



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL PLEXO NERVIOSO

Presentado por: Alba Caballero Santana

Tutelado por: Pilar Cañadas Suárez

Tipo de TFG: Revisión

En Valladolid a 24 de Mayo, 2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
1.INTRODUCCIÓN	4
1.1 Córnea.....	4
1.2 Inervación corneal	5
1.3 Importancia de la inervación corneal	6
1.4 Evaluación del plexo nervioso.....	6
1.5 Parámetros del plexo nervioso.....	7
1.6 Importancia de los métodos de análisis.....	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
2.1 Material necesario.....	11
3. RESULTADOS.....	12
3.1 Artículo: Reconocimiento automático de las estructuras nerviosas corneales en imágenes de microscopía confocal.....	12
3.2 Artículo: Cuantificación y segmentación de los nervios corneales y parámetros morfológicos para la detección temprana de la neuropatía diabética.....	13
3.3 Artículo: Análisis automático de la neuropatía diabética periférica utilizando la morfología multiescala de fibras nerviosas corneales en imágenes de microscopía confocal.....	14
3.4 Artículo: Evaluación automática de la tortuosidad del nervio corneal en imágenes in vivo de microscopía confocal.....	15
3.5 Artículo: Repetibilidad de imágenes de la córnea con microscopía confocal para cuantificar la morfología del nervio corneal.....	16
3.6 Artículo: Base estandarizada de densidad del plexo nervioso corneal humano para investigaciones clínicas con microscopia confocal laser in vivo..	17
3.7 Artículo: Diagnóstico y cuantificación del plexo nervioso subbasal en voluntarios sanos y pacientes diabéticos con o sin retinopatía.....	18
3.8 Artículo: Análisis morfométrico automatizado, semiautomatizado y manual del plexo nervioso subbasal corneal en individuos con y sin diabetes.	18
3.9 Artículo: Técnica rápida y eficiente para el rastreo automático de nervios corneales en microscopía confocal.....	19
3.10 Artículo: Un sistema de segmentación del nervio totalmente automatizado y análisis de parámetros morfométrico para el diagnóstico precoz de la neuropatía diabética a partir de imágenes corneales.....	20
3.11 Artículo: Cuantificación de la tortuosidad del plexo nervioso subbasal de la córnea mediante una escala multidimensional.....	21
3.12 Artículo: Análisis del plexo nervioso subbasal de la córnea mediante el uso de un nuevo software.....	22
4. DISCUSIÓN.....	23
5.CONCLUSIONES	25
6.BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

Justificación y objetivos: El análisis del plexo nervioso corneal tiene gran importancia clínica debido a la afectación que sus parámetros tienen en diferentes patologías o procesos refractivos. Por lo tanto, el objetivo del estudio es el análisis de los diferentes métodos para analizar el plexo nervioso para determinar el proceso más eficaz tanto en el rastreo de nervios como en la rapidez del procesamiento.

Material y métodos: Se realizó el análisis de 12 artículos relacionados con el rastreo de nervios del plexo nervioso, realizando una búsqueda sistemática en fuentes bibliográficas tanto en libros como bases de datos. La búsqueda se realizó en español y en inglés para la obtención de los artículos más actuales y relacionados con el trabajo.

Resultados: Se analizó de forma individual cada artículo, realizando un resumen y determinado los métodos utilizado en cada artículo, así como los parámetros analizados.

Conclusiones: Se comprobó la importancia del análisis del plexo nervios debido a su relación con la alteración de sus parámetros producidos por diferentes patologías y procesos refractivos. Siendo el método automático el más eficaz tanto en determinación de parámetros como en el tiempo de procesamiento, pudiendo incluirse como parámetro en la clínica diaria.

Palabras clave: plexo nervioso subbasal corneal, microscopía confocal corneal y parámetros del plexo nervioso.

ABSTRACT

Purpose: Corneal nerve plexus analysis has great clinical value due to the affectation of its parameters in the different pathologies or refractive processes. The purpose of the study is the analysis of the different methods to analyze the corneal nerve plexus available to determine the most effective method in nerve tracking and in the speed of processing.

Material and methods: 12 articles related to nerve tracking of the nerve plexus were reviewed, conducting a systematic search in bibliographic sources as books and databases. The search was conducted in Spanish and English to find the most current articles.

Results: Each article was analyzed individually, doing a summary and determined the methods used, as well as the parameters analyzed.

Conclusion: It was verified the importance of the analysis of the nervous plexus due to its relation with the alteration of its parameters produced by different pathologies and refractive processes. Being the automatic method the most effective, being able to be included as a parameter in the daily clinic.

Keywords: subbasal nerve plexus, confocal microscopy and nerve plexus parameters.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÓRNEA

La córnea está formada por diferentes capas que contribuyen al mantenimiento de su transparencia, pero esta organización se modifica periféricamente en la región del limbo.¹

Histológicamente, la córnea se puede dividir en cinco capas, desde la parte externa a la interna.

- **Epitelio:** es una capa estratificada escamosa no queratinizada que constituye el 10 % del grosor total de la córnea, formada por 5 o 6 capas de células que aumenta a 8-10 en su zona periférica. Es una capa que se renueva continuamente a lo largo de la vida gracias a la población de células madre del limbo esclerocorneal. Su capa más superficial presenta microvellosidades.^{1,3,4}

El epitelio está compuesto por tres estratos celulares:

- o Las células basales: son células cilíndricas con un núcleo redondeado u oval y paredes sinuosas que se adhieren firmemente entre ellas y con la membrana basal epitelial mediante hemidesmosomas y tonofibrillas.
- o Células aladas: forman 3 o 4 capas de células aladas, con un núcleo ovalado uniéndose mediante uniones tipo desmosoma y tipo GAP.
- o Células superficiales: son células escamosas planas superpuestas en las que desaparecen los núcleos y presenta prolongaciones digitales en la superficie para el mantenimiento de la película lagrimal.

La adherencia a la membrana basal mediante los hemidesmosomas restringe el paso de líquido a través de esta capa. Las uniones de las diferentes células se consiguen mediante uniones estrechas, uniones adherentes y uniones GAP (permiten el paso de iones y pequeñas moléculas solubles en agua).⁴

- **Membrana de Bowman:** es una capa fibrilar sin componente celular que está íntimamente relacionada con las capas superficiales del estroma, lo que imposibilita su separación. El margen anterior limita con la membrana basal del epitelio mientras que el margen posterior está formado por fibras de colágeno entremezcladas aleatoriamente con el estroma. Microscópicamente se puede observar que son fibrina de colágeno delgado y corto.^{1,2,3}

- **Estroma:** construye un 90% del espesor total de la córnea, con un grosor aproximado de 500 micras. Es una capa formada por fibras colágenas, células del estroma y la matriz extracelular. Las fibras de colágeno se disponen en haces paralelos entre si formando una malla paralela a la superficie corneal (figura 1). La malla se forma por láminas entreteljadas se cruzan entre sí en ángulo recto de forma regular formando lamelas en red, de forma que cada lamina recorre el largo de la córnea. La matriz extracelular está



Figura 1. Disposición de las fibras de colágeno del estroma corneal. Extraído de Villa C, Santodomingo J. La córnea. Parte I. Estructura, función y anatomía microscópica. Gaceta óptica; 2010.Pag 454

compuesta por colágeno y proteoglicanos (glicoproteínas) que mantienen las uniones entre las fibras de colágeno. Las células del estroma son los queratocitos, tienen forma aplanada y con un gran número de prolongaciones que se entrelazan entre sí mediante uniones tipo GAP. El estroma se distribuye en el 80% del peso de seco de la córnea son fibras de colágeno, el 15 % es sustancia fundamental y las células son el 5%.^{1,2,3,4}

- **Membrana de Descemet:** es una lámina basal con un grosor entre 2 y 20 micras segregada por el endotelio, cubre la porción posterior del estroma y anterior del endotelio. Está compuesta por fibras de colágeno con un entretendido sencillo. La línea de Schwalbe, es una acumulación de fibras de colágeno circulares que marca la terminación de la membrana de Descemet a nivel de ángulo iridocorneal.^{1,2,3,4}
- **Endotelio:** es una capa única de células escamosas de unas 5 micras de espesor con límites intercelulares sinuosos. Las células endoteliales tienen forma hexagonal con un área aproximada de 18 micras, son de origen mesodérmico y no tiene capacidad mitótica demostrada, por lo que existe una disminución gradual de su número con el paso del tiempo y las células vecinas rellenan el espacio modificando su tamaño (polimegatismo) y su forma (pleomorfismo). Las células endoteliales presentan algunas uniones entre ellas, siendo diferente que las epiteliales.^{1,3,4} (Figura 2)

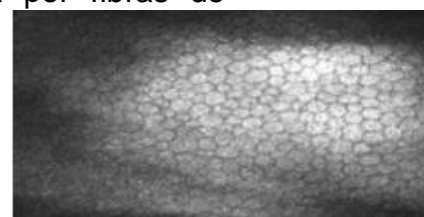


Figura 2: Células endoteliales forma hexagonal. Extraído de Batawi H, Shalabi N, Joag M, Koru-Senguk T, Rodríguez J, Green P, Campingotto M, Karp C, Galor A. Sub-basal cornea nerve plexus análisis using a new software technology. En; Eye and Contact lens; 2017 ;0;0; Pag:1-7

