

Características microscópicas *in vivo* del plexo nervioso subbasal corneal en pacientes con queratocono

In vivo microscopic characteristics of the subbasal corneal nervous plexus in patients with keratoconus

Dra. Janet González Sotero,^I Dr. Eduardo Rojas Alvarez,^I Dra. María del Carmen Benítez Merino^{II}

^I Hospital Docente General "Abel Santamaría Cuadrado". Pinar del Río, Cuba.

^{II} Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". La Habana, Cuba

RESUMEN

Objetivo: describir las características microscópicas *in vivo* del plexo nervioso subbasal en córneas de pacientes con queratocono.

Métodos: se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal, en el que se analizaron 226 pacientes con queratocono que cumplieron con los criterios establecidos en el periodo comprendido entre enero y noviembre de 2010. Los resultados se compararon con los obtenidos en un grupo de contraste compuesto por 68 sujetos sanos. Se empleó el ConfoScan 4 para el análisis microscópico. Se empleó estadística descriptiva básica, y la comparación de las medias de las variables fue ejecutada mediante ANOVA de un factor. Las comparaciones múltiples de las medias de las variables histológicas de los pacientes con queratocono separado por su severidad, con las del grupo de contraste, fueron ajustadas en la prueba t de Dunnett. Se comprobó la asociación univariada entre variables histológicas entre sí y con la severidad del queratocono mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Con el fin de controlar sesgos en la investigación, la correlación de variables se controló por edad.

Resultados: la densidad del plexo nervioso subbasal se encontró disminuida significativamente, en el grupo de pacientes con grado III, fue aproximadamente 43 % menor que en el grupo contraste. Se observó una asociación significativa entre la densidad del plexo nervioso subbasal y la severidad del queratocono.

Conclusiones: la microarquitectura del plexo nervioso subbasal está alterada en las córneas con queratocono desde estadios iniciales de la enfermedad.

Palabras clave: queratocono, plexo nervioso subbasal, microscopia confocal.

ABSTRACT

Objective: to describe the in vivo microscopic characteristics of the subbasal nervous plexus in the corneas of patients with keratoconus.

Methods: an observational, cross-sectional and descriptive study was conducted in 226 patients with keratoconus, who met the set criteria, in the period of January to November 2010. The results were compared with those of a contrast group made up of 68 healthy subjects. The ConfoScan 4 equipment was used for the microscopic analysis. The study used basic summary statistics and comparison of the means of variables using one-way ANOVA. The multiple comparisons of the means of the histological variables in patients with keratoconus, according to their severity, and those of the contrast group, were all adjusted for Dunnet's t test. It was proved that there was univariate association of the histological variables among them and with the severity of keratoconus through Spearman's correlation coefficient. For the purpose of controlling risks in the research, the variable correlation was controlled for age.

Results: the density of the sub-basal nervous plexus was found to be significantly reduced, being 43% lower in the grade III patients than in the contrast group. There was significant association between the density of the sub-basal nervous plexus and the severity of keratoconus.

Conclusions: microarchitecture of the sub-basal nervous plexus is impaired in the corneas with keratoconus since the early stages of the disease.

Keywords: keratoconus, subbasal nervous plexus, confocal microscopy.

INTRODUCCIÓN

Queratocono es un término clínico usado para describir una enfermedad en la cual la córnea adopta una forma cónica como resultado de un adelgazamiento, debilitamiento y protusión no inflamatorios de la misma.^{1,2}

El encurvamiento corneal, generalmente asimétrico, provoca miopía, astigmatismo irregular y con ello aberraciones ópticas de alto orden.^{3,4} La protrusión y el adelgazamiento pueden progresar hasta provocar alteraciones en la microestructura corneal y, en consecuencia, edema y procesos cicatrizales que pueden dejar como secuela opacidades. Todos estos procesos son responsables de la reducción en la visión de estos pacientes, incluso la alcanzada al usar corrección óptica, ya sea con espejuelos o lentes de contacto. Entre el 10 y 20 % de los pacientes con queratocono requieren trasplante de córnea para restaurar la visión e integridad de la misma, a una edad relativamente joven.⁵

A pesar de que el queratocono ha sido objeto de numerosos estudios, su etiología aún permanece desconocida, y sólo contamos con hipótesis al respecto.⁶ Una mejor comprensión de los cambios microestructurales que acontecen en las córneas con queratocono, máxime si se analiza el tejido *in vivo*, pudiera contribuir a la posterior dilucidación de su fisiopatogénesis, en la que se han implicado a los nervios corneales.

