



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría
MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límica

Presentado por María Merinero Molina.

Tutelado por Ana de la Mata Sampedro.

Revisión.

En Valladolid a, 27 de mayo del 2022.

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, por acompañarme amable y exhaustivamente en la realización de este trabajo.

A mis amigos, mis personas vitamina, que han sido prioridad en todo mi trayecto. Especialmente a Alejo Hubble, que es una de esas personas que te salvan sin saberlo.

A mi hermana Ana, que, como las ramas de los árboles, aunque crezcamos en distintas direcciones nuestra raíz siempre será la misma.

A mis padres, por ser el respaldo de mi vida y hacerlo todo más fácil. El esfuerzo tiene su recompensa.

A mí, que sin confiar lo he logrado.

COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS ÁREA DE SALUD VALLADOLID

Dr F. Javier Álvarez, Secretario Técnico del COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS del Área de salud Valladolid Este

CERTIFICA

En la reunión del CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID ESTE del 21 de abril de 2022,
se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente trabajo de fin de
grado:

PI 22-2688 TFG NO HCUV	HERRAMIENTAS ACTUALES DE IMAGEN IN VIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME DE INSUFICIENCIA LÍMBICA IOBA-2022-25	IP: ANA DE LA MATA SAMPEDRO EQUIPO: MARÍA MERINERO MOLINA, ANA DE LA MATA SAMPEDRO IOBA
------------------------------	--	---

A continuación, les señalo los acuerdos tomados por el CEIm ÁREA DE SALUD VA-
LLADOLID ESTE en relación a dicho Trabajo de fin de grado:

Considerando que el Trabajo fin de grado contempla los Convenios y Normas esta-
blecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la
protección de datos de carácter personal y la bioética, se hace constar el **informe
favorable** del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos Área de Salud
Valladolid Este para la realización del trabajo fin de grado.

Un cordial saludo.



F. Javier Álvarez

Dr. F. Javier Álvarez.
CEIm Área de Salud Valladolid Este
Hospital Clínico Universitario de Valladolid
Farmacología, Facultad de Medicina,
Universidad de Valladolid,
c/ Ramón y Cajal 7,47005 Valladolid
alvarez@med.uva.es, jalvarezgo@saludcastillayleon.es
tel.: 983 423077



D^a M^a Paz García García, como Secretaria de la Comisión de Investigación del IOBA, por delegación del Director.

Hace constar:

Que conoce la documentación relativa al estudio con código de la Comisión de Investigación **IOBA-2022-25** que lleva por título **Herramientas actuales de imagen in vivo para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica**, y que la misma ha sido evaluada previa realización por la Comisión de Investigación del IOBA.

El investigador principal del proyecto será:

D//D^a Ana de la Mata Sampedro

Declaro tener conocimiento y apruebo la realización del estudio en el IOBA.

En Valladolid a,

Fdo.: M^a Paz García García

Secretaria de la Comisión de Investigación

INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
1. LA CÓRNEA.....	4
2. EL LIMBO ESCLEROCORNEAL.....	5
3. CÉLULAS MADRE LIMBARES.....	6
4. EL NICHOS LIMBAR.....	7
5. SÍNDROME DE INSUFICIENCIA LÍMBICA.....	8
JUSTIFICACIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
DESARROLLO.....	11
1. HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO PARA EL SIL.....	11
1.1. HERRAMIENTAS CONVENCIONALES	
1.1.1. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN.....	11
1.2. HERRAMIENTAS DE IMAGEN <i>IN VIVO</i>	
1.2.1. LÁMPARA DE HENDIDURA.....	11
1.2.2. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA.....	13
1.2.3. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER DE BARRIDO <i>IN VIVO</i>	15
2. EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DEL SIL MEDIANTE HERRAMIENTAS DE IMAGEN <i>IN VIVO</i>	16
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIONES.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	20

RESUMEN

El epitelio corneal se mantiene gracias a la continua renovación de las células madre limbares (CML) que residen en la capa basal del limbo, concretamente en las denominadas empalizadas de Vogt. El comportamiento de estas células madre y su capacidad para responder ante necesidades del epitelio están estrechamente vinculados a su microambiente denominado nicho limbar.

La pérdida o disfunción de las CML o de su nicho limbar, da como resultado una pérdida de la integridad corneal, opacificación, neovascularización, invasión del tejido conjuntival en la córnea, dolor, y en último término, una discapacidad visual grave. Esto es conocido como síndrome de insuficiencia límbica (SIL).

Un rápido y eficiente diagnóstico del SIL, sería clave para la recuperación del epitelio corneal, por lo que se están utilizando diferentes tipos de herramientas de imagen *in vivo*, que permiten visualizar el estado del nicho limbar y, por tanto, evaluar su severidad para poder aplicar un tratamiento.

En este trabajo de fin de grado se ha hecho una revisión de las herramientas actuales de imagen para el diagnóstico del SIL.

ABSTRACT

The corneal epithelium is maintained by the continuous renewal of the limbal stem cells (LSC), located at the basal layer of the limbus, specifically in the so-called Vogt's palisades. The behaviour of these stem cells and their ability to respond to epithelium needs are closely related to their microenvironment, the limbal niche.

The loss or dysfunction of the LSC or their limbal niche results in loss of corneal integrity, opacification, neovascularisation, invasion of conjunctival tissue into the cornea, pain, and ultimately severe visual impairment. This is known as limbal stem cell deficiency (LSCD) syndrome.

A quick and efficient diagnosis of LSCD syndrome would be vital for the recovery of the corneal epithelium, so different types of *in vivo* imaging tools are being used to visualise the state of the limbal niche and, therefore, evaluate its severity in order to be able to apply a treatment.

In this work, a review of the current imaging tools for the diagnosis of the LSCD syndrome has been developed.

INTRODUCCIÓN

El contenido de este trabajo fin de grado se centra en las herramientas de diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica, específicamente las herramientas de imagen *in vivo*. Para poder comprender el trabajo, se hará una descripción previa de algunos conceptos.

1. LA CÓRNEA

La córnea es la estructura anterior central perteneciente a la superficie ocular e incluida en el sistema visual óptico. Sus principales funciones son proteger el contenido interno del ojo y actuar como tejido refractivo. Es una lente que permite la transmisión de la luz y su correspondiente enfoque en la retina gracias a su transparencia.¹

Dado que es un tejido avascular, el aporte nutricional proviene de la película lagrimal, del humor acuoso y de los vasos limbares. Además, es la estructura más inervada y por tanto más sensible del organismo, con finalidad protectora.²

La córnea es convexa y esférica con una curvatura anterior de 7,8 mm y una curvatura posterior de 6,5 mm aproximadamente. Tiene un espesor central en ojos normales en torno a 551-565 μm y un espesor periférico de 612-640 μm , los cuales pueden variar en portadores de lentes de contacto de larga duración o en personas miopes. Esta lente contribuye al poder refractivo con una potencia alrededor de 40 a 44 D, representando así el 70% de la refracción total.²