Mediante el epitelio, la cara anterior de la córnea está en contacto con la película lagrimal, mientras que la cara posterior, el endotelio, está en contacto con el humor acuoso de la cámara anterior.²

1.2 INERVACION CORNEAL

La córnea está inervada con nervios sensitivos, estos derivan de los nervios ciliares, que son las ramas terminales de la división oftálmica del trigémino (5º par craneal). Desde el ganglio trigémino, viajan por el nervio nasociliar y sus ramas nerviosas ciliares hasta la ramificación de las fibras nerviosas que penetran en la córnea.⁵

Los nervios se distribuyen en la córnea por el estroma medio y anterior, llegando al centro de la córnea de forma radial. Los filamentos nerviosos no pierden su vaina de mielina hasta que han atravesado al menos 1 mm o más de la córnea, a medida que avanzan hacia la córnea, los nervios se dividen y atraviesan la membrana de Bowman, formando un plexo nervioso debajo del epitelio, quedando las terminaciones nerviosas libres distribuidas por las células epiteliales.⁴ (Figura 3)

Estas terminaciones nerviosas crean amplias zonas de recepción para cada axón sensorial que se superponen unos

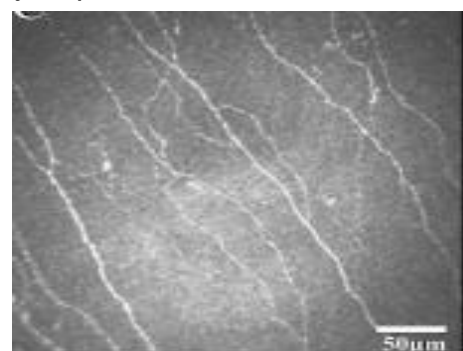


Figura 3: Plexo nervioso en un paciente normal. Extraído de Yang AY, Chow J y Liu J. Corneal Innervation and Sensation; The Eye and Beyond. En Yale Journal of Biology and Medicine. 2018; 91. Pag 13- 21

a otros produciendo un alto nivel de sensibilidad a los estímulos externos con baja localización del estímulo^{4,5}

Debido a esta inervación, la córnea se convierte en uno de los tejidos más sensibles del cuerpo. La concentración de las terminaciones de la córnea es entre 300 y 600 veces mayor que en la piel, y localizados en los dos tercios centrales. Debido a la concentración tan alta de receptores, cuando se produce la lesión en una sola célula epitelial provocaría una percepción dolorosa.⁴ La importancia de esta sensibilidad tiene como finalidad su protección.

En la córnea existen 3 tipos de receptores nerviosos y esto permite a la córnea percibir estímulos térmicos, mecánicos y químicos.

- Receptores nociceptores: son mecanorreceptores que responden a estímulos mecánicos, que transmiten el dolor agudo como respuesta a un contacto mecánico con la superficie de la córnea a través de nervios mielinizados tipo A δ
- Receptores polimodales: son nociceptores que responde a un dolor agudo y mantenido en respuesta a estímulos químicos como la acetilcolina, prostaglandinas, además de responder al aumento de la temperatura, mediante nervios mielinizados tipo C
- Receptores de temperatura: son nociceptores que responde a la disminución de la temperatura, es decir, son receptores de frío, siendo nervios mielinizados tipo A δ y C.⁵

Estas terminaciones, cuando sufren algún daño, se pueden regenerar, pero el problema radica en que cuando se regeneran, no tiene la misma sensibilidad específica que antes de la lesión.⁴

1.3 IMPORTANCIA DE LA INERVACION CORNEAL

La función principal de la inervación de la córnea es protegerla ante las amenazas y los estímulos externos para que se produzca una respuesta de la película lagrimal y activar el reflejo de parpadeo y así evitar que las amenazas externas puedan entrar en el ojo. De este modo se mantiene una superficie ocular estable para permitir una buena visión y con el mantenimiento de una buena calidad lagrimal se evitan síntomas de ojo seco.⁵

Los nervios corneales también liberan sustancias tróficas como neuropéptidos, neurotróficas y factores de crecimiento que son muy importantes para una correcta proliferación del epitelio corneal, mantener la integridad del epitelio y permitir una correcta cicatrización de la córnea. La disminución o pérdida de la inervación sensorial de la córnea pueden producir patologías como la queratitis neurotrófica que conlleva una pérdida de visión.⁵

Por todo esto, es importante conocer y determinar el estado de los nervios corneales, ya que, en los diferentes procedimientos quirúrgicos, posibles traumatismos o enfermedades oculares, estos nervios pueden resultar dañados y, por lo tanto, la córnea perdería su sensibilidad y podría no advertir de manera adecuada de complicaciones oculares.⁵

1.4 EVALUACIÓN DEL PLEXO NERVIOSO

En algunos estudios realizados en pacientes con ortoqueratología se observa que en los primeros meses del tratamiento podremos encontrar una disminución de la sensibilidad corneal, que con su uso se estabiliza. Además, se

puede observar una disminución de la densidad de nervios, sin producir cambio en la sensibilidad de la córnea, pero también encontramos cambios en la tortuosidad de los nervios tanto en la córnea central como en la zona periférica, sin una recuperación rápida después de la retirada del tratamiento con ortoqueratología.^{6, 17}

En ciertas enfermedades como la diabetes, se observa una disminución del número de fibras y un aumento de la tortuosidad con la disminución de la densidad de los nervios y las ramificaciones en función de la gravedad de la enfermedad.

Por otro lado, tras una cirugía LASIK se produce una disminución del número de terminaciones nerviosas del plexo nervioso sin recuperar la cantidad de nervios que se tenía antes de la intervención.⁸ Igualmente, después de un trasplante de córnea se observa que las fibras son más cortas y con mayor tortuosidad y en pacientes con queratocono o con síndrome de Sjögren o síndrome de pseudoexfoliación presentan mayor tortuosidad incluso en pacientes con artritis reumatoide porque el número de fibras nerviosas está disminuido.²⁰

Al evaluar la córnea central y periférica se observa que la densidad y la sensibilidad corneal es mayor en la zona central que en la periferia. Pero se encontró menor sensibilidad en la periferia superior y se cree que es debido a una adaptación neuronal a la presión continua a la que se ve sometida la córnea por el parpado superior.⁸

En la actualidad se usa la microscopia confocal para la exploración del plexo nervioso porque nos permite obtener imágenes in vivo y es una técnica no invasiva, permitiendo conocer que el nervio está formado por fibras nerviosas con cuentas tortuosas y delgadas, con una reflectividad homogénea diferente del fondo.⁹ Además como el plexo nervioso subbasal se dispone paralelo a la superficie de la córnea, entre la membrana de Bowman y el epitelio basal, nos permite obtener imágenes reproducibles y cuantificar diferentes parámetros.⁸

1.5 PARÁMETROS DEL PLEXO NERVIOSO

El microscopio confocal in vivo permite obtener imágenes de forma rápida, reiterativa y no invasiva in vivo de las fibras nerviosas corneales. En estas imágenes podemos observar el plexo nervioso, su engrosamiento, la reducción de la densidad del nervio, un aumento de su tortuosidad del nervio y de sus ramificaciones.

Para poder medir los diferentes parámetros del plexo nervioso, se necesitan conseguir imágenes correctamente enfocadas y con un buen contraste entre el nervio y el fondo de la imagen, además de ser imágenes con buena resolución, para poder obtener medidas fiables.

En el plexo nervioso se pueden analizar diferentes parámetros a partir de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal:^{10,11}

- La densidad nerviosa: se define como el total de nervios visible en un área determinada, expresándose mm^2 . Pero otros estudios solo incluyen nervios mayores de $50\mu\text{m}$ o solo se analiza el total de nervios en un determinado corte y en función de cómo se realice el análisis, el número y la longitud de los nervios puede cambiar. La densidad se considera el parámetro del cual se puede obtener más información en el análisis cualitativo del plexo nervioso, siendo el parámetro más estandarizado. La densidad total estándar de los nervios de la córnea es de 19mm^2 , con una desviación estándar de $4\text{-}5\text{mm}^2$.^{12,21,25}
- La anchura: consiste en determinar la distancia desde una pared del nervio a otra pared del nervio, midiéndose en μm .
- Orientación: se determina la orientación de las fibras nerviosas debido a que existen ciertas enfermedades en las que se puede encontrar cambio en la orientación. En ciertas enfermedades encontramos la ruptura de los nervios y variación en su orientación, lo que dificultara su análisis. El valor normal de la orientación de los nervios es 93.6° con una desviación de 28.5° . (Figura 4)¹⁰
- La longitud: se expresa en mm/mm^2 o micras/ mm^2 , mostrando la media de los valores obtenidos.¹⁰
- Número de células de Langerhan: las células Langerhan son células que presentan antígenos, las cuales aumentan las reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Son células que se encuentran en epitelios poli estratificados planos, además de encontrarse en tejidos linfáticos (como el timo), ganglios linfáticos y el bazo. En la córnea se encuentran en el epitelio. Estas células extendiendo los procesos detriticos formando una red celular denominada sistema retículo-epitelial (Figura 5). Las células de Langerhans pueden moverse a los tejidos subyacentes porque tiene una red de microfilamentos y un sistema de microtúbulos, además de tener la capacidad de realizar movimientos pseudopódicos y las prolongaciones de sus dendritas se pueden retraer y extender. Es importante cuantificar la presencia de estas células en el epitelio corneal debido a que el epitelio actúa como revestimiento externo del globo ocular ya que tapiza cavidades relacionadas con el exterior, protegiendo la superficie ocular de factores externos.¹¹