La córnea es el tejido más densamente innervado del organismo humano.⁷ Estudios previos sobre modificaciones en la densidad y morfología de la innervación corneal han estado limitados por la pobre disponibilidad de tejido corneal sano para análisis *ex vivo*, así como por la rápida degeneración del tejido tras la muerte. Estos inconvenientes son rebasados por la microscopia confocal *in vivo* de la córnea, la cual provee imágenes de las secciones ópticas del tejido que permiten el análisis de las estructuras nerviosas del tejido en condiciones fisiológicas.⁸ Por eso se estudió las características microscópicas *in vivo* del plexo nervioso subbasal en córneas de pacientes con queratocono.

MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y transversal, en pacientes diagnosticados de queratocono entre enero y noviembre de 2010. El universo de estudio estuvo constituido por todos los pacientes con queratocono mayores de 18 años atendidos en la consulta de córnea del Hospital "Abel Santamaría Cuadrado", en Pinar del Río.

Quedaron incluidos en el estudio pacientes con queratocono, definido por cumplir dos de las siguientes características: reflejo "en tijeras" a la retinoscopia, adelgazamiento corneal regional, protrusión cónica de la córnea (signo de Munson), curvatura corneal aumentada, acumulación de hemosiderina en la base del cono (anillo de Fleisher), presencia de estrías de Vogt a la biomicroscopia anterior, patrón topográfico sugestivo de queratocono. Se aplicó el test modificado de Rabinowitz McDonnell para confirmarlo. Además, pacientes con edades entre 18 y 60 años, así como aquellos que otorgaron el consentimiento informado, por escrito.

Se excluyeron de la investigación a los pacientes que reunían las características siguientes: tratamiento médico sistémico con efectos oculares conocidos, no cooperación para la realización de la microscopia confocal, antecedente de cirugía previa u otro tipo de trauma, otra enfermedad corneal presente o referida, opacidad corneal (queratocono grado IV, antecedentes de trauma, infección, enfermedad congénita de la córnea), glaucoma o hipertensión ocular, tratamiento tópico ocular (presente o culminado en un periodo de tiempo inferior a 3 meses del momento de estudio) y usuarios de lentes de contacto.

La muestra quedó finalmente conformada por 226 pacientes que cumplieron con los criterios establecidos. La incorporación de un grupo control en esta investigación, integrado por 68 sujetos sanos, se debe a que no existe consenso aún en la literatura acerca de los parámetros de normalidad de la mayoría de las variables microscópicas analizadas.

Los nervios subbasales fueron definidos como estructuras lineales, localizados en posición anterior a las primeras imágenes en las que se visualizan los objetos brillantes que representan los queratocitos del estroma.

Se determinó la densidad de fibras nerviosas en el plexo nervioso subbasal en las imágenes seleccionadas, calculada como la suma de la longitud total de todas las fibras nerviosas visibles y sus ramas (mayores de 50 μm), dividida entre el área predefinida de la imagen, expresada finalmente en mm/mm^2 .

El coeficiente de tortuosidad de fibras nerviosas del plexo subbasal se agrupó en 4 categorías, según la clasificación de Olivera Soto, desde el grado 0 hasta el IV.⁹

En los pacientes con queratocono binocular, se seleccionó el ojo derecho para el estudio. En los sujetos sanos, solo el ojo derecho se escogió. El examen oftalmológico se realizó en una etapa previa a la microscopia confocal de la córnea, para lo cual se empleó biomicroscopia, oftalmoscopia indirecta y tonometría de aplanación. Como medios complementarios para la realización del diagnóstico de queratocono se empleó: retinoscopia, biomicroscopia del segmento anterior, queratometría, topografía corneal y paquimetría.

Las características microscópicas *in vivo* de la córnea se analizaron mediante microscopia confocal. Para ello se empleó el ConfoScan 4, (tecnología Nidek, Albnasego, Italia) el cual emplea plataforma Microsoft Windows XP y software NAVIS. La distancia entre las imágenes fue de 1 μm . La presión programada del anillo Z sobre la córnea fue de 20. Las imágenes fueron adquiridas usando la cámara en modo automático, digitalizadas, y almacenadas directamente en la memoria de la computadora. La profundidad de campo fue de aproximadamente 26 μm . El ancho de la apertura en hendidura fue de 300 μm . Los píxeles estuvieron espaciados aproximadamente 0,56 μm horizontal y verticalmente.

