

FUTUROS DESENVOLVIMENTOS NA INSTRUMENTAÇÃO EM FLUOROFOTOMETRIA OCULAR*

E.B. LEITE E J.G. CUNHA-VAZ

Centro de Oftalmologia da Universidade de Coimbra. Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra. Portugal.

RESUMO

O objectivo da fluorometria ocular é medir os fluoróforos exógenos e endógenos nos tecidos oculares, quer no indivíduo normal quer em situações de doença oftálmica ou sistémica, utilizando as características ópticas únicas do olho. A incidência de cegueira está a aumentar rapidamente devido ao maior número de casos de diabetes, glaucoma, catarata e degenerescência macular senil devido a uma maior longevidade da população. A medição das alterações de fluoróforos específicos no olho pode ajudar à identificação dos grupos de alto risco nestas doenças. Novos avanços na instrumentação necessária incluem a fluorometria diferencial e a introdução da óptica confocal. A fluorometria diferencial registou já progresso significativo no estudo da autofluorescência do cristalino e da córnea e nas medições no humor aquoso. O aumento da resolução espacial conseguida com ópticas mais desenvolvidas abre possibilidades interessantes por exemplo na medição da permeabilidade do endotélio corneano e da permeabilidade vascular das barreiras oculares, nomeadamente hemato-retiniana e hemato-aquosa. São referidos os resultados com particular incidência para as medições da autofluorescência do cristalino.

SUMMARY

Futures of Instrumentation Developments in Ocular Fluorophotometry

The scope of ocular fluorometry is to monitor exogenous and endogenous fluorophores in ocular tissues, in relation with ophthalmic and systemic diseases using the unique optical perspectives of the eye. The elderly population and the incidence of blindness are increasing rapidly due to more cases of diabetes, glaucoma, cataract and age-related macular degeneration. Monitoring changes in specific fluorophores in the eye may help identify the high risk groups in these diseases. New developments in instrumentation include differential fluorometry and introduction of confocal optics. Differential fluorometry has already achieved significant progress for the study of the autofluorescence of the lens and cornea and measurements in the aqueous. Improved spatial resolution obtained with improved optics opens interesting possibilities like measurement of corneal endothelial permeability and retinal vascular permeability. The results already obtained will be presented with particular incidence on measurements of lens fluorescence (normals — 336.2 ± 56.3 ; diabetes — 659.9 ± 123.9 ; age group — 40-50 y) and corneal endothelial permeability (normals — $3.14 \pm 60.10^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

INTRODUÇÃO

O olho humano apresenta uma configuração esférica, ligeiramente achatado no sentido anteroposterior e a manutenção desta forma deve-se entre outros factores ao seu preenchimento por fluidos, humor aquoso e vítreo, a uma pressão constante. Os fluidos intraoculares encontram-se separados do sangue por barreiras hemato-oculares, nomeadamente, a barreira hemato-aquosa e a hemato-retiniana. A primeira, barreira hemato-aquosa (BHA) controla as trocas entre o plasma e o humor aquoso, através de processos de ultrafiltração e secreção. A segunda, barreira hemato-retiniana (BHR) é responsável pela manutenção das trocas entre o plasma e o vítreo através de mecanismos de difusão e transporte activo¹.

Devido a este complexo sistema de trocas contínuas entre o plasma e os fluidos intraoculares, qualquer patologia que afecte as estruturas oculares, fluxo ou composição sanguínea provocará alterações nas barreiras hemato-oculares e consequentemente na composição dos fluidos intraoculares.

Fluorometria Ocular

A fluorometria ocular permite quantificar a fluorescência das estruturas e fluidos oculares.

Em espectroscopia, a medição de fluorescência é efectuada na maioria aos casos em soluções contidas em *cuvettes*. Comparativamente, em fluorofotometria ocular, o olho pode ser considerado esquematicamente uma *cuvette* múltipla com três compartimentos contendo fluidos e separados por paredes tissulares.

O primeiro compartimento considerado é preenchido pelo filme lacrimal, o segundo por humor aquoso e o terceiro e último pelo vítreo. A separar estes compartimentos temos sucessivamente, córnea, cristalino e retina (Fig. 1).

A medição da fluorescência dos tecidos e fluidos oculares ao longo do eixo visual pode ser efectuada através de um método não invasivo e com um instrumento capaz de efectuar medições sucessivas (*scanning*), o fluorofotómetro ocular.

Presentemente, o fluorofotómetro ocular comercializado com melhores índices de reproducibilidade, é o Fluorotron Master TM². Posteriormente foram introduzidas alterações

* Comunicação apresentada no III Encontro Nacional de Investigação em Saúde, Faculdade de Medicina de Lisboa, 8 a 11 de Maio de 1991.