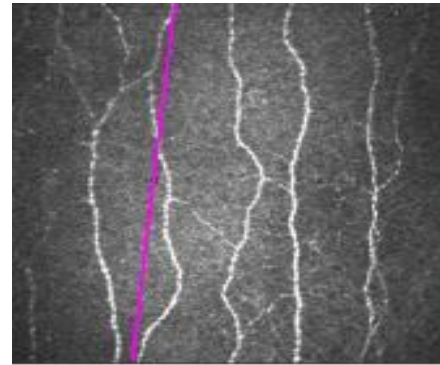


Figura 4: Orientación y longitud de nervios sub-basales. Extraído de Nombela-Palomo M, Felipe-Marquez G, Hernandez-Verdejo JL, Nieto-Bona A. Short-term Effects of Overnight Orthokeratology on Corneal Subbasal Nerve Plexus Morphology and Corneal Sensitivity. En Eye and Contact Lents.2016;0;0; Pag 1-7

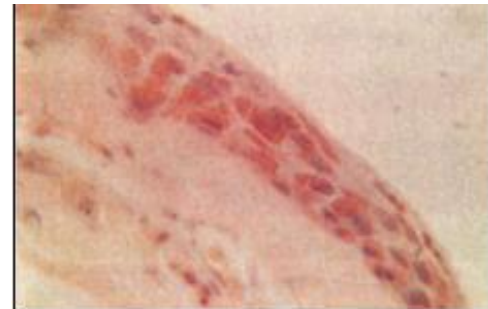


Figura 5: Células de Langerhan en epitelio. Extraído de Sedano E, Victorio J, NieraC, Rojas C. Demostración Inmunohistológica de las Células de Langerhans en la Córnea Humana. En Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1997. Vol.58, N°3

El recuento de las células Langerhans se realiza de forma manual en cada imagen utilizando el método diseñado por Nieto-Bona et al¹⁰ para realiza el recuento de células del epitelio. Los valores normales dependen de la región de la córnea que se observe, encontrando un promedio de 214 células/mm² en la periferia y 31 células/mm² en la zona paracentral.^{10,25} (Figura 6)

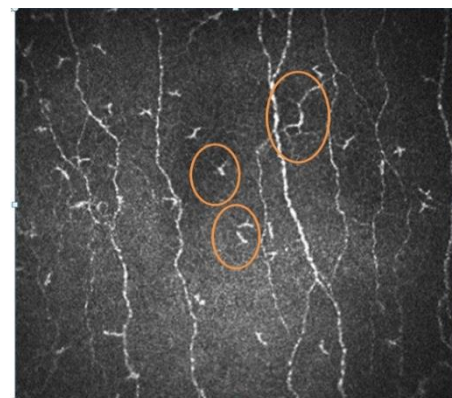


Figura 6: Células de Langerhans.
Fuente: Pilar Cañadas

- El número de fibras nerviosas: se entiende como la suma de todos los troncos nerviosos que se puedan calcular manualmente en la imagen. En muchas imágenes se pueden encontrar uniones nerviosas cortas y perpendiculares denominadas anastomosis y ramas nerviosas que no se consideran fibras nerviosas completas y no se incluyen en los estudios.¹³
- La reflectividad del nervio: también se puede nombrar como el número de arrosamiento, entendiéndose como el número de puntos hiperreflectivos. Estos puntos deben estar bien definidos, mostrándose a ambos lados de la fibra nerviosa, calculándose manualmente a una distancia de 100µm de una fibra. Los valores normales de reflectividad en una córnea normal son: 0.75 unidades de gris con una variación de 0.02-0.03.^{13,6,10}
- La tortuosidad de la fibra: se define estudiando la frecuencia y la amplitud de los cambios de dirección que sufre la fibra nerviosa. Se puede medir la tortuosidad cuantitativamente mediante el cálculo en múltiples escalas espaciales, permitiendo obtener información más precisa. La tortuosidad se suele medir en las líneas centrales de la fibra. Los valores normales de la tortuosidad son 1.55 con una desviación estándar de 0.89. (Figura 7)^{13,22}. También existe otra escala de clasificación de la tortuosidad en función de la frecuencia y la amplitud del cambio de dirección, determinado 5 grados, donde el 0 indica que el nervio es recto sin tortuosidad y el 4 indica un nervio con la máxima tortuosidad.³¹
- Patrón de ramificación: es el mayor número de ramificaciones que podemos encontrar prolongados a partir de una fibra nerviosa.¹³
- El volumen de los nervios: permite observar de forma tridimensional las estructuras de la córnea, y por tanto de los nervios permitiendo discriminar y evaluar las características morfológicas. El inconveniente es que la cuantificación de los nervios es complicada porque el campo de visión es limitado y el tiempo de exploración de forma adecuada es largo, por lo que es uno de los parámetros que menos práctico.²¹

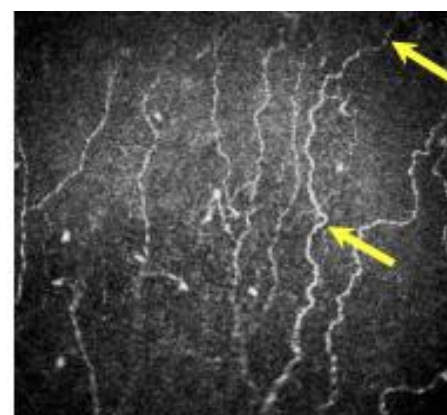


Figura 7: Tortuosidad de los nervios. Extraído de Neira C, Montalvo C, Sedano E. Demostración histoquímica de las células de Langerhans en córnea humana. En: Alma Mater, 1994;8; paa:89-96

El análisis del plexo nervioso se realiza de forma cuantitativa, pero se debe tener cuidado por la variación de la profundidad de campo. Debemos tener

en cuenta con qué microscopio confocal se ha medido y calcular su profundidad de campo para poder comparar estos parámetros con otros publicados.¹²

1.6 IMPORTANCIA DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

Actualmente ha crecido el interés en el análisis de los nervios del plexo nervioso de la córnea, debido su importancia a la correlación de la alteración de los nervios con diferentes enfermedades oculares o alteraciones secundarias a intervenciones quirúrgicas. A partir de la microscopia confocal corneal (CCM) se obtiene imágenes con suficiente calidad y resolución para poder observar los nervios y sus ramificaciones, pero se necesita la existencia de un sistema para poder analizar de forma cualitativa de estos nervios.¹⁴

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes sistemas para el análisis de los nervios, pero todos ellos tienen el inconveniente de que el tiempo que se necesita para analizar las imágenes es largo y la ejecución de los procesos se debe realizar de forma manual o de forma semiautomática. El análisis de forma manual de las imágenes obtenidas es un proceso tedioso, lento y que requiere una experiencia por parte de examinador para poder señalar de forma adecuada los nervios y no confundirlos con otros elementos o partes que no pertenecen a la capa subbasal, que también pueden observarse en las imágenes. Además la información clínica que podemos extraer es subjetiva, siendo un proceso propenso a errores.^{14,15,16,17}

También se han desarrollado sistemas de análisis automático que son capaces de extraer con fiabilidad el recorrido del nervio, su diseño y además pueden cuantificar sus características geométricas como la longitud, densidad, tortuosidad, etc... Los primeros métodos automáticos que se desarrollaron eran capaces de identificar un nervio recto, pero cuando los nervios tengan forma curva o en su longitud tenían algún cambio brusco de dirección, se tenía que hacer un procesamiento a mayores. El inconveniente de este procesamiento adicional es que generaba ruido, que hace que a la hora de analizar los nervios se detecte otras estructuras produciendo un análisis erróneo con falsos nervios. Estos inconvenientes desembocaron en un nuevo algoritmo que permitía una extracción fiable de los nervios y la medida de los parámetros morfométricos.^{14,16,17}

Estos métodos, realizan de manera automática el análisis, pero siguen teniendo el inconveniente de necesitar tiempo para su ejecución, además de que solo pueden hacer el análisis de imágenes individuales sin poder analizar los mosaicos que nos permite obtener imágenes de gran superficie de la córnea, debido a que estas imágenes que son de mayor tamaño y por tanto es alta la dificultad para analizarlo de forma computarizada.^{14,15}

Por todo lo expuesto el objetivo de este trabajo de fin de grado es hacer una revisión de todos los métodos de análisis del plexo nervioso y estudiando los parámetros que se analizan y los métodos de análisis empleados.

2. MATERIAL Y MÉTODO

Para realizar la revisión de los diferentes métodos de análisis del plexo nervioso, se empezó realizando un índice donde se organizaban los conceptos importantes que se explicarían de forma detallada posteriormente, además de poder estructurar el trabajo dándole un orden determinado.

La obtención de información se realizó mediante una búsqueda sistemática en diferentes fuentes bibliográficas, como libros relacionados con las diferentes estructuras corneales, bases de datos, donde se encontraron artículos científicos y artículos en revistas reconocidas. Las bases de datos empleadas fueron PubMed y Google Académico.