Fueron programados 4 pases en cada escaneo y se realizaron 3 escaneos en cada ojo analizado, programados para ser realizados en la posición central de la córnea. Se empleó para el análisis de las imágenes una muestra de área (identificada por el software como área de ROI = 0,05). Para controlar la variabilidad en los resultados originados por el factor operador, las imágenes confocales seleccionadas fueron presentadas al azar a 2 observadores expertos por separado para realizar el cálculo de la densidad y durante este proceso cada observador ignoraba la profundidad de la córnea a la que pertenecía cada imagen.

Se empleó estadística descriptiva básica en los datos recogidos, reportada como: media, por ciento, según fuera más apropiado en cada situación. La distribución normal de las variables cuantitativas continuas fue comprobada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En aquellas en las que se encontró una distribución normal, las pruebas estadísticas paramétricas fueron las empleadas, y en caso contrario, las no paramétricas.

La comparación de las medias de las variables histológicas analizadas, obtenidas en la primera consulta de cada paciente, se realizó entre 4 grupos, 3 de ellos conformados por pacientes con diferentes grados de severidad del queratocono (I-III) y 1 compuesto por pacientes sanos, y fue ejecutada mediante ANOVA de un factor. Las comparaciones múltiples de las medias de las variables histológicas de los pacientes con queratocono, separado por su severidad, con las del grupo de contraste, fueron ajustadas en la prueba t de Dunnett.

Se comprobó la asociación univariada entre variables histológicas entre sí y con la severidad del queratocono mediante el coeficiente de correlación de Spearman. Con el fin de controlar sesgos en la investigación, la correlación de variables se controló por edad.

El protocolo usado en este estudio recibió la aprobación del comité de ética de la institución responsable. Este se adhiere a los principios de la Declaración de Helsinki. Se respetó la confidencialidad de la información obtenida y se garantizó su utilización únicamente para el desarrollo de esta investigación. Los pacientes que aceptaron participar dieron su conformidad en la hoja de consentimiento informado.

RESULTADOS

Como muestra la tabla 1, la densidad del plexo nervioso subbasal se encontró disminuida significativamente desde el grado I de severidad del queratocono, resultando especialmente relevante en el grupo de pacientes con grado III, donde fue aproximadamente 43 % menor que en el grupo control.

Tabla 1. Densidad del plexo nervioso subbasal (mm/mm^2)

Grupo	Media	Diferencia de medias respecto a sanos		p*
		No.	%	
Sanos	7,99			
Grado I	6,32	-1,67	- 0,25	0,000
Grado II	5,68	-2,31	-27,85	0,000
Grado III	4,55	-3,45	- 43,04	0,000

*Asociada a la prueba t de Dunnett.

La figura 1 muestra la asociación univariada entre la densidad del plexo nervioso subbasal y la severidad del queratocono. Se observa una interacción significativa entre ambos parámetros. La tendencia fue que la densidad del plexo disminuyó a medida que fue más severa la enfermedad.

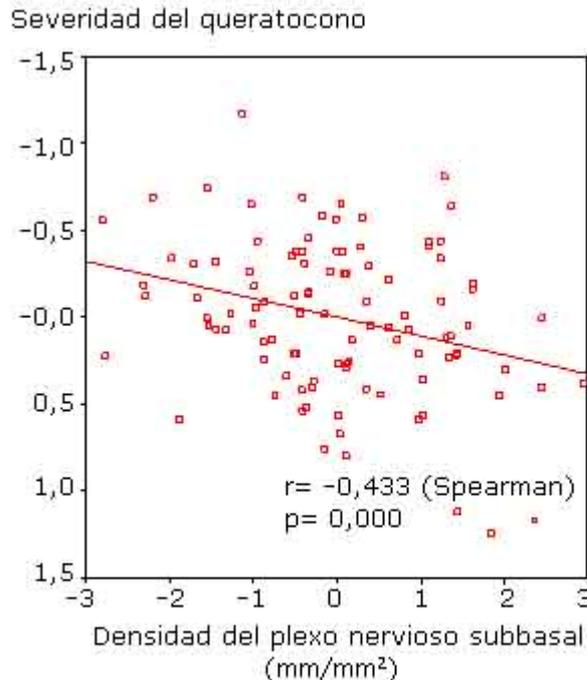


Fig. 1. Correlación entre la densidad del plexo nervioso subbasal y la severidad del queratocono.

