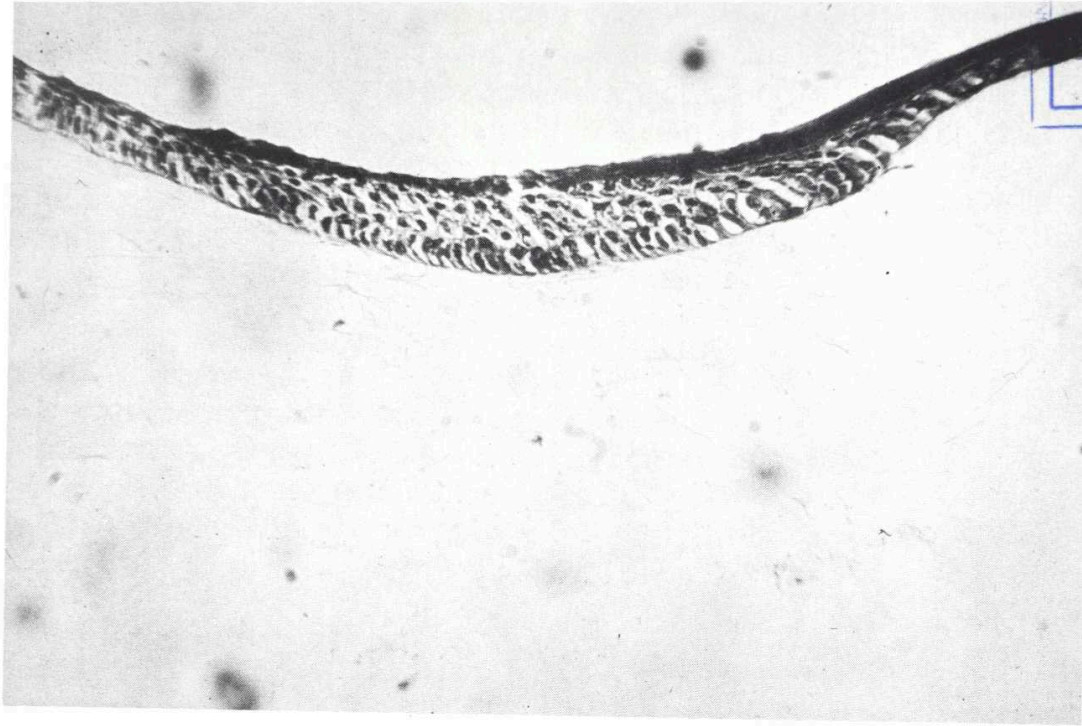


FIGURA 13
Fosfatasas alcalinas. 8 meses

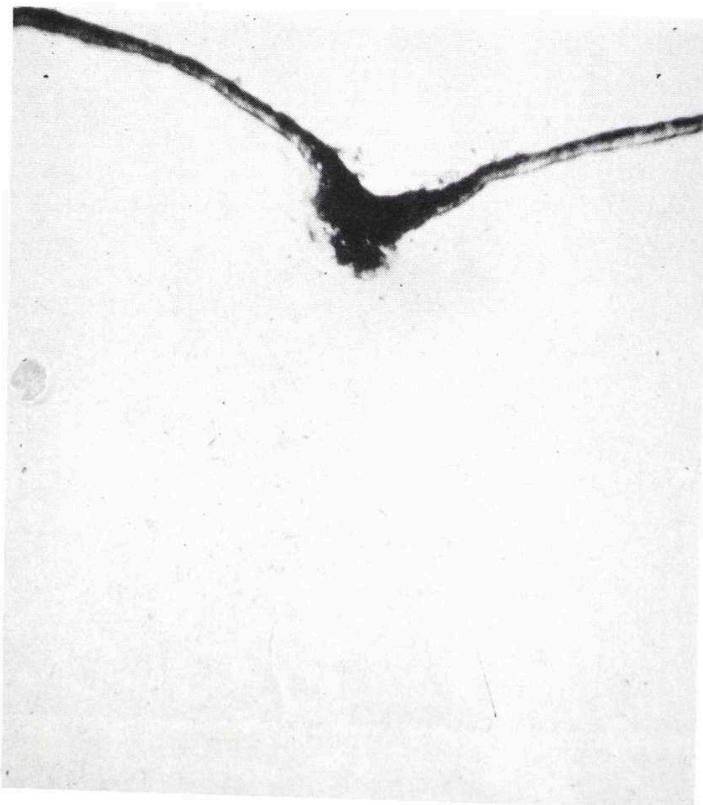


FIGURA 14
Fosfatasa ácida. 8 meses

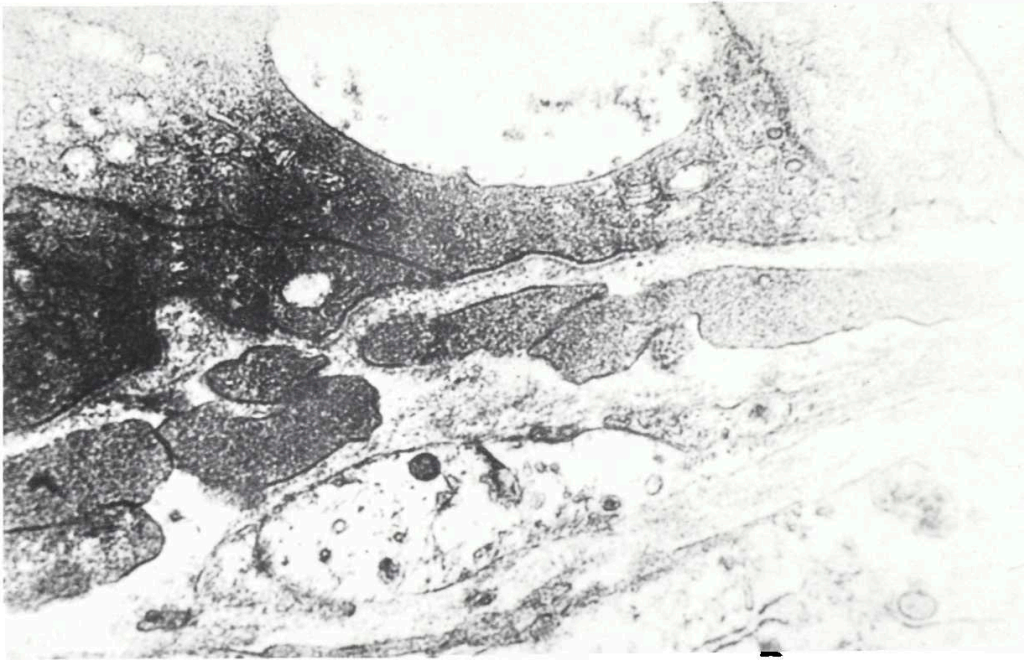


FIGURA 15
Microscopia electrónica. Epitelio Corneal

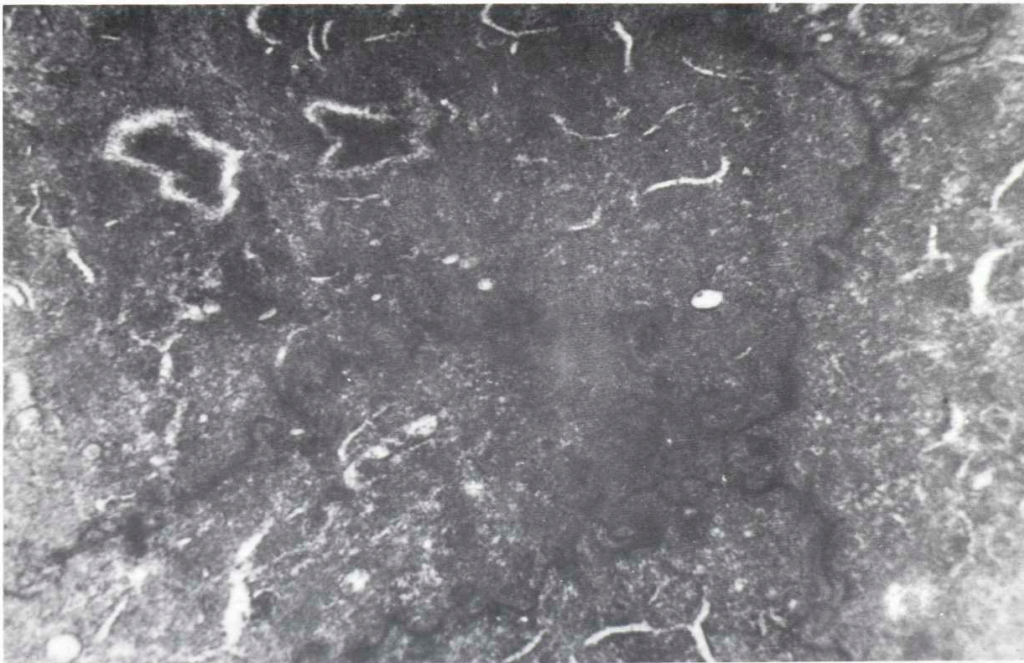


FIGURA 16
Microscopia electrónica. Epitelio Corneal

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

b) A nivel estromal se observan cambios bien patentes en la proximidad de la zona neoepitelial (tapón) y cicatriz estromal, con aumento de fibroblastos (queratocitos) que tienen aumento evidente de la densidad organular, con aumentos del retículo endoplásmico rugoso y Golgi. La sustancia fundamental del estroma en estas zonas pierde su ordenación siendo distribuida de una manera más bien anárquica (Figs. 17 y 18).