Para encontrar los artículos, se utilizaron palabras clave como plexo nervioso subbasal, plexo nervioso corneal y epitelial, microscopia confocal corneal, reconocimiento automático, semiautomático y manual de nervios corneales, parámetros del plexo nervioso. De esta forma encontramos 12 artículos. Para la búsqueda de información relacionada con la córnea, se emplearon palabras como anatomía, biomecánica y estructura de la córnea y encontramos 10 artículos y 2 referencias en libros.

El idioma inicial en el que se realizó la búsqueda fue en español e inglés obteniendo artículos más actuales y relacionados con el trabajo. La selección de artículos relacionados con el análisis del plexo nervioso se limitó en años desde el 2003 hasta el 2018, empleando los resultados más actuales para evitar obtener información obsoleta. Sin embargo, para la obtención de información sobre la anatomía de la córnea se han utilizado artículos o libros desde 1991 hasta 2018.

3. RESULTADOS

En todos los métodos para analizar el plexo nervioso, ya sea de forma manual, semiautomática o automática, una vez identificados los nervios se introduce en un sistema la que sean analizados según diferentes logaritmos. Pero las actuaciones de estos logaritmos se pueden ver afectadas por la información que se obtenga de otras capas que se pueden confundir con segmentos del nervio, por lo que es importante tener una buena calidad de la imagen.^{16,19}

Se han realizado diferentes estudios en el análisis del plexo nervioso, analizando los diferentes parámetros con el objetivo de poder incluir la valoración del plexo nervioso como parte de la rutina en la clínica diaria para detectar las diferentes patologías y/o hacer seguimiento tras distintas técnicas quirúrgicas que afectan a la córnea. Por ello, se van a analizar los diferentes estudios para poder relacionar sus características, con el fin de que en futuros estudios se pueda crear un método que resuelva los defectos o errores de los métodos existentes.

3.1 ARTÍCULO 1: RECONCOMIENDO AUTOMÁTICO DE LAS ESTRUCTURAS NERVIOSAS CORNEALES EN IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL (2008)¹⁶

En este artículo se describe un método automático para el análisis del nervio, obteniendo información de la densidad, longitud, tortuosidad...

Para el estudio utilizan 90 imágenes de microscopía confocal del epitelio sub-basal corneal de pacientes sanos y con determinadas patologías (ojo seco, síndrome de Sjögren, queratocono o queratitis). El tiempo de recogida de la imagen es de 20-60 segundos. Se utilizan diferentes filtros para normalizar el contraste y la luminosidad para diferenciar los nervios del fondo de la imagen. Para rastrear los nervios se utiliza un algoritmo que analiza la imagen por columnas y filas equidistantes para determinar un punto del nervio, a partir del cual se detecta la dirección del nervio, después se rastrea de forma transversal para determinar otros nervios analizando cada píxel y poder clasificarlos como nervio o como fondo de la imagen. Por último, se determina el final del nervio mediante secuencias de terminación, hay ocasiones en las que divide un nervio en dos o más segmentos porque el algoritmo ha determinado una secuencia de terminación, pero las características (dirección, anchura...) de los segmentos son similares por ello el algoritmo decide entender los dos segmentos próximos como un único nervio.

Para determinar si las conexiones entre dos segmentos son correctas se utiliza un análisis más específico, en el que se dibuja 5 arcos entre los extremos de cada segmento, simulando una posible conexión, de esos 5 arcos, el que tiene mayor intensidad se selecciona como

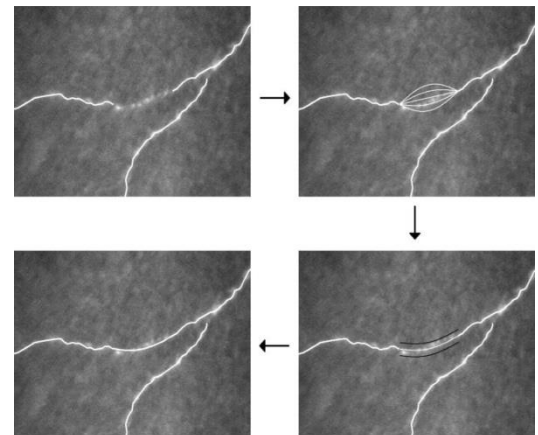


Figura 8: Detección del nervio. Estraído de Scarpa F, Grisan E, Ruggeri A. Automatic Recognition of Corneal Nerve Structures in Images from Confocal Microscopy. En: Investigative Ophthalmology and Visual Science. Noviembre 2008.; 49; 11; Pag:4801-48017

conexión. Después, se dibujan dos arcos a ambos lados de la conexión como métodos de control y se analiza la intensidad, si la intensidad entre los arcos de control y la conexión es mayor que un umbral determinado, se considera como buena la conexión de ambos segmentos. (Figura 8) También se aplicó un filtro Gabor (es un algoritmo de Gauss basado en una onda senoidal con una determinada orientación y frecuencia espacial para determinar las diferentes texturas y clasificarlas) sobre la imagen para poder visualizar con mayor facilidad los nervios mejorando el contraste obteniendo mejores resultados, por lo que en el estudio se emplearon ambas técnicas.

En este estudio realizan una comparación del análisis realizado automáticamente con el algoritmo y de forma manual. Analizan los siguientes parámetros: la longitud del nervio y el porcentaje de longitudes. En la longitud de los nervios se encontraron resultados muy parecidos, por ello se analizó el porcentaje de longitudes (tasa de la longitud de los nervios auténticos) realizado tanto en grupo las 90 imágenes como por separado, observándose un 80% de nervios detectados correctamente pero un 7% se detectaron erróneamente en las imágenes analizadas automáticamente, pero el resultado mejoró en la imagen ROI ((Region Of Interest) selección de imágenes que pertenecían únicamente al plexo). Para comparar el método automático y el manual se recurrió a la técnica Bland-Altman, obteniendo una compatibilidad del 95%.

Cuando se estudió la longitud de los nervios se observó que el análisis automático realiza una subestimación sobre el análisis manual. También, se analizó el tiempo del proceso, tardando en rastrear los nervios aproximadamente 1 minuto por cada imagen.

Como conclusión, este estudio presenta un algoritmo automático que tiene la ventaja de que disminuye la proporción de nervios erróneos, siendo comparable al manual en un 95%, teniendo un tiempo de procesado de cada imagen de un 1 minuto, por lo que permitiría utilizar el análisis del plexo nervioso clínicamente para detectar diferentes patologías.

3.2 ARTÍCULO 2: CUANTIFICACIÓN Y SEGMENTACIÓN DE LOS NERVIOS CORNEAL Y PARÁMETROS MORFOLÓGICOS PARA LA DETECCIÓN TEMPRANA DE LA NEUROPATÍA DIABÉTICA (2010)¹⁷

En este estudio se analizan imágenes obtenidas por microscopia confocal de pacientes diabéticos y no diabéticos, determinando aquellos pacientes con neuropatía diabética periférica.

Antes de analizar la imagen, se hace un preprocesamiento para disminuir la uniformidad del contraste de la imagen y poder identificar estructuras que verdaderamente sean nervios, para ello se emplearon filtros en las imágenes originales. La identificación de los nervios se realizó observando el histograma de la imagen, en el cual se aplicó un umbral dinámico de mayor intensidad para que como mínimo el 10% de los píxeles analizados queden por encima del umbral, de este modo se evita detectar falsos nervios. Para reconstruir los nervios se utiliza el punto de inicio de los nervios detectados y se relacionan mediante la aproximación de los mismos por dos métodos: se analizan los píxeles que se encuentran a una distancia del 5% entre los bordes y los píxeles que estén a una distancia del 35% del borde de la imagen.

Los parámetros que se analizan son: la longitud del nervio y el coeficiente de tortuosidad (TC) que se determina entendiendo cada nervio como una función matemática a lo largo de la imagen, siendo analizados primero los nervios principales y después los secundarios. Para entender el nervio como una función matemática se trazó una línea recta entre los puntos finales de los nervios y se rotó la imagen de forma que quede alineada la línea recta con el eje X.

Se analizan 15 imágenes comparando la longitud del nervio reconocido de forma automática y manual en la misma imagen, determinado un 87% de los nervios de forma correcta, sin falsos positivos (estructuras identificadas como nervio, pero no corresponden con nervios reales). Cuando se compara la longitud del nervio se observó una diferencia de 127, 77 y 51,7 μm entre las medidas realizadas por el algoritmo y las realizadas de forma manual. Es posible calcular la especificidad y sensibilidad del algoritmo mediante el reconocimiento de verdaderos negativos (un píxel se clasifica de igual forma el método manual y automático) y positivos. Los falsos negativos (un píxel se clasifica como nervio solo por el método manual) y los falsos positivos (un píxel se clasifica como nervios solo por el método automático). La sensibilidad se determina por la cantidad de verdaderos positivos y la especificidad se determina por la proporción de verdaderos negativos.

La conclusión de este estudio es que el método automático tiene una especificidad del 99,6%, esto indica que determinó de forma correcta la tortuosidad obteniendo valores parecidos a estudios anteriores, pero el inconveniente es que el tiempo de procesamiento era alto (aproximadamente de 3 minutos) para poder realizarlo en la clínica diaria, pero era útil para poder diagnosticar de forma precoz una neuropatía diabética periférica.