Los nervios subbasales presentaron un trayecto significativamente tortuoso desde el grado II de severidad del queratocono, llegando a presentar en el grado III más del doble del valor observado en los sujetos sanos (tabla 2).

Tabla 2. Coeficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal

Grupos	Media	Diferencia de medias respecto a sanos		p*
		No.	%	
Sanos	1,10			
Grado I	1,23	0,13	1,82	0,595
Grado II	1,82	0,72	65,45	0,000
Grado III	2,46	1,37	123,64	0,000

*Asociada a la prueba t de Dunnett.

La figura 2 refleja la relación entre el coeficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal y la severidad del queratocono. A medida que esta enfermedad era más severa, las fibras nerviosas del plexo subbasal adquirieron un trayecto significativamente más sinuoso o tortuoso.

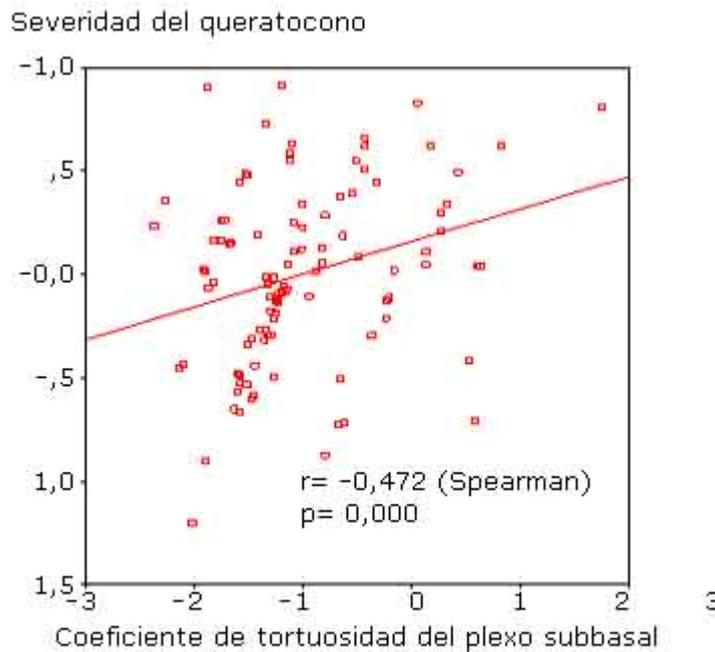


Fig. 2. Correlación entre el coeficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal y la severidad del queratocono

DISCUSIÓN

Dado que ninguno de los sujetos incluidos en el estudio era usuario de lentes de contacto, ni tenía antecedentes de operaciones u otras enfermedad oculares y que las alteraciones microestructurales observadas se asociaron significativamente con la severidad de la enfermedad, es razonable afirmar que las alteraciones morfométricas observadas en el plexo nervioso subbasal están primariamente relacionadas con el queratocono y su fisiopatología. Sin embargo, permanece como incógnita si las alteraciones anteriormente descritas constituyen un factor causal o son manifestaciones secundarias de la enfermedad subyacente.

Las características morfológicas *in vivo* de este plexo, específicamente en pacientes con queratocono, no han sido ampliamente estudiadas, ya que los autores se han enfocado más en el análisis de las características de las poblaciones celulares del epitelio, estroma y endotelio.

Muchas de las investigaciones que abordan esta temática lo hacen de una manera cualitativa, minada por la subjetividad, con pocos pacientes, por demás sin tener en cuenta la relación entre las alteraciones de las fibras nerviosas con la severidad de la ectasia.

Estudios previos han demostrado una elevada concordancia entre su observación por microscopía confocal y por métodos histológicos tradicionales *ex vivo*,¹⁰ lo cual avala el empleo del primero en la investigación.

*Niederer y otros*¹¹ describen hallazgos similares a los descritos en este estudio y mencionan haber encontrado asociación significativa entre la densidad nerviosa subbasal y la severidad de la enfermedad.

Varios autores han sugerido que los nervios corneales están implicados en la fisiopatología y progresión del queratocono. *Brookes y otros*¹² aportaron evidencias que sugieren que los procesos destructivos encontrados en córneas con queratocono involucran a sus nervios, mediante la liberación de enzimas proteolíticas (catepsina B y G) a este nivel, mayor en córneas con queratocono que en las normales.