CONCLUSION

De las observaciones morfoestructurales deducimos la aparición muy precoz de un tapón epitelial según la naturaleza del corte. Si los bordes quedan bien adosados el epitelio salta entre ellos recubriendo la incisión; si los bordes quedan muy separados, la incisión se reviste de epitelio hasta la profundidad de la misma dando lugar a un tapón epitelial a medida que transcurre el tiempo de evolución a expensas de la capa media del epitelio y que en el plazo de 8 meses, según nuestras observaciones, será reabsorbido, no quedando vestigios a nivel epitelial ni estromal.

Desde el punto de vista histoquímico deducimos la presencia de mucopolisacáridos ácidos mixtos a nivel de estroma fundamentalmente y, una cierta debilidad y negatividad a nivel de epitelio y tapón epitelial. La reacción e investigación de carbohidratos con la reacción del PAS es de débil intensidad y cuando existe tapón sus células emigradas toman un comportamiento similar a las de la capa media del epitelio.

Deducimos también la presencia de glicoproteínas ricas en restos o radicales D-N Acetilglucosamina o ácido N-Neuroamínico así como glucosídicos y manosídicos preferentemente en la porción superficial del epitelio, con el uso de la WGA que junto con la Concanavalina-A valoran la procedencia del tapón.

Como final apuntamos la falta de verdaderos cambios o alteraciones macromoleculares y de actividad enzimática, existiendo por tanto un comportamiento histoquímico cicatricial semejante al resto del epitelio indemne.

Por lo tanto deducimos que los cambios o alteraciones que tienen lugar en la cicatrización se deben, a nuestro juicio a factores concomitantes durante la misma y no a los procesos macromoleculares.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a las señoritas Ma. Teresa Fernández Llebrez Alonso y A. Rosety Plaza la colaboración técnica prestada en el laboratorio.