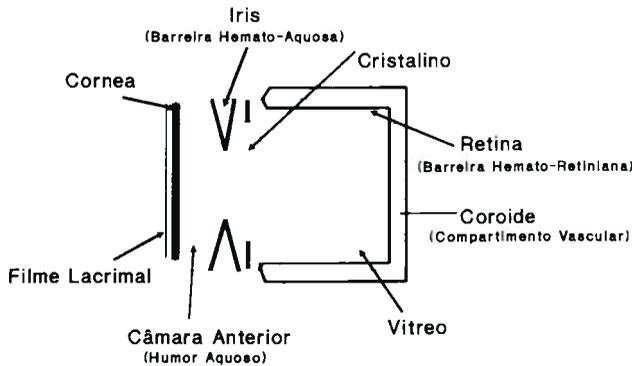


Fig. 1

com a finalidade de melhorar a resolução dos instrumentos, nomeadamente no segmento anterior do olho¹.

Neste aparelho modificado a fenda (*Standard slit*) foi estreitada de 203.2 para 58.4 microns, resultando uma zona de leitura (*projected slit width*) com o adaptador de segmento anterior de 14 microns em vez dos anteriores 50,8, a que corresponde uma zona de focagem de 0.585 nm (contrariamente aos 21 anteriores). As possibilidades destes dois instrumentos e a sua utilidade tem sido objecto de múltiplas publicações³⁻¹¹.

Contudo, é fundamental não esquecer o contributo dado por um marcador exógeno, a fluoresceína no desenvolvimento inicial deste tipo de instrumentação. A fluoresceína é uma molécula não tóxica, com um raio de 5,5 Å e quando injectada uma percentagem elevada (20%) permanece na forma livre. A fluoresceína tem a particularidade de ser detectada nos fluidos intraoculares através da medição da sua fluorescência em concentrações muito baixas (10⁻⁹ gr/ml) após esta ter atravessado as barreiras hemato-oculares. A quantificação das concentrações de fluoresceína no plasma e nos diferentes fluidos intraoculares, humor aquoso e vitreo, vai permitir quantificar a permeabilidade das diferentes barreiras, nomeadamente a hemato-aquosa (BHA)⁹ e a hemato-retiniana (BHR)^{6,7}.

Finalmente, após a concentração de fluoresceína ter atingido um máximo, a sua eliminação faz-se basicamente através das vias de drenagem normais do olho e de mecanismos de transporte activo. Este índice de eliminação de fluoresceína vai-nos fornecer informações sobre o fluxo de saída (*outflow*) do humor aquoso. Outra via de eliminação da fluoresceína intraocular é por transporte activo através da barreira hemato-retiniana e o cálculo deste índice de eliminação é, por sua vez, um bom sinal da funcionalidade celular do transporte de aniões orgânicos através da BHR¹².

Para além de quantificar a permeabilidade da BHA e BHR e do transporte activo da BHR, a fluorofotometria ocular permite, através de diferentes métodos de administração de fluoresceína, quantificar a permeabilidade e função do epitélio⁸ e endotélio corneano³ assim como fluxo lacrimal¹³.

Todas estas metodologias se baseiam no uso de um fluoróforo, a fluoresceína. Contudo, a possibilidade de utilização de outros fluoróforos exógenos vai permitir aumentar as hipóteses de trabalho e consequentes possibilidades de aplicação clínica. Estes outros fluoróforos fluorescem a diferentes comprimentos de onda e podem oferecer melhores perspectivas de diferenciação que os fluoróforos oculares naturais.

O desenvolvimento de instrumentação na fluorometria ocular tem sido outra área de pesquisa muito activa, e perspectivam-se progressos num futuro próximo.

Como objectivo no desenvolvimento deste tipo de instrumentação refira-se:

1. Aumento do grau de resolução espacial;
2. Aumento do índice de sensibilidade;
3. Aumento do grau de resolução temporal.

O primeiro objectivo, resolução espacial, pode ser obtido através da optimização do desenho óptico dos fluorofotómetros já comercializados. Resultados preliminares obtidos em fluorofotómetros já modificados com esta finalidade são prometedores¹.

Contudo, as maiores perspectivas de desenvolvimento colocam-se na utilização dos lasers como fonte de excitação de fluorescência, obviando assim os limites impostos pelos sistemas presentemente utilizados com fontes de excitação de luz incoerente com comprimentos de onda fixos.