3.3 ARTÍCULO 3: ANÁLISIS AUTOMÁTICO DE LA NEUROPATÍA DIABÉTICA PERIFÉRICA UTILIZANDO LA MORFOLOGÍA MULTIESCALA DE FIBRAS NERVIOSAS CORNEALES EN IMÁGENES DE MICROSCOPIA CONFOCAL (2011)¹⁵

En este estudio se analizan imágenes de pacientes con diabetes que tenían neuropatía diabética periférica para determinar la afectación de la enfermedad en el plexo nervioso.

En este estudio se presenta un método de análisis automático basado en un modelo simple y doble realizado sobre varias escalas para generar un vector de ciertas características extraído de cada píxel de las imágenes de microscopía confocal. Mediante el análisis del modelo doble o dual obtenemos imágenes en las que una fibra nerviosa se corresponde con cada píxel. Cuando las fibras están bien definidas aparecen como estructuras conectadas siendo estructuras semi-lineales, mientras que las estructuras que no son nervios se presentan en fragmentos mal definidos, identificando fácilmente los nervios corneales.

Para el estudio se analizan 521 imágenes de microscopía confocal, del centro de la córnea para poder reconocer las fibras nerviosas y se clasificaron según el grado de la neuropatía. Para determinar cada fibra nerviosa se selecciona un punto y se analiza a partir de este punto, comparando las características para identificarlo como un verdadero nervio, esto se realiza con un solo nervio y luego se extrapola al resto de la imagen. La cuantificación de

los nervios se realiza en función de los positivos y los falsos negativos. Se comparó el análisis manual y automático observando que para detectar fibras nerviosas se obtenían resultados similares, pero al evaluar en las diferentes clasificaciones de la neuropatía se encontraron mejores resultados con el método automático que con el manual.

El modelo automático usando el método multiescala de doble modelo ha obtenido mejores resultados que los análisis manuales. También se comprobó que el método se podría aplicar en la clínica con el fin de realizar diagnósticos, encontrado buenos resultados. Incluso se observó que se podría llegar a clasificar la patología en función de su severidad. Sin embargo, el método resultó ser ineficaz para evaluar el daño de fibras de pequeño tamaño. La ventaja de este método es la disminución de tiempo de procesamiento, obteniendo resultados más fiables ya que no depende de la destreza del analizador.

3.4 ARTÍCULO 4: EVALUACIÓN AUTOMÁTICA DE LA TORTUOSIDAD DEL NERVI CORNEAL EN IMÁGENES IN VIVO DE MICROSCOPIA CONFOCAL (2011)²⁰

En este estudio se centran en evaluar la tortuosidad debido a una íntima relación entre las variaciones en la tortuosidad y la severidad de ciertas enfermedades como la neuropatía diabética, o tras una la cirugía refractiva con la aparición de fibras nerviosas más tortuosas y cortas que en pacientes sanos. Por ello, en este estudio se describe un algoritmo que puede analizar los nervios corneales de forma automática y se diseña una graduación de la tortuosidad de los nervios que permite clasificar el estado de los nervios.

En el estudio se utilizaron 30 imágenes obtenidas por mediante el microscopio confocal, de participantes sanos y pacientes con alguna patología como diabetes, síndrome de pseudoexfoliación y queratocono cuyos nervios tenían diferentes grados de tortuosidad. Para detectar los nervios se empleó un algoritmo que analizaba los segmentos del nervio y los representaba en forma de un conjunto de coordenadas de píxeles. Para determinar el coeficiente de tortuosidad, se elaboraron una serie de ecuaciones teniendo en cuenta el segmento del nervio, la longitud de la curva, y la curvatura, siendo la integral del valor de curvatura una medida de la variabilidad de la dirección del nervio.

Para medir la tortuosidad, el algoritmo tiene en cuenta la primera y la segunda diferencia en las coordenadas del segmento, trazando una línea entre los puntos finales del segmento, además de girar la línea para que se alinee con el eje x y entendiendo este segmento como una función matemática con la primera derivada (diferencia entre los puntos consecutivos del nervio dividido por la distancia entre la proyección sobre el eje x de dos puntos consecutivos) y la segunda derivada(diferencia entre los dos valores consecutivos de la primera derivada). Cuando el nervio sufre un cambio de dirección o signo de la curva, (curva de giro), mayor es la tortuosidad, y para definirlo se tiene que realizar una partición del segmento nervioso con sus diferentes curvas de giro y como la tortuosidad se mide en micrómetros, se puede entender como una densidad de tortuosidad. Para comparar la tortuosidad de las diferentes imágenes se reanaliza un promedio con la medida de cada segmento. Con el análisis automático, el rastreo de nervios tiende a sobreestimar cuando tienen una alta

tortuosidad o a infraestimar cuando la tortuosidad es baja, para evitarlo se clasifican en función de un umbral determinado.

Cuando se compararan los datos obtenidos de forma manual y automática, en la forma manual se clasificaron las imágenes según su tortuosidad en baja, media o alta por un experto mientras que la forma automática se computerizaba con el algoritmo propuesto. Se encontró que el método automático realizaba un mínimo de errores de clasificación.

Para clasificar el grado de la tortuosidad, se diseñó un nuevo criterio que se basa en sumar la curva de giro de cada uno de los segmentos del nervio. El método automático realiza la clasificación con menor error, mejor separación entre clases, aunque puede haber ocasiones en las que la fibra nerviosa sea de longitud insuficiente para determinar de forma adecuada la tortuosidad, debido a que parte del nervio quede fuera de la imagen o porque la profundidad de campo del instrumento es estrecha o las propias características del paciente. También se analizó la sensibilidad siendo alta o baja en función de si el paciente tenía o no alguna patología y la repetibilidad de la prueba, concluyendo que es una medida que se tendría que mejorar.

3.5 ARTÍCULO 5: REPETIBILIDAD DE IMÁGENES DE LA CÓRNEA DE MICROSCOPIA CONFOCAL PARA CUANTIFICAR LA MORFOLOGÍA DEL NERVI CORNEAL (2013)²⁹

En el estudio analizan los parámetros de la densidad (NFD), la longitud (NFL) del nervio, el TC y la densidad de cada rama del nervio (NBD) con el fin de poder diagnosticar enfermedades de forma precoz, teniendo en cuenta un criterio aceptado internacionalmente.

En el estudio se seleccionaron 380 imágenes al azar de participantes sanos obteniendo 2 imágenes de cada participante. Las imágenes fueron analizadas por dos expertos, de forma que un experto tenía conocimientos de análisis del nervio del plexo y el otro no. Se seleccionó la imagen en función del contraste, profundidad, enfoque de la imagen, y se seleccionaron de forma manual mediante el software CCMetrics. Cada parámetro se identifica por colores: la densidad del nervio se marca en color rojo, la densidad de cada rama en las diferentes uniones de cada segmento se identifica en verde, las ramificaciones se identifican en color azul y la longitud es la suma de los nervios destacados en rojo y azul. (Figura 9) También se calcula el coeficiente intraclase (ICC) para determinar la repetibilidad entre los métodos analizados y los diferentes expertos. En el análisis por ambos expertos, se observaron diferencias únicamente en el parámetro de NBD.

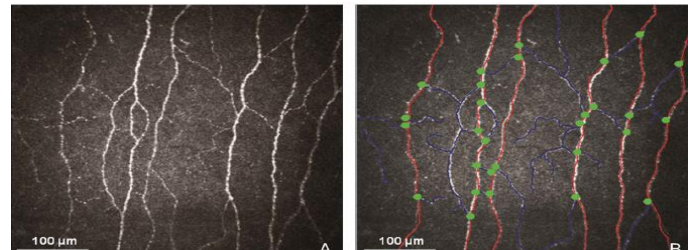


Figura 9: imagen original e imagen analizada por el software CCMetrics. Extraída de Petropoulos I, Manzoor T, Morgan, Fadavi H, Asghar O, Alam U, Ponirakis G, Dabbah M, Chen X, Graham J, Tavaki M, Malik R. Repeatability Corneal Microscopy to Quantify Corneal Nerve Morphology. En: Cornea; 2013; 32;5; Pag: 83-89

Teniendo en cuenta que el objetivo del estudio era determinar la repetibilidad de los parámetros con imágenes IVCCM, se concluye que de los

parámetros analizados, la longitud y la densidad del nervio, son los parámetros con mayor repetibilidad y con valores más fiables, pero la longitud únicamente se detectaba correctamente en pacientes con patología. El NBD y el TC fueron los parámetros menos reproducibles y supusieron mayor dificultad, observando que la tortuosidad se analizaba mejor cuando seguía un patrón simple con forma de árbol o de X con múltiples ramas.

3.6 ARTÍCULO 6: BASE ESTANDARIZADA DE DENSIDAD DEL PLEXO NERVIOSO CORNEAL HUMANO PARA INVESTIGACIONES CLÍNICAS CON MICROSCOPIA CONFOCAL LÁSER IN VIVO. (2013)²⁵

Este estudio se centra en el análisis de la densidad del plexo nervioso, determinando cuál es el mejor criterio de selección y análisis de las imágenes y buscando la relación de densidad en función de la edad, sexo y el ojo analizado.