A nivel histológico, la córnea está formada por cinco capas. El epitelio es la más externa que se encuentra en continua renovación, y cuyas funciones principales son la protección de la estructura ocular y el mantenimiento de la transparencia. Seguida se encuentra la capa de Bowman, que es una fina superficie acelular que actúa como barrera. A continuación, se encuentra el estroma corneal, conformación gruesa de fibras de colágeno ordenadas que gracias a su estructura mantiene la curvatura y transparencia de la córnea. En la parte posterior se halla el endotelio, que está integrado por células hexagonales sin capacidad de regeneración, y finalmente la membrana de Descemet, que corresponde a una superficie de 10-20 μm de grosor que actúa como lámina basal del endotelio. Todas estas capas han de mantenerse en armonía para preservar la transparencia y con ello la función de la córnea.³

En referencia al epitelio corneal, es un tejido escamoso, estratificado y no queratinizado de unos 50 μm de grosor, que se compone de 5 a 7 capas celulares en la zona central, y entre 8 y 10 capas en la zona periférica.²

Este epitelio está formado por tres tipos de células diferentes, separadas en tres estratos: células escamosas planas en la parte más anterior (superficial), células aladas en la zona intermedia y células basales en el estrato basal. Las células de la capa superficial, escamosas, poseen gran cantidad de uniones intercelulares estrechas que ejercen de barrera anatómica frente al paso de sustancias externas. Las células de las capas intermedias, aladas, se encargan de sustituir a las células superficiales tras su descomposición. Y la última capa está compuesta por una única fila de células

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

basales con forma de columna y mayor capacidad de división mitótica, que irán reemplazando a las células de las capas suprabasales (Figura 1).^{2,4}

Sus funciones más importantes son actuar como barrera mecánica, metabólica y farmacológica, así como contribuir a la transparencia y regenerar la superficie ocular. Esta renovación y cicatrización corneal se realiza gracias a unas células procedentes del limbo esclero-corneal, llamadas células madre limbares (CML).⁴

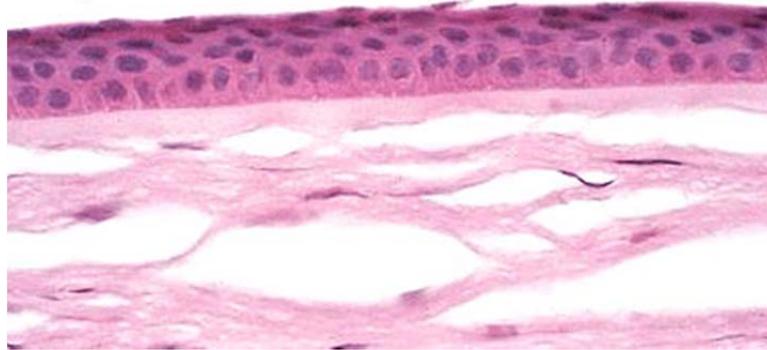


Figura 1. Epitelio corneal, membrana de Bowman y estroma. Francés-Muñoz E. (2005). Micropunción estromal anterior en la queratopatía bullosa.

2. EL LIMBO ESCLEROCORNEAL

El limbo es la zona de transición con forma anular entre la córnea y la esclera-conjuntiva, que separa la córnea transparente avascular de la conjuntiva y esclera opacas vascularizadas. Es una conformación de 1.5 mm de ancho y de grosor aproximadamente el doble al epitelio corneal debido al aumento de las capas celulares.⁵

Este tejido corresponde a la zona de transición gradual entre el epitelio corneal y conjuntival. El epitelio corneal está formado por células epiteliales estratificadas no queratinizadas y células epiteliales planas escamosas en su capa superior. El epitelio conjuntival está compuesto por células epiteliales no queratinizadas y células caliciformes que ayudan a mantener la capa lagrimal.

El nicho limbar se encuentra situado en las denominadas empalizadas de Vogt del limbo, estructuras radiales en cuya capa epitelial basal se localiza una población de CML, responsables de la regeneración continua del epitelio de la córnea. Además, también forma parte el estroma limbar que está altamente vascularizado y contiene células pigmentadas (melanocitos) con el fin de proteger a las células madre de la radiación UV.⁵

El limbo tiene gran importancia por diferentes funciones: ayuda a mantener la presión intraocular gracias a los componentes del sistema de drenaje del humor acuoso que comprende, abarca el nicho de células madre para la regeneración y cicatrización del epitelio corneal, y es una importante marca quirúrgica. Además, proporciona nutrición a la córnea periférica gracias a los vasos, y es una barrera física entre conjuntiva y córnea impidiendo la entrada del epitelio conjuntival en la córnea. Esta última función se considera importante, ya que la invasión del epitelio conjuntival en la córnea, el cual está

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

vascularizado y no es transparente, produciría una opacidad corneal y, por tanto, una disminución de la visión.

3. CÉLULAS MADRE LIMBARES

Las CML son un grupo de células ubicadas en la capa basal del epitelio limbar, en las denominadas empalizadas de Vogt, que se caracterizan por estar en continua renovación. Su principal función es el mantenimiento del epitelio corneal y, por ende, su transparencia.⁶

El epitelio corneal se mantiene gracias a la proliferación y migración de estas células madre siguiendo la hipótesis XYZ, descrita por Thoft et al (1983)⁷. Esta teoría explica que existe un movimiento y proliferación celular en torno a los tres ejes cartesianos, que van a dar lugar a la continua renovación del epitelio corneal. La X representa la proliferación de las células basales a capas superiores; la Y representa la migración de las células limbares con movimiento centrípeto desde el limbo hacia la córnea; y la Z corresponde a la pérdida o escamación de células epiteliales de la superficie corneal (Figura 2). Para que este mantenimiento sea eficaz ha de preservarse en equilibrio la pérdida celular con el reemplazo mediante la ecuación $X+Y=Z$.^{4,6}

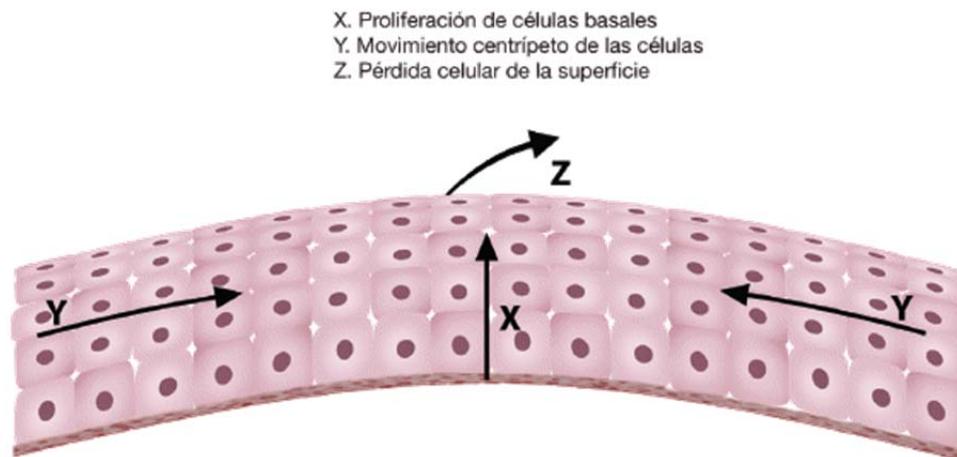


Figura 2. Representación gráfica de los tres ejes descritos en la hipótesis de Thoft. Fernandez A. et al. (2008) Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques.⁴

Dado que las CML son las responsables de la regeneración del epitelio corneal, si existe daño en éstas o en su nicho limbar, se genera una deficiencia y, por tanto, una afectación del epitelio provocando un desequilibrio en el reemplazo epitelial. Este desequilibrio conduce a la invasión de células conjuntivales en córnea, opacificación y neovascularización, conllevando a una pérdida de visión, lo que se denomina como síndrome de insuficiencia límbica (SIL).