Para além das vantagens da utilização dos lasers como fonte de excitação, o recurso a técnicas como a da *time-resolved fluorescence spectroscopy* tem outras vantagens comparativamente às técnicas clássicas¹⁴. De entre estas destaca-se a possibilidade de monitorizar o decaimento de fluorescência por componentes e o também permitir a identificação dos fluoróforos e a sua discriminação da fluorescência natural, não só sob a perspectiva espectral como temporal¹⁴.

Estes desenvolvimentos técnicos parecem particularmente prometedores na área da quantificação dos fluoróforos endógenos.

APLICAÇÕES CLÍNICAS

Algumas das aplicações clínicas destas metodologias e instrumentação são aqui referidas de um modo sumário.

Estudos no domínio da caracterização espectral dos fluoróforos do cristalino, informação essencial para a compreensão dos fenómenos agregativos e caractogénicos, demonstraram que a catarata contém vários cromóforos com espectros fluorescentes complexos e que a sua acumulação parece correlacionável com o metabolismo e aparentemente influenciável por acção terapêutica^{15,16}.

A fluorofotometria ocular, utilizando fluoróforos endógenos, tem também outras aplicações clínicas, nomeadamente o estudo da fluorescência natural em doentes diabéticos¹⁰.

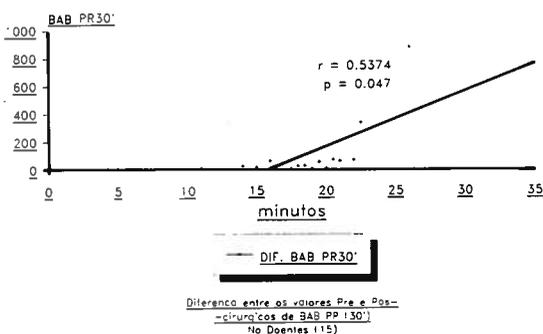
Os doentes diabéticos apresentam uma forte correlação entre a fluorescência natural e os níveis de hemoglobina glicosilada¹⁶. Este facto sugere que a acumulação que produtos terminais fluorescentes glicosilados pode desempenhar um papel importante na formação de cataratas, pelo menos nos doentes diabéticos. A quantificação da autofluorescência do cristalino parece ser um bom processo para monitorizar o processo de envelhecimento ou o controle metabólico do diabético. De referir que, recorrendo-se a fluoróforos endógenos, a metodologia utilizada é não-invasiva e facilmente executável.

Outra área de aplicação é a avaliação da qualidade de microcirurgia da catarata. Assim, estudos recentes permitiram demonstrar, em doentes submetidos a este tipo de cirurgia com implantação de lentes intraoculares (PMMA) de câmara posterior, que a técnica cirúrgica utilizada (*can-opener* ou endocapsular) ou a duração da intervenção cirúrgica induzem alterações na permeabilidade da barreira hemato-aquosa¹⁵ e do endotélio corneano⁹. De um modo sumário refira-se que as alterações da permeabilidade do endotélio corneano são menores com técnica *endocapsular* (Quadro 1) e que a duração da cirurgia parece ser uma variável importante na avaliação da qualidade da microcirurgia, pois a cirurgias com maior duração correspondem maiores alterações da permeabilidade do endotélio corneano (Quadro 1) e da barreira hemato-aquosa (Quadro 2 e 3).

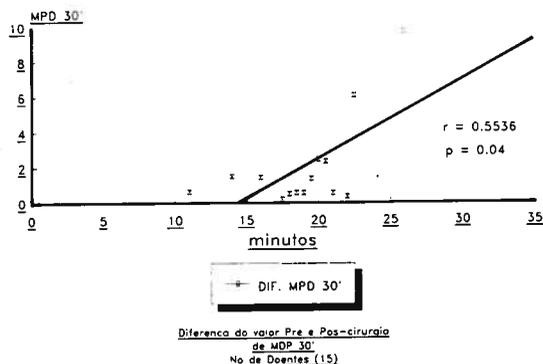
QUADRO 1 — Permeabilidade do endotélio corneano

Técnica Can-Opener vs Endocapsular				
Técnica	Pré-cirurgia	Pós-cirurgia	Diferença	Duração
Endocapsular	3,46 ± 0,75	4,05 ± 0,90	0,60 ± 0,41	23,2'
"Can-Opener"	2,98 ± 0,57	3,99 ± 0,50	1,01 ± 0,45	23,8'
Duração vs Coeficiente de Permeabilidade Endotelial				
Duração	Pré-cirurgia	Pós-cirurgia		
< 20' (10)	3,65 ± 0,81	4,00 ± 1,04		
> 20' (10)	3,01 ± 0,61	4,05 ± 0,57		

QUADRO 2 — Coeficiente de permeabilidade da B.A.B. BAB PR (30')



QUADRO 3 — MDP 30' vs duração da cirurgia



Mas as aplicações clínicas da fluorofotometria ocular com utilização de fluoróforos exógenos não se confinam à avaliação da cirurgia da catarata. Assim citemos a título de exemplo, avaliação de fármacos de diferentes patologias, como diabetes^{6,7} e glaucoma^{4,5}.