*Patel*¹³ en 2006 y *Niederer*¹¹ en 2008, describieron como alteraciones en varios pacientes con queratocono, la terminación abrupta de algunas fibras nerviosas subbasales. Sin embargo, *Al Aqaba*⁷ en 2010, empleando técnicas especiales de tinción, en cortes histológicos de tejido corneal provenientes de banco de ojos, revela por primera vez que representan sitios de perforación de nervios corneales provenientes del estroma anterior, a través de la membrana de Bowman, presentes normalmente en los seres humanos.

Patel y McGhee en 2006¹³, realizaron un montaje bidimensional de las imágenes confocales de 4 pacientes con queratocono, y obtuvieron un mapeo de este plexo, asociado con la localización topográfica del cono, donde se observó en el ápice del cono una tortuosa red de haces de fibras nerviosas, con una orientación predominantemente oblicua y horizontal. En la base topográfica del cono la orientación nerviosa era curvilínea, dando la impresión de seguir el contorno de la base, concéntricamente. Esta novedosa técnica de procesamiento de imágenes aporta una visión panorámica de los cambios observados en las imágenes confocales individuales. La densidad del plexo en la córnea central se encontró significativamente disminuida, incluso en el caso donde la enfermedad era leve.

La posibilidad de realizar un análisis cuantitativo es una de las principales ventajas de la microscopía confocal en la evaluación de la córnea con queratocono. En el caso del plexo nervioso subbasal, aunque existe en general consenso entre los autores de que la densidad del plexo nervioso subbasal es inferior en pacientes con queratocono respecto a sujetos sanos, los valores de este parámetro difieren entre los diferentes estudios. Son varios los factores que influyen en este hecho, entre ellos, el método en que es definido el parámetro y el tipo de microscopio confocal empleado.¹⁴

La densidad de fibras nerviosas ha sido cuantificada por diferentes autores de variadas maneras, pero se considera que la manera más apropiada en el caso de nervios que se encuentran confinados a una capa subbasal estrecha es determinar su longitud por unidad de área.

Estudios que usan el microscopio confocal láser han reportado la densidad en 20,3⁸ y 21,7 mm/mm² mientras que otros han empleado el microscopio Tandem o el de escaneo en hendidura, alegando entre 8,4 y 11,1 mm/mm², respectivamente; por lo tanto, los valores de la variable solo son comparables entre tipos similares de microscopios confocales.

Esta investigación confirma que la arquitectura del plexo nervioso subbasal está alterada en las córneas con queratocono, significativas desde el grado I de severidad clínica de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patel S. Characterisation of keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(6):759-60.
2. Suzuki M, Amano S, Honda N. Longitudinal changes in corneal irregular astigmatism and visual acuity in eyes with keratoconus. *Jpn J Ophthalmol*. 2007;51(2):265-9.
3. Okamoto C, Okamoto F, Samejima T, Miyata K, Oshika T. Higher-order wavefront aberration and letter-contrast sensitivity in keratoconus. *Eye*. 2008;22 (12):1488-92.
4. Kosaki R, Maeda N, Bessho K. Magnitude and orientation of Zernike terms in patients with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(7):3062-68.
5. Kanavi M, Javadi MA, Sanagoo M. Indications for penetrating keratoplasty in Iran. *Cornea*. 2007;26(2):561-3.
6. Hossein Z, Mohammad RJ, Mohammad AJ, Farid K, Hossein P, Manijeh M. Epidemiology of Keratoconus in an Iranian Population. *Cornea*. 2012;31(4):1044-47.
7. Al-Aqaba M, Fares U, Suleman H. Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol* 2010;94(6):784-89.
8. Niederer RL, Sherwin T, McGhee CNJ. Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol*. 2007;91(9):1165-69.
9. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea*. 2001;20(4):374-84.
10. Müller LJ, Pels L, Cardozo BN, Willekens B. Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(5):985-94.
11. Niederer RL, Sherwin T, McGhee CNJ. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(7):2964-70.
12. Brookes N, Loh IP, Clover GM. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res*. 2003;77(4):515-24.

13. Patel D, McGhee CNJ. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47(4): 1348-51.

14. Patel D. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. Clin Exp Ophthalmol. 2007; 35(1): 71-88.

Recibido: 17 de octubre de 2012.

Aprobado: 2 de enero de 2013.

Dra. Janet González Sotero. Hospital Provincial "Abel Santamaría Cuadrado", km 3 ½ Carretera central. Pinar del Río, Cuba. Correo electrónico: marti@fsh.upr.edu.cu