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límica.

La preservación de las células madre depende de las condiciones microambientales del nicho limbar donde residen para su correcta diferenciación y rápida regeneración celular.⁸

4. EL NICHOS LIMBAR

El microambiente donde residen las células madre limbares es el llamado nicho limbar, ubicado en las empalizadas de Vogt del limbo corneal (Figura 3). Se ha establecido que la preservación y posterior diferenciación y migración de las CML depende directamente de las condiciones específicas del nicho.⁵

El nicho limbar tiene la ventaja de que se puede visualizar *in vivo* y observar sus estructuras: empalizadas de Vogt, criptas epiteliales limbares, proyecciones estromales y lagunas limbares.⁸ Las empalizadas de Vogt son estructuras en forma de columnas o crestas fibrovasculares, con tejido conectivo que incluye vasos y nervios; y las criptas epiteliales del limbo son formaciones que se extienden desde la periferia, con carácter protector de las CML.⁹

El objetivo de esta conformación es proteger y regular la funcionalidad de las células madre limbares, por lo que una lesión o alteración en cualquier componente del nicho limbar puede provocar disfunción de estas.⁸

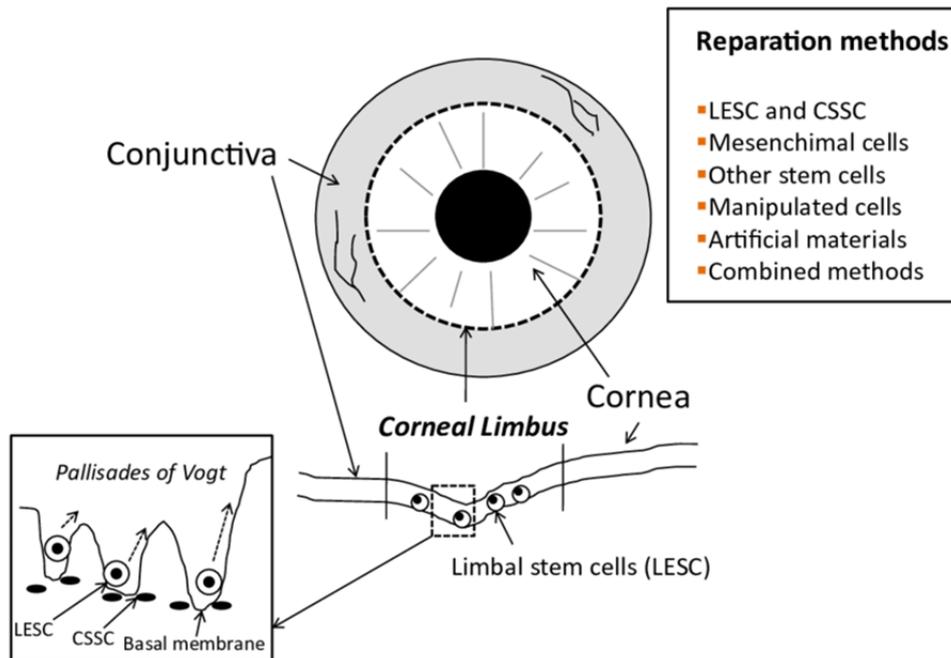


Figura 3. Estructura básica del nicho del limbo corneal. Rodríguez F, Vecino E. (2015). Repair of corneal damage with stem cells.

5. SÍNDROME DE INSUFICIENCIA LÍMBICA

El síndrome de insuficiencia límbica (SIL) es una entidad clínica producida por una pérdida o disfunción de las células madre o de su nicho, impidiendo la regeneración del epitelio corneal. Dada esta falta de reemplazo del epitelio corneal, se produce un mecanismo de conjuntivalización donde la conjuntiva trata de invadir la córnea. A este signo clínico, también van asociados una aparición de neovasos en la córnea (neovascularización), así como erosión, formación de úlceras, crecimiento de tejido fibroso, inflamación persistente, dolor crónico y, en último caso, una opacificación de la córnea que da lugar a una pérdida de visión total o parcial.¹⁰

Las causas de esta enfermedad pueden ser de carácter hereditario o adquirido. Si están asociadas al ámbito genético, puede aparecer disfunción de las células madre por aniridia, por deficiencia endocrina múltiple, por queratitis neurotrófica o por causas idiopáticas. Por otra parte, puede estar asociado a factores externos, como quemaduras químicas o térmicas, enfermedades inmunológicas como el síndrome de Stevens-Johnson y penfigoide cicatrizal ocular, cirugías, queratopatía inducida por lentes de contacto o procesos infecciosos.¹¹

La destrucción de las CML y su consecuente desequilibrio epitelial, dan lugar a una serie de signos clínicos que hemos de tener en cuenta para obtener el diagnóstico. Destaca en esta condición patológica la aparición de neovasos en los 360° y la invasión de epitelio conjuntival que puede observarse analizando la existencia de células caliciformes en la córnea mediante una citología de la superficie ocular. Por otra parte, se podrá visualizar daños o úlceras corneales mediante una tinción con fluoresceína. Además, se produce inflamación crónica del estroma corneal, dando lugar a un grosor de córnea variable y la pérdida de las empalizadas de Vogt, que podrán evaluarse con técnicas de imagen *in vivo*, como se hablará a lo largo de este trabajo.

Además de estos signos, en un SIL grave, pueden darse diferentes complicaciones persistentes o recurrentes como úlceras corneales que implican pérdida de tejido estromal, perforaciones corneales si alcanzan la membrana de Descemet, y calcificaciones y cicatrices por consecuencia de los defectos epiteliales. La opacificación de la córnea puede ser secuela de estas complicaciones y llevar a la pérdida de visión, e incluso ceguera.

Los síntomas pueden consistir en una disminución de la agudeza visual, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, episodios de dolor por la ruptura epitelial, inflamación y enrojecimiento crónico conjuntival; además de lagrimeo y blefaroespasmos. Dado que estos síntomas pueden ser ambiguos para otras patologías, es importante poder reconocer correctamente los signos clínicos que se pueden explorar con diferentes herramientas que se van a detallar a lo largo del presente trabajo de fin de grado.^{4,6,10}

En cuanto a su severidad, el síndrome de insuficiencia límbica puede afectar de forma parcial o total a las estructuras del ojo.