Outros fluoróforos podem ser estudados e quantificados através de técnicas de fluorometria ocular, nomeadamente, lipofuscina, pigmento retiniano localizado essencialmente à mácula e que parece desempenhar um importante papel em patologias extremamente frequentes, como a degenerescência macular senil.

CONCLUSÃO

Estes são alguns dos objectivos futuros nas áreas de desenvolvimento de instrumentação e das metodologias da fluorometria ocular, alguns dos quais exequíveis a curto prazo ou já mesmo objecto de publicação³⁻¹⁶.

BIBLIOGRAFIA

- CUNHA-VAZ J.G.: The Blood-Ocular Barriers. *Surv Ophthalmol* 1979; 23: 279-296.
- ZEIMER R.C., BLAIR N.P., CUNHA-VAZ J.G.: Vitreous fluorophotometry for clinical research. I Description and evaluation of a new fluorophotometer. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 1753-1756.
- LEITE E.B., et al.: Evaluation of quality of cataract surgery. I Corneal endothelial permeability. *Eur Jour Cataract and Refractive Surgery* 1990; 2: 5-8.
- COULANGEON I.M., MENERATH J.M., SOLÉ P.: Fluorophotométrie par instillation. I: Débit d'humeur aqueuse et perméabilité endothéliale cornéenne. *J Fr Ophtalmol* 1987; 10: 365-374.
- COULANGEON I.M., MENERATH J.M., SOLÉ P.: Fluorophotométrie par instillation. II: Effet d'un collyre bêta-bloquant chez le sujet normal. *J Fr Ophtalmol* 1987; 10: 375-380.
- CUNHA-VAZ J.G., MOTA M.C., LEITE E., FARIA DE ABREU Jr., RUAS M.A. Effect of Sorbinil on the permeability of the blood-retinal barrier in early diabetic retinopathy. *Diabetes* 1986; 35: 375.
- CUNHA-VAZ J.G., MOTA M.C., LEITE E., FARIA DE ABREU Jr., RUAS M.A.: Effect of Sulindac on the permeability of the blood-retinal barrier in early diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 1037-1041.
- DE KUIJ E.J.F.M., BOOT J.P., LATERVERER L., VAN BEST J.A., et al.: A simple method for determination of corneal epithelial permeability in humans. *Curr Eye Res* 1987; 3: 1327-1334.
- LEITE E., MIRA J.B., MOTA M.C., CUNHA-VAZ J.G.: Evaluation of quality of cataract surgery. II. Inflammatory Response. *Eur Jour Implant Ref Surg* 1990; 2: 9-13.
- MOTA M.C., LEITE E.: Autofluorescência e transmitância de cristalinos em diabéticos insulino-dependentes. *Exp Ophthalmol* 1985; 11: 28-34.
- VAN WIRDUM E., MOTA M.C., VAN BEST J.A., LEITE E., et al.: Lens transmission and autofluorescence in renal disease. *Ophthalmic Res* 1988; 20: 317-326.
- LUND-ANDERSON H., et al.: Fluorescein and fluorescein glucuronide in the vitreous body of diabetic patients. *Graef's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987; 225: 173-176.
- WEBBER W.R.S., JONES D.P., WRIGHT P.: Fluorophotometric measurements of tear turnover rate in normal healthy persons. Evidence for circadian rhythm. *Eye* 1987; 1: 615-620.
- DOCCHIO F., RAMPONI R.: Time-resolved laser fluorescence spectroscopy and its applications to the *in vivo* analysis of ocular fluorophores. In: *Lasers in Ophthalmology*, ed R Brancato. Amsterdam. Kugler and Ghedini, 1987.
- LOHMANN W.: Native fluorescence as indicator for cataract. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29, suppl: 150.
- MOTA M.C., LEITE E.B., CUNHA-VAZ J.G.: Glycosilation and lens fluorescence in diabetic patients. In: *Proceedings of the IV Symposium of the International Society for Ocular Fluorophotometry*. Coimbra, ed Cunha-Vaz J.G and Leite EB. Kugler and Ghedini, 1989.

Pedido de Separata:

José G. Cunha-Vaz
 Centro de Oftalmologia da Universidade de Coimbra
 Hospitais da Universidade de Coimbra
 3049 Coimbra Codex
 Portugal