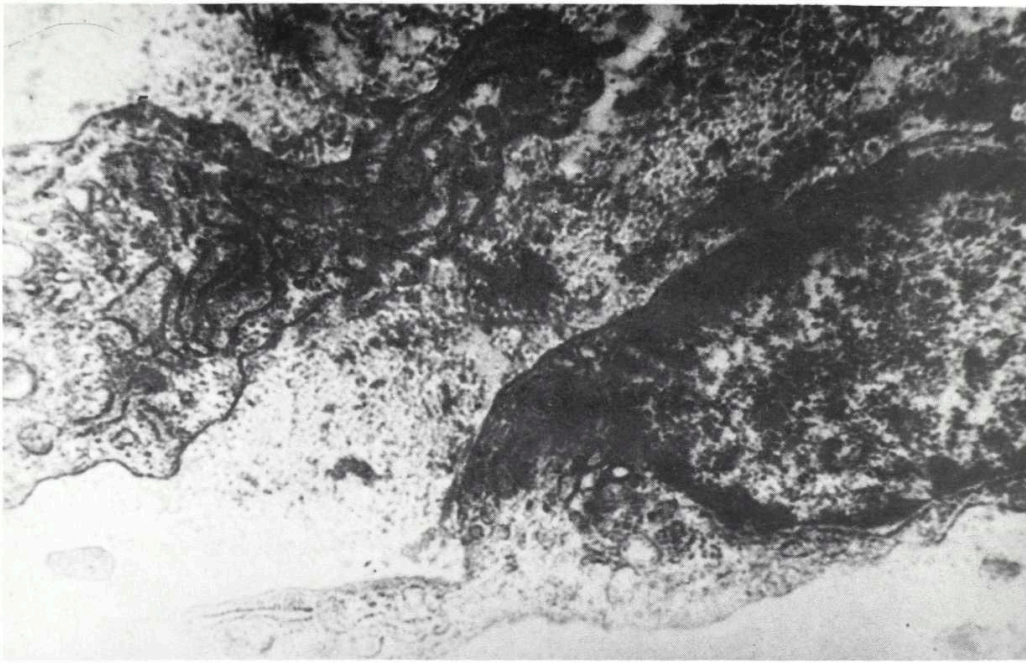


FIGURA 17
Microscopia electrónica. Cambios a nivel estromal

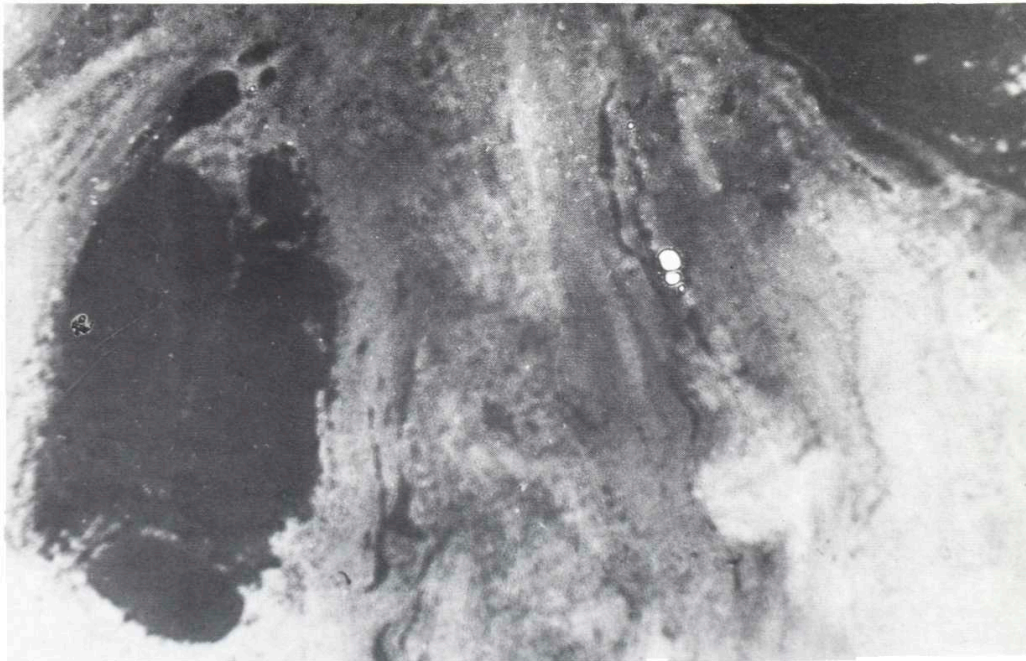


FIGURA 18
Microscopia electrónica. Cambios a nivel estromal

HISTOQUIMICA DE LA QUERATOTOMIA RADIAL EXPERIMENTAL

BIBLIOGRAFIA

AMEMIYA T.; YOSHIDA H. (1978). "*Electron histochemical study on synthesis and breakdown of glycogen in the rabbit cornea*". Acta Histochem (Jena). 62 (302-9).

BINDER, P. S.; NAYAK, S. K.; DEG, J. K.; ZAVALA, E. Y.; SUGAR, J. S. (1987). "*An Ultrastuctural and histochemical study of long-term wound healing after radial keratotomy*". Am. J. Ophthalmol. 103 (432-440).

CEJKOVA J.; BOLKOVA A. (1974). "*Differences in hydration characteristics of corneas in various animal species. Histochemical Study of acid mucopolysaccharides*". Graefes Arch Klin Exp. Ophthalmol. 190 (353-60).

CEJKOVA J; LOJDA Z; HAVRANKOVA E. (1975). "*Distribution of acid phosphatase, beta-glucuronidase, n-acetyl-beta-d-glucosaminidase and beta-galactosidase in cornea of albino rabbit*". Histochemistry. 44 (337-43).

GUTIERREZ, M.; MONTERO, C.; J. D. (1963). "*Coloración histológica policroma de embriones*". Anat. del Desarrollo 11 (53-56).

MAUDGA, PC.; MISSOTTEN E. (1978). "*Histology and histochemistry of the normal superficial corneal epithelium of rabbit*". Graefes Arch Klim Exp. Ophthalmol. 205 (167-74).

PEARSE, A. G. E. (1980). "*Histochemistry theoretical and applied*" Vol. I. y II. Churchill Livinstone 4a. Ed.

SALADO, F.; ROSETY, M.; NAVEA, A. (1988). "*Aportación histoquímica a la queratotomía radial*". Revista D'or de oftalmología. 1o. Trim (57-59).

STEFANIS.; CERU, A; CIOFI LUZZATTO A.; DEVIRGILIIS CONTIL. (1975). "*Morfologia ed istochimica dell'epitelio corneale rigenerante in Triturus cristatus. 1) Osservazioni preliminari*". Riv. Istochim Norm Patol. 19 (1-11).

STEUHL K. P.; THIEL H. J. (1986). "*Histochemical and morphological study of the regenerating corneal epithelium after limbus-to-limbus denudation*". Graefe's arch. cli. Exp. Ophthalmol. 225 (53-58).

TERVO T.; VANNAS A.; TERVO K.; HOLDERN, B. A. (1985). "*Histochemical evidence of limited reinnervation of human corneal grafts*". Acta Ophthalmol. 63/2 (207-214).

VACCA, L. L. (1985). *Laboratory manual of histochemistry*. Raven Press Books. New York.