Se denomina SIL parcial cuando la deficiencia de células madre limbares afecta a algunas zonas localizadas del limbo y la córnea mientras que otras están sanas. En este caso, puede diagnosticarse identificando el sector donde se hallan los signos clínicos obtenidos con las diferentes herramientas

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

convencionales y de imagen *in vivo* de las que se hablan en el apartado de desarrollo, y corroborando que la patología no está expandida a todo el ojo. El SIL parcial tiene mejor pronóstico, ya que no todo el limbo está afectado. Los pacientes asintomáticos y con área central preservada pueden no requerir intervención.⁶

Cuando el limbo corneal está enfermo al completo, se denomina insuficiencia límbica total o difusa. La detección clínica es importante ya que un SIL parcial podría dar lugar a un SIL total con el paso del tiempo. El diagnóstico del SIL grave, con ausencia casi completa del epitelio corneal y opacidad severa, conduce a la ceguera. El tratamiento en estos casos suele conllevar, entre otros, a un trasplante de células madre, ya que hace falta una fuente externa de CML (autólogas o alogénicas) para sustituir a las que se han perdido y poder regenerar el epitelio corneal. El objetivo es la reepitelización corneal y restauración de la transparencia, siempre y cuando se tenga en cuenta la posibilidad de rechazo del tejido.¹² Cuando se realiza un trasplante de limbo exitoso, la superficie se regenera rápidamente sin defectos epiteliales recurrentes y la vasculatura corneal regresa a su estado normal. Además, se mejora la agudeza visual gracias a la regeneración del epitelio y la disminución de la opacidad corneal.⁶

El SIL aparece por la deficiencia o mal funcionamiento del nicho limbar, por lo que el tratamiento de esta patología ha de ir dirigido no sólo a repoblar la población de células madre, sino también a restaurar dicho microambiente para preservar su supervivencia. Actualmente, ya se están aplicando este tipo de terapias, desde trasplantes de tejido limbar a trasplantes de CML o células madre mesenquimales.¹²

Los tratamientos apropiados pueden prevenir la progresión y la afectación de la superficie ocular, incluso evitando la ceguera en la mayor parte de los casos.

JUSTIFICACIÓN

Considerando la gravedad del síndrome de insuficiencia límbica hasta el punto de provocar la pérdida de visión, es importante conocer las herramientas actuales de diagnóstico que ayuden tanto a evaluar como a un tratamiento más temprano y eficiente de la enfermedad. Por este motivo, en el presente trabajo se van a describir las herramientas actuales de diagnóstico del SIL, centrándonos principalmente en las de imagen *in vivo*.

OBJETIVOS

1. Realizar una búsqueda bibliográfica en relación a las herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del SIL.
2. Dar a conocer las diferentes herramientas de imagen *in vivo* para el diagnóstico del SIL.
3. Describir la utilidad y ventajas de las herramientas de imagen *in vivo* para el diagnóstico y seguimiento del SIL.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este TFG se han revisado artículos científicos con su correspondiente comprensión y recopilación de contenidos en PubMed y WOS desde el año 2000 hasta el 2021. Se han utilizado diferentes términos de búsqueda: “stem cell”, “corneal limbal stem cells diagnostic”, “limbic insufficiency syndrome”, “corneal function”, “corneal limbus”, “slit lamp”, “OCT”, “confocal microscopy”, “limbal stem cell restoration”.

En base a todos los datos expuestos e información, se adjunta la bibliografía de referencia.

DESARROLLO

1. HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO PARA EL SIL

El diagnóstico de la deficiencia de las células madre limbares comienza teniendo en cuenta la anamnesis y síntomas del paciente. Sin embargo, para realizar un buen y temprano diagnóstico, y poder evaluar el estado de las células y del nicho limbar, es necesaria la utilización de diferentes herramientas que permitan obtener hallazgos que indiquen signos clínicos relacionados con el SIL, y, por tanto, que ayuden también a realizar un seguimiento de la enfermedad para controlar los cambios.

1.1. HERRAMIENTAS CONVENCIONALES

1.1.1. CITOLOGÍA DE IMPRESIÓN

La citología de impresión es el método que permite evaluar la superficie ocular a partir de muestras del epitelio. Se realiza colocando un filtro de acetato de celulosa sobre la córnea, para después retirarlo y caracterizar las células extraídas. Es una técnica invasiva que puede generar alguna molestia por lo que es necesario instilar anestesia tópica en la superficie ocular.¹¹

Mediante esta técnica se detecta células epiteliales y caliciformes, por lo que la presencia de estas últimas en la córnea indica la invasión de células conjuntivales y, por tanto, la existencia de una patología. La aparición de células conjuntivales en la córnea, es uno de los signos más distintivos del SIL. Sin embargo, se necesitan otras herramientas que permitan evaluar otros conceptos como el estado del nicho limbar o el grado de severidad.

Esta técnica depende de otros factores de manejo, como el tamaño de los poros del filtro utilizado y la presión aplicada cuando se realiza la prueba. Además, es de gran importancia la ubicación de la extracción de la muestra, ya que existen casos de SIL donde el signo de células conjuntivales en córnea únicamente se halla en una zona concreta, es decir, de forma sectorial, corriendo el peligro de no encontrar signo de células conjuntivales en la muestra recogida.⁹

La citología de impresión ayuda en el diagnóstico de SIL, pero no es la prueba más sensible y específica para detectar células caliciformes del epitelio conjuntival y corneal, por lo que es necesario recurrir a otro tipo de técnicas para confirmar la patología.¹¹

1.2. HERRAMIENTAS DE IMAGEN *IN VIVO*

1.2.1. LÁMPARA DE HENDIDURA

La lámpara de hendidura es un dispositivo biomicroscópico que permite evaluar la superficie ocular y el segmento anterior principalmente. Consiste en la proyección de luz sobre el ojo donde el especialista enfoca diferentes zonas dependiendo de lo que se necesite explorar. Se observan las estructuras en tres dimensiones mirando de manera directa o indirecta, y con opción de utilizar aumentos que vienen incorporados.¹³

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

Es un proceso no invasivo e indoloro, por lo que no hace falta el uso de anestesia. Sin embargo, el examen realizado bajo luz blanca proporciona información limitada, por lo que es preferible utilizar tinción con fluoresceína bajo luz azul cobalto para detectar los signos de manera más exhaustiva.¹⁰

Para realizar esta técnica, es necesario un conocimiento de la misma, ya que existen diferentes tipos de iluminaciones como directa, indirecta o retro, así como, diferentes grosores del haz de luz que proporcionan información distinta, como sección óptica, haz ancho, o paralelepípedo.¹³

El uso de la lámpara de hendidura es clave para el diagnóstico del SIL gracias a los signos característicos de la misma que nos aporta.