En el estudio, participaron 106 personas sanas agrupadas en 4 grupos según la edad. Para la obtención de las imágenes, se utilizó la microscopía confocal ajustando la profundidad axial de forma manual para conseguir un área más amplia de la córnea central y el volumen de forma automática en un único campo de visión. Esto conlleva un tiempo de procesamiento lento en un área grande. Se determinó un criterio de selección de la imagen, siendo de gran importancia la calidad de la imagen. En análisis lo realizaron por 2 observadores diferentes a los que tomaron la imagen. El rastreo de los nervios se realizó de forma manual y automática, en la forma manual se utilizó el software ImagenJ sobre imágenes sin tratar (no se ajustó el brillo ni el contraste), determinado como nervio cuando como mínimo el 75% del nervio era visible, sino se excluía y la longitud del nervio se determinó en milímetros con el software NeuronJ. El análisis automático utilizó imágenes tratadas previamente (normalizado el contraste y la luminosidad) aplicando un logaritmo de rastreo basado en punto de inicio del nervio y un filtrado para reducir los falsos positivos con un tiempo de procesamiento de 2.5 minutos, además se determinó la longitud del nervio con el software NeuronJ en las coordenadas de vértice y se usó una interpolación bilineal para obtener los valores según los puntos de inicio.

Al comparar los resultados entre ambos observadores, se encontró una diferencia de $0.085\text{mm}/\text{mm}^2$ de densidad, además se encontró una densidad diferente con el método manual y automático de $0.071\text{mm}/\text{mm}^2$. Estas diferencias se deben a la longitud del nervio, el contraste. La densidad total era diferente en el método manual, siendo aproximadamente de $18.8\text{mm}/\text{mm}^2$ (ojo derecho) y de $19.2\text{mm}/\text{mm}^2$ (ojo izquierdo) y el método automático de $18.6\text{mm}/\text{mm}^2$ (ojo derecho) y $19.2\text{mm}/\text{mm}^2$ (ojo izquierdo).

En este estudio se determinó que la longitud del ojo humano es de $19\text{mm}/\text{mm}^2$, sin encontrar diferencias en función del sexo, pero sí en función de la edad, puesto que se observó que a medida que avanzaba la edad, la densidad nerviosa era menor. También se encontraron cambios después de intervenciones oculares o en ciertas patologías afectando tanto al ojo intervenido o enfermo como al sano. En las imágenes se analizaron áreas pequeñas, pero si se quiere utilizar este parámetro para la clínica se necesita un método que analiza áreas mayores en poco tiempo.

3.7 ARTÍCULO 7: DIAGNÓSTICO Y CUANTIFICACIÓN DEL PLEXO NERVIOSO SUBASAL EN VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES DIABÉTICOS CON O SIN RETINOPATÍA (2013)²⁷

El estudio se basa en determinar la relación entre retinopatía diabética y los cambios morfológicos del plexo nervioso subbasal. En el estudio participaron 18 pacientes diabéticos tipo II clasificándose según la presencia de retinopatía o no y 20 pacientes sanos. A todos los participantes se le realizó una estesiometría corneal para medir la sensibilidad corneal y se tomaron las imágenes de microscopia confocal con un escaneo automático a nivel de las células basales en la membrana de Browman y el estroma anterior.

El análisis de la imagen se realiza de forma automática con un software determinando la longitud, diámetro, densidad, continuidad y conectividad de los nervios. La conectividad se determina simulando que los nervios son caminos con nodos de cambios del ritmo. Las imágenes se analizaron morfológicamente y topográficamente segmentado las fibras en el eje medial.

La sensibilidad corneal era menor en pacientes con diabetes (43mm) que en pacientes sanos (59mm), además en pacientes con retinopatía se encontraron estructuras deterioradas y alteraciones de los nervios cuando padecían diabetes que cuando estaban sanos. En pacientes diabéticos se encontró menor densidad de ramas y fibras y una disminución progresiva en pacientes con retinopatía diabética. También se observó que en paciente diabéticos los nervios eran más tortuosos y con menor reflectividad, pero no se encontraron diferencias significativas entre paciente sin retinopatía y con la enfermedad.

Como conclusión, se encontró una alteración significativa en pacientes diabéticos del plexo nervioso independiente de la existencia de retinopatía diabética, pero si se ha demostrado que existe una relación entre la evolución de la diabetes y la presencia de retinopatía diabética, que se ha observado independientemente del control del nivel glucémico pudiendo desarrollar o no retinopatía.

3.8 ARTÍCULO 8: ANÁLISIS MORFOMÉTRICO AUTOMATIZADO, SEMIAUTOMATIZADO Y MANUAL DEL PLEXO NERVIOSO SUBASAL CORNEAL EN INDIVIDUOS CON Y SIN DIABETES (2014)¹⁸

En este estudio se comparan los resultados obtenidos mediante un método automático y dos métodos manuales y semiautomáticos. Se analizan 50 imágenes extraídas de forma aleatoria de una base de 314 participantes, 17 pacientes sanos y 33 pacientes con diabetes. Para la obtención de imágenes se empleó la microscopia confocal generando imágenes en 2 dimensiones de la zona central de la córnea. Solo se analizan 8 mediante el método manual, automático o semiautomático. El método manual se basa en el software CCMetrics, que rastrea todos los nervios visibles, analizando la densidad, longitud y tortuosidad del nervio, siendo la longitud del nervio el parámetro que se iba a comparar. El método semiautomático utiliza el software NeuronJ, el cual realizaba el trazado de nervios mediante la determinación del punto de inicio del nervio y el algoritmo rastreaba el camino óptimo del nervio para determinar la longitud del nervio y después de dividía por el área de la imagen analizada para

obtener la longitud del nervio en unidades de mm/mm². Mientras que el análisis automático, realizado con el software ACCMetrics, trazó los nervios de forma rápida en diferentes imágenes de 400x 400µm.

En cada uno de los métodos, se determinó el tiempo de duración del proceso y la variabilidad del análisis de la longitud del nervio. Se evaluó la repetibilidad de la prueba, el coeficiente de relación y la varianza para mostrar las diferencias de estos valores en los diferentes métodos.

Se encontraron valores similares en el parámetro de longitud del nervio con los tres métodos, con el método automático la longitud del nervio era de 17.4 mm/mm², con el método semiautomático era de 16.0 mm/mm² y con el método automático, la longitud era de 16.3 mm/mm². Los tres métodos están íntimamente relacionados, pero existe mayor relación ente el manual y el semiautomático. El tiempo del proceso fue mucho menor con el método automático (aproximadamente 13 segundos) que con el semiautomático (64 segundos) y el manual (96 segundos). También se observó, que independiente del método que se utilizase, la cantidad de nervios era menor en pacientes con la enfermedad que en paciente sanos.

Se anotaron más nervios con sistema manual que con el método automático debido a que el explorador humano es capaz de detectar un mayor número de nervios. También influye que en el reconocimiento automático se tuvo que aumentar el umbral para evitar los falsos positivos, por lo que el método automático tiende a subestimar los resultados. Se demostró una elevada repetibilidad entre el método semiautomático y el automático, y que el método automático presenta un tiempo de procesamiento menor. Pero también se encontraron desventajas como no detectar nervios delgados, que estén fuera de foco de la imagen o confundir nervios con otras estructuras como dendritas. Estos inconvenientes se pueden resolver realizando después del método automático una evaluación manual, pero esto disminuye su repetibilidad.

Por lo que el método automático era adecuado para analizar los nervios del plexo aportando velocidad, consistencia y objetividad.

3.9 ARTÍCULO 9: TECNICA RÁPIDA Y EFICIENTE PARA EL RASTREO AUTOMÁTICO DE NERVIOS CORNEALES EN MICROSCOPIA CONFOCAL (2016)¹⁴

En este artículo se estudian los métodos automáticos para analizar los nervios corneales de forma rápida y efectiva, mediante la obtención de imágenes de microscopia confocal. Obteniendo resultados incluso en imágenes grandes, para las que los métodos anteriores requerían un tiempo elevado de ejecución debido a la marcación del nervio punto a punto.

El método desarrolla un enfoque automático para rastrear los nervios mediante un trazado preciso, determinado parámetros clínicamente útiles. Para evaluar la efectividad del algoritmo propuesto se comparó tortuosidad y densidad del nervio obtenidos mediante el análisis automático y manual.

Se analizaron 246 imágenes del plexo nervioso de sujetos sanos por evaluadores de forma manual. Realizaron un rastreo de las líneas centrales en cada uno de los nervios visibles, mediante el sistema de rastreo NeuronJ. Para

evaluar la tortuosidad del nervio, se emplearon 30 imágenes de pacientes sanos y con patologías como queratocono, síndrome de pseudoexfoliación y diabetes. Para tener imágenes adecuadas se usaron filtros como el filtro Top-Hat (es un procedimiento morfológico basado en una serie de ecuaciones para resaltar los detalles claros sobre un fondo oscuro). para corregir la iluminación irregular, y el filtro Log-Gabor para mejorar el contraste de los nervios con el fondo. Para reconocer los nervios se emplea un umbral que considera la línea central de cada región umbral como un segmento del nervio y para determinar que ese segmento sea un nervio se utilizó un enfoque de máquinas de vectores de soporte (SVM), que analizan en función de dos características: morfológicas y basada en la intensidad. Las características morfológicas se relacionan con la forma y el tamaño del segmento del nervio, siendo la longitud y el área del nervio. Mientras que las características basadas en la intensidad se calculan usando filtros sobre las imágenes obtenidas con el microscopio confocal. Cuando se encuentran nervios desconectados de la base se conectan mediante brechas para determinar adecuadamente la tortuosidad, siendo necesario conocer la distancia, el ángulo y la intensidad desde un nervio a otro.