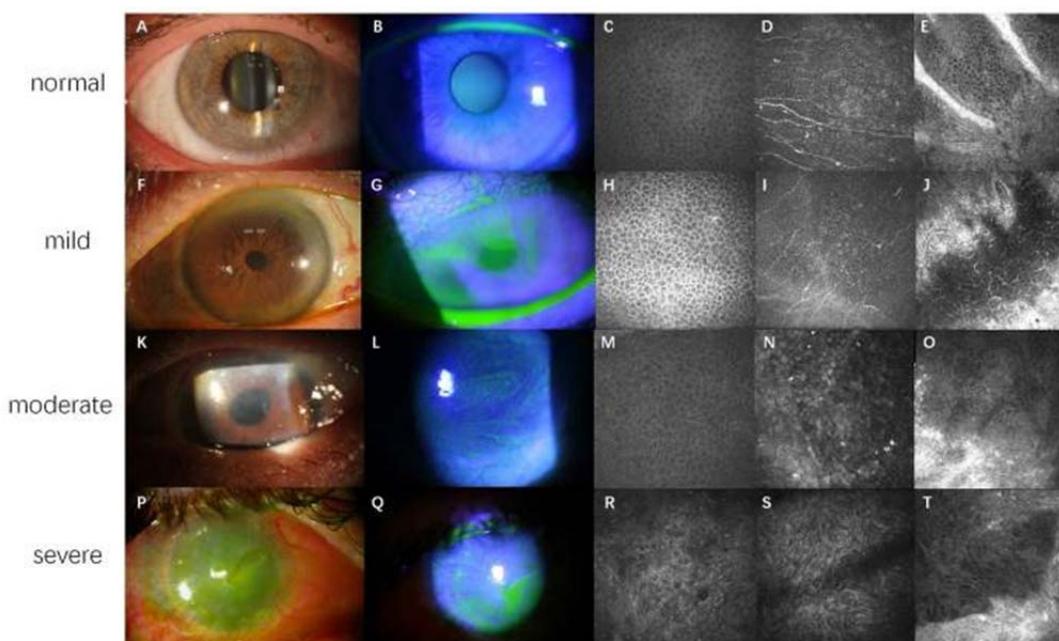


Figura 4. Presentaciones clínicas e imágenes confocales del SIL en diferentes etapas: normal, leve, moderado y severo. (A),(F),(K),(P) corresponden a imágenes de la superficie ocular bajo luz blanca con lámpara de hendidura; (B),(G),(L),(Q) corresponden a imágenes bajo luz azul cobalto con lámpara de hendidura; (C),(H),(M),(R) son imágenes confocales de la córnea central; (D),(I),(N),(S) son imágenes confocales del epitelio basal de la córnea central; (E),(J),(O),(T) son imágenes confocales de las empalizadas de Vogt. Le Q, Xu J, Deng SX. (2018) The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf.*

A través de la lámpara de hendidura y tras realizar una tinción con fluoresceína, en un ojo sano se observa el epitelio corneal transparente y ninguna tinción. En cambio, si aparecen zonas con fluoresceína sobre la córnea o limbo significa que hay una lesión y, dependiendo de su magnitud, se puede clasificar la insuficiencia límbica en leve, moderada o grave (Figura 4). En los primeros estadios, comienza observándose una tinción en forma de punteado que se ve bajo luz azul cobalto y, a medida que progresa, puede verse un patrón en espiral invadiendo desde el limbo hacia la córnea.

El SIL se va transformando en una patología más severa según aumenta el grado de opacidad y turbidez epitelial y estromal, además de aparecer

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

neovascularización. Esta neovascularización puede observarse por una migración de células conjuntivales a la córnea, que atraen vasos y pueden aparecer generalmente en etapas moderadas (Figura 4).¹⁰

En cuanto al reflejo del haz de luz, se convierte en irregular y pierde transparencia debido al adelgazamiento de la superficie epitelial de algunas zonas, e incluso puede terminar siendo opaco. Además, en estadios avanzados, puede generarse un pannus fibrovascular, definido como una inflamación periférica de la córnea junto con vascularización, que se observa bajo luz blanca. Otro signo característico es la anatomía anormal del limbo y la pérdida de sus características estructurales, así como el hallazgo de una película lagrimal inestable.¹⁰

Aunque estos signos son característicos de esta enfermedad, también pueden estar presentes en otras patologías por lo que se debe valorar los síntomas y demás hallazgos con otras técnicas para confirmar el diagnóstico del SIL.

1.2.2. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es la herramienta que sirve para obtener imágenes de la retina y nervio óptico de forma habitual, pero también permite explorar el segmento anterior.

Es una técnica no invasiva que utiliza la interferometría de baja coherencia, es decir, compara la luz infrarroja reflejada de las estructuras con un haz de referencia, y realiza varios cortes transversales para conseguir una imagen de alta resolución.¹⁰

Destacando la parte anterior del ojo, la OCT puede aportar información de la córnea, limbo, cámara anterior y ángulo.

Se puede medir el grosor del epitelio y afirmar que en pacientes con SIL se encuentra adelgazado. Un epitelio limbar delgado se relaciona con un daño en las empalizadas de Vogt y una pérdida de capas celulares. La OCT proporciona información *in vivo* sobre el patrón de las empalizadas de Vogt y su profundidad, que en ojos sanos aparecen con forma elíptica y baja dispersión.^{9,10}

También, gracias a la OCT se pueden observar signos patológicos de SIL como la pérdida de ondulaciones estromales y la pérdida de la clara transición epitelio-estroma. En ojos normales, la capa de células basales del epitelio corneal se puede ver como una fila reflectante baja, y las fibras nerviosas como un haz altamente reflectante.⁹

Se considera también un tipo de OCT a la herramienta de angiografía-OCT, la cual permite obtener imágenes del flujo sanguíneo gracias al contraste intravenoso que se inyecta. En este caso, se estudia la circulación a través de las imágenes ya que el movimiento de la sangre va cambiando. En cuanto a los pacientes con SIL, es relevante esta prueba para analizar la neovascularización corneal patológica y la vasculatura limbar. Una limitación de esta técnica es que la neovascularización es común a otras patologías, por lo que no se puede diagnosticar una deficiencia de células madre con esta prueba, pero sí se puede calificar el estadio de dicha patología en caso de tenerla.¹⁰

Los signos obtenidos con OCT en la córnea y limbo son indicadores del estado de salud de ambos tejidos, incluyendo las células madre, por lo que la exploración con esta técnica puede ser de gran ayuda en el diagnóstico del SIL.⁹

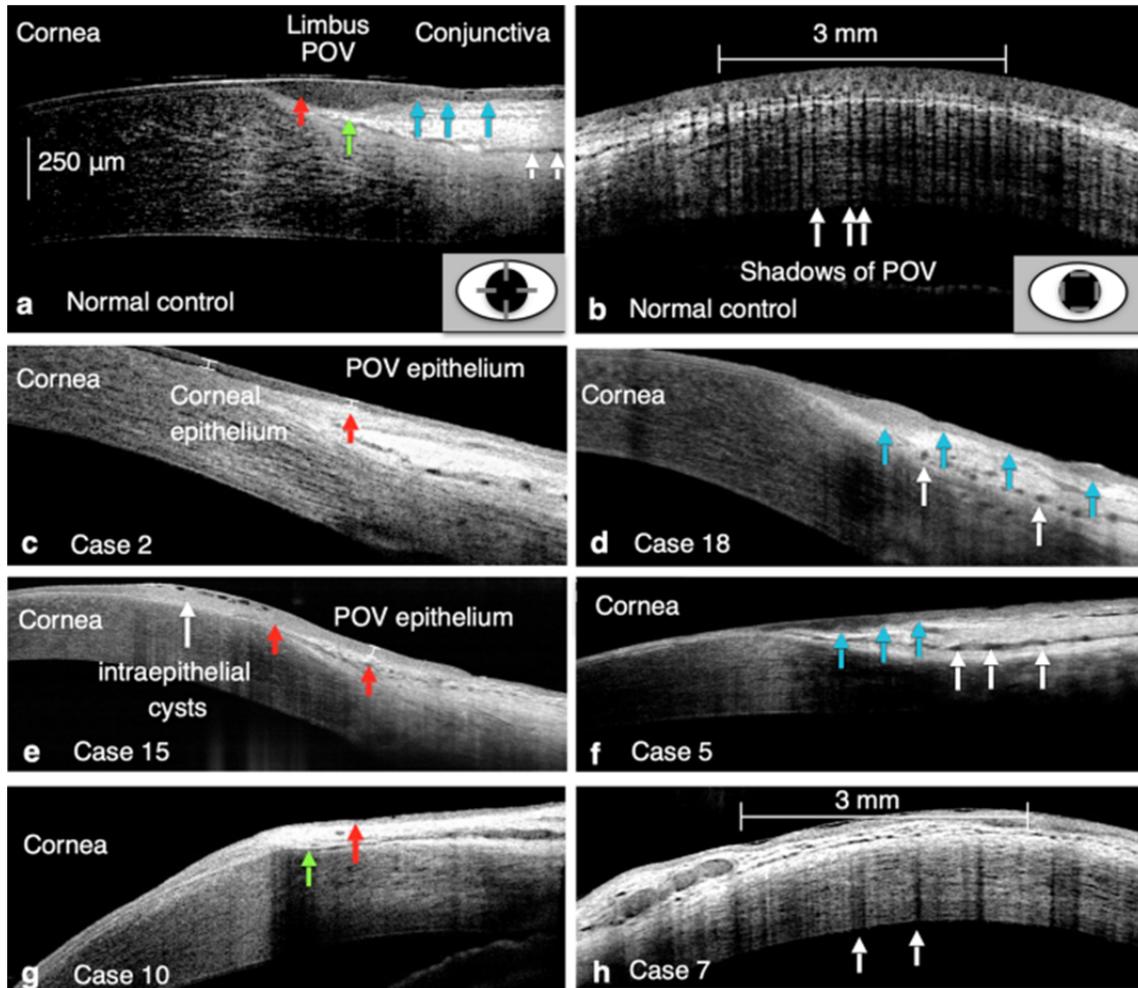


Figura 5. Patrones de las empalizadas de Vogt definidos como “normales” o “anormales” según los hallazgos de la OCT. (A) Flecha roja: disminución del espesor epitelial hacia los lados. Flecha verde: unión córnea-limbo. Flecha azul: interfaz epitelio-estroma. Flechas blancas: vasos del estroma limbar. (B) Flechas blancas: ubicación de las empalizadas de Vogt. (C) Disminución del espesor epitelial de las empalizadas de Vogt. (D) Flechas azules: pérdida interfaz epitelio-estroma de las empalizadas de Vogt. Flechas blancas: vasos estromales dilatados. (E) Flechas rojas: epitelio de las empalizadas disminuido. (F) Flechas azules: interfaz epitelio-estroma desigual. Flechas blancas: vasos estromales limbares dilatados. (G) Flecha verde: pérdida de la punta afilada típica de las empalizadas de Vogt. Flecha roja: disminución del espesor epitelial de las empalizadas de Vogt. (H) Sombras de las empalizadas de Vogt. Chen, YY. et al. (2021) Spectral-domain optical coherence tomography for evaluating palisades of Vogt in ocular surface disorders with limbal involvement.

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límica.

1.2.3. MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER DE BARRIDO *IN VIVO*

La microscopía confocal de barrido láser es una herramienta que permite observar las partes oculares a nivel celular *in vivo*. Es un método no invasivo cuyo funcionamiento se basa en focalizar una zona microscópica y eliminar la luz procedente de los planos adyacentes.¹⁰

Dando importancia al segmento anterior, este instrumento sirve para explorar la morfología del epitelio corneal, el estroma corneal y el limbo, clasificándolo como sano o patológico (Figura 6). En ojos sanos, el epitelio corneal es transparente con células basales y células aladas definidas cuyos núcleos no son visibles. También se puede detectar el plexo nervioso subbasal en esta capa, y las empalizadas de Vogt hiperreflectantes en el área limbar.¹⁰

Con esta técnica se detectan también células calciformes en córnea en pacientes con insuficiencia límica (conjuntivalización), uno de los signos clave para su diagnóstico.

En pacientes con SIL, suceden cambios en las células epiteliales basales y aladas, teniendo estas los bordes menos definidos, núcleos prominentes y estar asociadas a una pérdida de estratificación corneal, específico de esta patología. En etapas tempranas, los sujetos con SIL tienen una disminución de aproximadamente el 38% en densidad de células basales del epitelio, y una reducción del 58% en densidad nerviosa subbasal. A medida que la enfermedad se vuelve grave, las células epiteliales comienzan a ser metaplásicas y se observa neovascularización.¹¹

Además, aparecen daños en la morfología limbar, habiendo también una disminución de la densidad celular en esta zona y, por tanto, un epitelio limbar reducido.¹⁰ En cuanto a las empalizadas de Vogt, se ven alteradas o desaparecen en pacientes con SIL. La degradación de estas estructuras y la invasión de células inflamatorias están directamente relacionadas con la progresión de la patología.⁹ El plexo nervioso subbasal disminuye, es decir, que la inervación epitelial se ve alterada afectando al mantenimiento del equilibrio de la córnea. En pacientes con SIL grave, el plexo nervioso subbasal no es detectable, sin embargo, esto no es un parámetro específico de la deficiencia de células madre.¹⁰

La microscopía confocal *in vivo* permite diagnosticar el SIL, valorar el grado de severidad, y hacer un seguimiento de la progresión de la patología distinguiendo los cambios microestructurales.⁹

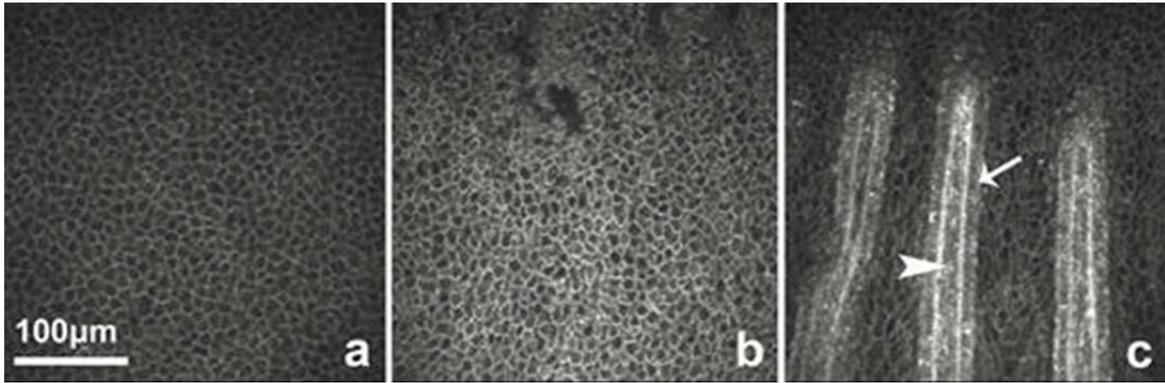


Figura 6. Imágenes de microscopía confocal *in vivo* con barrido láser de (a) el epitelio basal central, (b) el epitelio basal del limbo corneal y (c) las empalizadas de Vogt. Dipika V. Patel et al. (2006) Laser Scanning In Vivo Confocal Microscopy of the Normal Human Corneoscleral Limbus.