Se determinó la sensibilidad y la cantidad de falsos descubrimientos (FDR), permitiendo comparar el enfoque propuesto con el algoritmo de Scarpa et al.¹⁶ y el rastreo manual. Se encontró una sensibilidad menor y unos valores de FDR significativos respecto al rastreo manual, pero en nuestro enfoque, la sensibilidad y los FDR son mayores que con el algoritmo de Scarpa et al. Además, el enfoque propuesto necesitó menor tiempo de análisis que el algoritmo de Scarpa et al. (0.61 segundos frente a 145,56 segundos). También se determinó la densidad del nervio mediante el método propuesto y el método manual, obteniendo diferencias no significativas (el coeficiente de correlación entre ambos fue de 0.93). Respecto a la tortuosidad, cuando se comparó, se clasificaron correctamente el 92.3% de las imágenes analizadas.

Podemos decir que el análisis automático obtiene resultados similares a los resultados obtenidos con el análisis manual o semiautomático, debido a que es capaz de rastrear de forma correcta el 90% de los nervios corneales presentes en una imagen de microscopía confocal, Pero su ventaja principal es su capacidad de rastrear y analizar los nervios con la misma eficacia que un método manual, pero en menor tiempo.

3.10 ARTÍCULO 10: UN SISTEMA DE SEGMENTACIÓN DEL NERVIO TOTALMENTE AUTOMÁTICO Y ANÁLISIS DE PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA NEUROPATÍA DIABÉTICA A PARTIR DE IMÁGENES CORNEALES (2016)³⁰

En este estudio se crea un método de análisis del plexo nervioso para poder detectar la neuropatía diabética de forma precoz. El proceso de segmentación del nervio se basa en un primer procesamiento para mejorar la visibilidad de los nervios, después eliminar las estructuras que no sean nervios y finalmente se detectan los bordes de cada nervio.

Se analizaron 919 imágenes, en las que 445 pertenecían a sujetos control, 350 pertenecían a sujeto diabéticos sin neuropatía y 124 eran imágenes de pacientes con neuropatía. La determinación de los bordes se realiza con el filtro Gauss mediante un algoritmo con umbral determinado y las ramificaciones se unen al nervio colocando un punto en cada segmento final, si están próximos se traza una línea recta que conecta la ramificación con el nervio principal. (Figura 10)

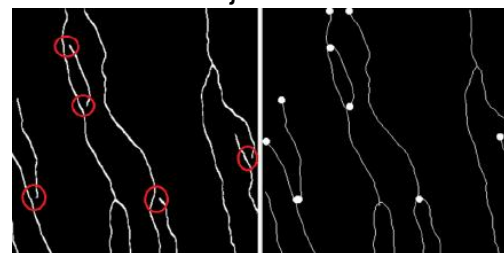


Figura 10: Conexión de segmentos del nervio. Extraído de Al-Fahdawi S, Qahwayi R, Al-Waisy A, Ipson S, Malik R, Brahma A y Xin C. a fully automatic nerves segmentation and morphometric parameters quantification system for early diagnosis of. En Computer methods and programs in biomedicine; 2016;135; pag: 151–166

Los parámetros que se analizan fueron: la longitud que se calcula sumando la distancia entre los pixeles consecutivos del mismo segmento, la densidad se calcula dividiendo los pixeles que corresponden a un nervio entre el área, el coeficiente de tortuosidad calculada a partir de longitud del nervio y el grosor del nervio que es la distancia entre los extremos en horizontal de los nervios. Para comprobar el rendimiento del método se analizó el índice de similitud estructural que comprara la calidad de la imagen, el índice de Rand que calcula el número de pares de pixeles, la variación de la información que mide la distancia entre segmentos realizado de forma manual y automática y el error global siendo un refinamiento de la imagen, de modo que estos 4 parámetros comparan la imagen real con la segmentada.

Los resultados concluyen en la efectividad del método de rastreo para la conexión de nervios de forma automática a tiempo real con un tiempo de análisis de 7 segundos.

3.11 ARTICULO 11: CUANTIFICACIÓN DE LA TORTUOSIDAD DEL PLEXO NERVIOSO SUBSAL DE LA CÓRNEA MEDIANTE UNA ESCALA MULTIDIMENSIONAL (2016)²⁴

En este estudio se analiza la tortuosidad del plexo nervioso debido su íntima relación con la evaluación de ciertas patologías. Para su media existían diferentes métodos, pero tenían limitaciones: usar una sola escala, no diferenciar entre frecuencias altas y bajas, solo se basan en un coeficiente (como la curvatura), no determinan el nivel de confianza. Por ello, en este estudio se utiliza un análisis multi-escala con un algoritmo de aprendizaje automático, mostrando los resultados en un plano de tortuosidad (TP) de 2 dimensiones.

Se incluyeron en el estudio 140 imágenes adquiridas con el microscopio confocal, tanto de pacientes sanos como con enfermedades (ojo seco, y queratitis por herpes simple). Las imágenes se analizaron por 3 expertos y se rastrearon con el software NeuronJ. El objetivo es calcular la tortuosidad con multi-escalas, asignar las medidas en 4 niveles de tortuosidad en un plano y mostrar el nivel de confianza. El análisis con multi-escala se basa en la medida de la curvatura máxima, los puntos de reflexión y los índices de tortuosidad de informes anteriores calculadas para 6 frecuencias espaciales partiendo de la medida de la curva y puntos de reflexión, con un algoritmo diseñado para medir su densidad, a partir de la fibra original y se suaviza su forma eliminando las altas frecuencias.

Para determinar el nivel de tortuosidad se emplea una estrategia de envoltura que se basa en un regresor ordinal logístico multinomial analizando la probabilidad de una imagen con una tortuosidad mayor y menor para crear 4 niveles de tortuosidad. El plano de tortuosidad de consigue con las 2 medidas mejores de tortuosidad y presenta los 4 niveles mostrando los límites de tortuosidad determinados por los expertos.

Con este plano se clasifica la tortuosidad en 4 niveles, siendo una clasificación visual y se mostró el nivel de confianza a partir de la probabilidad de pertenecer a alguno de los 4 niveles. Como se realiza automáticamente se consigue un nivel de rendimiento mejor, pero tiene limitaciones como el uso de fibras rastreadas manualmente. Al compararlo con un método automático, analizan cada imagen como un todo y se pierde la contribución individual de cada fibra. Por otro lado, el volumen de análisis es bajo, 2-3 fibras por análisis.

3.12 ARTICULO 12: ANÁLISIS DEL PLEXO NERVIOSO SUBBASAL DE LA CÓRNEA MEDIANTE EL USO DE UN NUEVO SOFTWARE (2017)²⁸

En este estudio se desarrolla un método de análisis semiautomático y se analizan la reproductibilidad de los resultados del software y la fiabilidad del método, para ello se analizaron parámetros como la densidad, el número de fibras, su longitud, ramificaciones y la tortuosidad. Se obtuvieron 350 imágenes mediante microscopía confocal en tres exploraciones y se seleccionaron aquellas que tenían buen contraste y estaban bien enfocadas. El software rastrea de forma automática los nervios, después se revisa con el método manual, determinando aquellas fibras que el método automático no haya podido detectar, siendo más o menos parecidos en función de la calidad de imagen y el ambos procesos, manual y automático, se realizaron en un tiempo de 3.5 minutos por imagen.

Para evaluar el software se analizaron dos imágenes, una por el software y la otra manualmente de una misma persona. También se evaluó su repetibilidad mediante el uso de 2 observadores, encontrándose una repetibilidad del método del 80%. Para la evaluación de los parámetros, se relacionaron unos con otros, excepto la densidad que solo se relacionó con el número de ramificaciones. Se observó que, en los participantes de mayor edad, todos los parámetros estaban disminuidos, en especial la longitud y la densidad del nervio, pero no se encontraron cambios en función del sexo o la raza. También se observó una disminución de la longitud, la densidad y alteración de la densidad en participantes con diabetes mellitus tipo II, siendo mayor la afectación cuanto más avanzada estaba la enfermedad.

Por lo tanto, en este estudio se ha desarrollado software capaz de trazar y analizar los nervios del plexo nervioso con una buena repetibilidad en el análisis de la longitud del nervio y un proceso rápido. Además, se desarrolla un sistema semiautomático para determinar la morfología del nervio al comparar con resultado ya existentes, siendo repetibles en el tiempo. Pero el estudio tiene ciertas limitaciones como el tamaño de la muestra para poder corroborar los resultados, se recomienda repetir el estudio con una muestra de mayor tamaño.