2. EVALUACIÓN Y SEGUIMIENTO DEL SIL MEDIANTE HERRAMIENTAS DE IMAGEN *IN VIVO*

El completo diagnóstico del SIL incluye la exploración mediante citología de impresión, lámpara de hendidura, OCT y microscopía confocal *in vivo*, mismos métodos que se utilizarán para el posterior seguimiento y evaluación.

Como se ha hablado a lo largo del trabajo, los signos evaluados con lámpara de hendidura consisten en conjuntivalización, defectos epiteliales, inflamación de la superficie ocular, cicatrización y neovasos. Por otro lado, se han descrito hallazgos clínicos, como la visualización de células caliciformes en córnea, obtenidos con microscopía láser confocal.¹⁵

La evaluación clínica con microscopía confocal y citología de impresión puede tanto confirmar el diagnóstico de la patología como evaluar el seguimiento y los resultados postoperatorios. Además, el estudio con OCT sugiere también hallazgos precisos para el diagnóstico del SIL, que son la reflectividad epitelial y estromal, y la densidad vascular, que sirven de igual modo para evaluar el seguimiento de la enfermedad y la evolución de su tratamiento. Esta evaluación completa conlleva tiempo, premisa que retrasa el diagnóstico.¹⁶

Un diagnóstico preciso del SIL y una buena clasificación del mismo, son las condiciones necesarias para proponer un tratamiento adecuado.

En cuanto al seguimiento del SIL, mediante las herramientas de imagen *in vivo* que se han descrito en el trabajo, se pueden valorar y cuantificar los cambios celulares en la córnea y limbo, sirviendo como indicadores de la progresión. Con las herramientas de imagen *in vivo* revisadas, es posible reevaluar la superficie ocular y explorar los diferentes signos a diferentes tiempos, con el fin de realizar un seguimiento del tratamiento aplicado u obtener un nuevo diagnóstico.

Por otro lado, la densidad de células basales, de los nervios subbasales y el grosor epitelial son tres signos calificables para conocer el estadio de la patología. La combinación de las pruebas con lámpara de hendidura,

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

microscopía confocal *in vivo*, OCT y citología de impresión, puede detectar este tipo de cambios microestructurales para la estadificación del SIL, tanto para la evaluación como para el seguimiento de los resultados tras la terapia.¹⁰

Para poder realizar una correcta evaluación del SIL, han de existir criterios estándar que permitan clasificar la patología de forma internacional, así como evaluar los resultados clínicos correspondientes a las diferentes terapias.⁸ Para evaluar estos resultados tras un tratamiento, es necesario contar con este tipo de herramientas de imagen *in vivo*, que permitan analizar la posible regeneración y mantenimiento de la superficie ocular.¹⁶

El seguimiento clínico tras un procedimiento quirúrgico, se realiza cada cierto tiempo para evaluar la superficie ocular. Se recogen muestras de diferentes sectores de la córnea y se analizan para valorar el grado de afectación. En pacientes con SIL, mediante citología de impresión se observan células conjuntivales en córnea y células epiteliales metaplásicas. Tras el tratamiento, en el seguimiento ha de ser evidente la mejora, encontrando un epitelio libre de células caliciformes y la disminución del número de células inflamatorias. A lo largo del tiempo, las células alteradas son más escasas y los vasos sanguíneos son casi normales, encontrando entre los 12 y 24 meses una superficie ocular prácticamente normal.¹⁷

En general, los resultados tras las diferentes terapias, son favorables y prometedores para recuperar la visión de los ojos patológicos. Un epitelio corneal sano es necesario para una buena visión y protección ocular.¹⁸

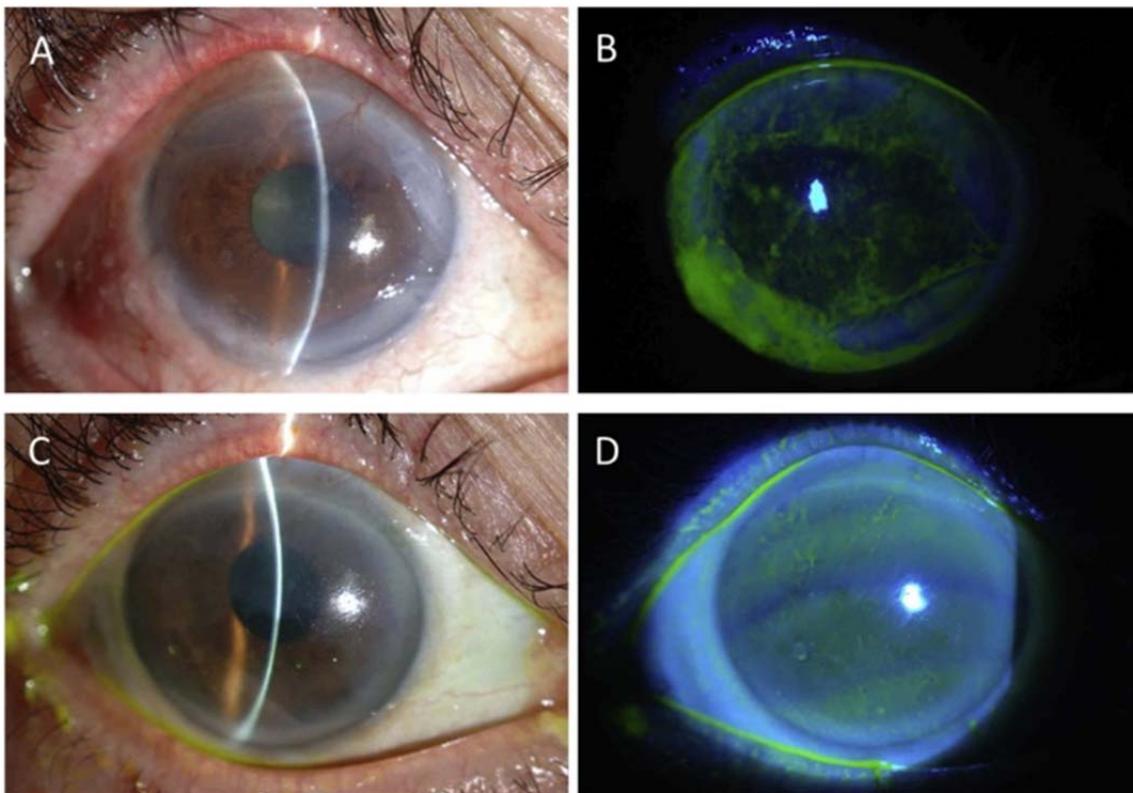


Figura 7. Imágenes clínicas del ojo de un paciente antes (A,B) y después (C,D) de un trasplante epitelial limbal cultivado alogénico. Bains KK. et al. (2019) Recovering vision in corneal epithelial stem cell deficient eyes.

DISCUSIÓN

Las diferentes herramientas actuales de imagen *in vivo* detalladas en el presente trabajo son las más específicas para poder reconocer un ojo con SIL. Cada técnica nos aporta información diferente que es necesaria para distinguir los signos clínicos característicos de esta patología y concluir con un diagnóstico eficaz.

En cuanto a la lámpara de hendidura, es un método más subjetivo donde resaltan los signos patológicos y pueden ser captados tras una exploración o pasar desapercibidos. Para la realización de un buen diagnóstico hacen falta pruebas objetivas y demostradas científicamente. En cuanto a la citología de impresión, demuestra la existencia de células caliciformes en córnea si están en la zona donde se muestrea, una limitación a tener en cuenta.¹⁴

El trabajo destaca, sobre todo, la importancia de las herramientas de carácter *in vivo*, siendo el OCT y la microscopía confocal las más relevantes.

El láser confocal *in vivo* permite el diagnóstico de todas las capas de la córnea y de la estructura limbar de forma microscópica. Es una técnica muy discriminatoria y, junto con la citología de impresión sirven para evaluar la composición del epitelio y su posterior seguimiento tras el correspondiente tratamiento. La exploración con lámpara de hendidura puede determinar la zona afectada y facilitar la ubicación de la patología para el posterior examen con microscopía confocal *in vivo*.¹⁰

Los signos clínicos como la neovascularización, la opacidad corneal, la tinción con fluoresceína y el pannus fibrovascular, no son patognomónicos del SIL, es decir, están presentes en otras patologías. Lo más distintivo de la insuficiencia límbica es la invasión de tejido conjuntival en córnea, por lo que cualquier instrumento que detecte este signo, puede ser de gran ayuda. Sin embargo, aparte de la conjuntivalización, se sabe que la disminución de densidad de células epiteliales limbares y del plexo nervios subbasal son propias de esta condición. En resumen, se puede decir que, estos signos por separado no nos aportan un diagnóstico, pero en conjunto se consideran signos característicos del SIL.⁸

El diagnóstico y la estadificación del SIL se definen por la suma de los resultados adquiridos con las diferentes herramientas propuestas para administrar posteriormente un tratamiento específico.

La OCT de segmento anterior y la microscopía láser confocal complementan a la citología de impresión tanto para el diagnóstico como para el seguimiento del paciente.

CONCLUSIONES

1. Para realizar un diagnóstico preciso del síndrome de insuficiencia límbica, es necesario encontrar herramientas que aporten información a nivel microscópico, tanto celular como estructural o histológico.
2. Las herramientas de imagen *in vivo*, como la OCT y la microscopía láser confocal, complementadas con las convencionales, aportan información imprescindible para poder realizar un diagnóstico y seguimiento preciso del SIL.
3. Gracias a los avances tecnológicos y a la continua investigación, se progresa hacia un conocimiento más preciso sobre el SIL, su diagnóstico y su tratamiento.

Merinero, M. Herramientas actuales de imagen *in vivo* para el diagnóstico del síndrome de insuficiencia límbica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. *Prog Retin Eye Res.* 2015 Nov; 49:1-16. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.001.
2. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018 Feb; 66(2):190-194. doi: 10.4103/ijo.IJO_646_17.
3. Espana EM, Birk DE. Composition, structure and function of the corneal stroma. *Exp Eye Res.* 2020 Sep; 198:108137. doi: 10.1016/j.exer.2020.108137.
4. Fernández A., Moreno J., Prósper F., García M., Echeveste J. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *Anales Sis San Navarra.* 2008 Abr; 31(1): 53-69.
5. Ashkon G, Seyed-Safi, Julie T, Daniels. The limbus: Structure and function. *Experimental Eye Research* 2020; Volume 197, <https://doi.org/10.1016/j.exer>.
6. Dua H S, Saini J S, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency : Concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* 2000; 48:83-92.
7. Thoft RA, Friend J; The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1983; 24(10):1442-1443.
8. Bonnet C, Roberts JS, Deng SX. Limbal stem cell diseases. *Experimental Eye Research.* 2021; Volume 205. doi.org/10.1016/j.exer.2021.108437.
9. Kim KH, Mian SI. Diagnosis of corneal limbal stem cell deficiency. *Current Opinion in Ophthalmology.* 2017 Jul;28(4):355–62. doi: 10.1097/ICU.0000000000000387.
10. Le Q, Xu J, Deng SX. The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf.* 2018 Jan; 16(1):58-69. doi: 10.1016/j.jtos.2017.11.002.
11. Sejjal K, Bakhtiari P, Deng SX. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2013 Jan-Mar; 20(1):5-10. doi: 10.4103/0974-9233.106381.
12. Calonge M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M. Goals and Challenges of Stem Cell-Based Therapy for Corneal Blindness Due to Limbal Deficiency. *Pharmaceutics.* 2021 Sep 16;13(9):1483. doi: 10.3390/pharmaceutics13091483.
13. Martin R. Cornea and anterior eye assessment with slit lamp biomicroscopy, specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy. *Indian J Ophthalmol.* 2018 Feb; 66(2):195-201. doi: 10.4103/ijo.IJO_649_17.
14. Nubile M, Lanzini M, Miri A, Pocobelli A, Calienno R, Curcio C, Mastropasqua R, Dua HS, Mastropasqua L. In Vivo Confocal Microscopy in Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency. *American Journal of Ophthalmology.* 2013; Volume 155, Issue 2, Pages 220-232, doi.org/10.1016/j.ajo.2012.08.017.
15. Prabhasawat P, Chirapapaisan C, Ngowiyutagon P, Ekpo P, Tangpagasit W, Lekhanont K, Sikarinkul R, Matamnan S, Boonwong C, Pinitpuwadol W, Thamphithak R, Sukon N, Neti N, Efficacy and outcome of simple limbal epithelial transplantation for limbal stem cell deficiency verified by epithelial phenotypes integrated with clinical evaluation, *The Ocular Surface.* 2021. Volume 22, Pages 27-37, ISSN 1542-0124, doi.org/10.1016/j.jtos.2021.06.012.
16. Varma S, Shanbhag SS, Donthineni PR, Mishra DK, Singh V, Basu S. High-Resolution Optical Coherence Tomography Angiography Characteristics of Limbal Stem Cell Deficiency. *Diagnostics (Basel).* 2021 Jun 21; 11(6):1130. doi: 10.3390/diagnostics11061130.
17. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I. Tratamiento de la insuficiencia limbal grave mediante cirugía combinada de trasplante de limbo y trasplante de membrana amniótica. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2005 Jul; 80(7):405-412.
18. Bains KK, Fukuoka H, Hammond GM, Sotozono C, Quantock AJ. Recovering vision in corneal epithelial stem cell deficient eyes. *Cont Lens Anterior Eye.* 2019 Aug;42(4):350-358. doi: 10.1016/j.clae.2019.04.006.