4. DISCUSIÓN

Los diferentes artículos relacionados con el estudio del plexo nervioso analizan diferentes parámetros como la densidad, la longitud y la tortuosidad de los nervios observados.^{14,16,17,20,25,24,28,29,30} La tortuosidad es uno de los parámetros más analizados debido a su afectación en distintas patologías^{14,16,17,18,20,24,28,29,30}. Pero también en otros estudios^{17,20,27,28,29,30} se analizan otros parámetros como el diámetro medio, el número de bifurcaciones, la sensibilidad corneal y la continuidad, siendo parámetros de menor relación clínica pero que aportan información relevante para el estudio del plexo nervioso. Por otro lado, en algunos estudios^{24,28} se analiza el nivel de confianza y la repetibilidad del rastreo de nervios y la determinación de los parámetros, realizado tanto por un método automático como por un método manual.

La importancia clínica de analizar estos parámetros se pone de manifiesto ya que se han visto cambios en algunas patologías como la neuropatía diabética^{14,15,17,18,20,27,28,30}, síndrome de ojo seco, queratitis por herpes simples²⁴, queratocono o el síndrome de pseudoexfoliación^{14,20}. En estas patologías se puede observar una disminución de la densidad de nerviosa, disminución del número de ramificaciones y un aumento de la tortuosidad dependiendo del estado de evolución de la enfermedad. También encontramos cambios tras diversos procedimientos refractivos como el LASIK²⁰ en los que se observa una disminución no solo de la densidad nerviosa sino también de la longitud de los nervios con cambios en la tortuosidad.

Los diferentes artículos estudiados se caracterizan por aplicar a las imágenes obtenidas con microscopía confocal diferentes filtros como el filtro Gabor,^{16,14} el filtro Top Hat,¹⁴ o establecer un umbral determinado¹⁷ para normalizar el contraste y la luminosidad de la imagen. Con estos filtros se elimina el ruido que puede confundir los nervios con las diferentes estructuras que hay en la imagen.

La mayoría de los estudios^{15,16,17,20,24,25,27} se basan en comparar el método manual con el método automático en el rastreo de los nervios, y así determinar sus parámetros con más facilidad y rapidez. Con el método manual, el automático y semiautomático se rastrean los nervios mediante algoritmos. En el método manual se usan el algoritmo CCMetrics^{18,29} o el ImagenJ²⁵ y en el método automático el algoritmo ACCMetrics¹⁸ que identificaban los nervios a partir de la selección de un punto de inicio y secuencias de terminación y para la unificación de segmentos pertenecientes al mismo nervio se basaban en sus características. En algunos estudios se realiza el rastreo mediante un modelo de multiescala^{15,24} de forma automática clasificando la tortuosidad en 4 niveles determinando la curvatura máxima, los puntos de reflexión y los índices de tortuosidad para 6 frecuencias espaciales, permitiendo mostrar los resultados en un plano de tortuosidad. En algunos artículos se realiza un análisis semiautomático mediante un algoritmo de segmentación^{14,18,28} (JAVA o NeuronJ) en los que se realiza primero un análisis automático y después un análisis manual para determinar los nervios no detectados por el método automático, siendo poco útil debido al alto tiempo de procesamiento.

De forma general, el análisis automático tiene mayor utilidad clínica, puesto que, como muestran varios estudios,^{15,16,17,20,24,25,27} el tiempo de procesamiento, tanto para el rastreo de los nervios como el análisis de los

parámetros determinados es menor que con el método manual, o semiautomático.^{14,18,28}

Por otro lado, el método automático tiene una menor proporción de detección de nervios erróneos, mayor sensibilidad y repetibilidad^{14,15,16,17,25,28,29} Pero también algún estudio^{16,18,24} muestra que el método automático puede subestimar el número de nervios respecto al manual. Aun encontrando estas limitaciones, se obtienen resultados similares en varios parámetros como la densidad y la longitud.^{14,16,17,18,20,25,28,30}

5. CONCLUSIONES

Después revisar los diferentes artículos relacionados con el análisis del plexo nervioso, se puede comprobar la importancia de analizar el plexo nervioso debido a su íntima relación con la evolución y seguimiento de diferentes patologías o procesos de cirugía.

Se ha llegado a la conclusión de que el método de análisis más apropiado es el método automático debido a su rapidez, sencillez y eficacia mediante la obtención de imágenes por microscopía confocal.

Por lo tanto, el análisis del plexo nervioso podría ser de gran utilidad en la clínica diaria para la detección de enfermedades, el seguimiento de las mismas y su tratamiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso S., Collado JA, Gómez A. Córnea. En: Oftalmología II. Cantabria: Servicio de publicaciones universidad de Cantabria;1991; Pag 87-99
2. Herrenan R, Gómez A. Córnea Oftalmología. México: Interamericana-McGraw-Hill; 1993; Pag:144-171
3. Lavado L. Córnea. En: Universidad Nacional de San Marcos (Lima), Facultad de Medicina, Escuela Académico Profesional de Medicina Humana, Departamento - Académico de Cirugía; Cirugía: IV oftalmología. Lima: UNMSM, 2000; Pag 319
4. Villa C, Santodomingo J. La córnea. Parte I. Estructura, función y anatomía microscópica. En:Gaceta óptica; 2010.Pag 454
5. Yang AY, Chow J y Liu J. Corneal Innervation and Sensation; The Eye and Beyond. En Yale Journal of Biology and Medicine. 2018; 91.Pag 13- 21
6. Nombela-Palomo M, Felipe-Marquez G, Teus MA, Hernandez-Verdejo JL, Nieto-Bona A. Long-Term Impacts of Orthokeratology Treatment on Sub Basal Nerve Plexus and Corneal Sensitivity Responses and Their Reversibility. En: Eye and Contact Lents. 2017;0;Pag 1-6
7. Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Corneal Nerve Tortuosity in Diabetic Patients with Neuropathy. En: Juvenile Diabetes Research Foundation International Grant and National Eye Institute Grand. 2003; Pag 418-422
8. Patel, DV, Tavakoli M, Craig JP, Efron N, McGhee C. Corneal Sensitivity and Slit Scanning In Vivo Confocal Microscopy of the Subbasal Nerve Plexus of the Normal Central and Peripheral Human Cornea. En: Lippincott Williams and Wilkins, Cornea. 2009; 28; Pag 735-740
9. De Cilla S, Ranno S, Carini E, Fogagnolo P, Ceresara G, Orzalesi N, Rossetti LM. Corneal Subbasal Nerve Changes in Patients with Diabetic Retinopathy: An In Vivo Confocal Study. En: Investigative Ophthalmology and Visual Science. Noviembre 2009; 50; Pag 5155-5158
10. Nombela-Palomo M, Felipe-Marquez G, Hernandez-Verdejo JL, Nieto-Bona A. Short-term Effects of Overnight Orthokeratology on Corneal Subbasal Nerve Plexus Morphology and Corneal Sensitivity. En Eye and Contact Lents.2016;0;0; Pag 1-7
11. Sedano E, Victorio J, Niera C, Rojas C. Demostración Inmunohistológica de las Células de Langerhans en la Córnea Humana. En Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.1997. Vol.58, N^o3
12. Rojas E, González J, Pérez A. Plexo Nervioso Subbasal y su Relación con la Magnitud de la Ametrópia en Cirugía Refractiva con Laser Excimer. En Revista Cubana de Oftalmología:
13. Ponce Torres Y, Mokey Castellanos MO, Yang T, Espinosa Gómez A. Estudio del Plexo Nervioso Subbasal Epitelial en Pacientes Diabéticos mediante Microscopia Confocal Corneal. En Hospital Clínico Quirúrgico " Hermanos Ameijeiras", La Habana, Cuba.
14. Guimaraes P,Wilgadahl, Ruggeri A. A Fast and Efficient Technique for the Automatic Tracing of Corneal Nerves in Confocal Microscopy. En: Translational Vision Science and Technology.2016;5;5;article 7,Pag:1-9
15. Dabbah, M A, Graham J, Petropoulos I N, Tavakoli M, Malik R A. Automatic Analysis of Diabetic Peripheral Neuropathy Using Multi-Scale Quantitative Morphology Of nerve Fibres in Corneal Confocal Microscopy Imaging. En: Medical Image Analysis.2011. Pag738-747
16. Scarpa F, Grisan E, Ruggeri A. Automatic Recognition of Corneal Nerve Structures in Images from Confocal Microscopy. En: Investigative Ophthalmology and Visual Science. Noviembre 2008.; 49; 11 ;Pag:4801-48017
17. Ferreira A, Morgado A M; Silvestre Silva, J. Corneal Nerve Segmentation and Morphometric Parameters Quantification for Early Detection of Diabetic Neuropathy. En: Institute of Biomedical Research in Light and Image, Faculty of Medicine, University of Coimbra,Portugal. 2010;29; Pag :264-467
18. Dehghani C,Pritchard N, Edwards K, Russel A W, Malik R A, Efron N. Fully Automated, Semiautomated, and Manual Morphometric Analysis Of Corneal Subbasal Nerve Plexus in Individuals With and Without Diabetes. En; Lippincott Williams and Wilkins. 2014; 33;7; Pag:696-702

19. De Silva M E H, Zhang A C, Karahalios A, Rose Chinnery A, Downie L. Laser Scanning In Vivo Confocal Microscopy (IVCM) for Evaluating Human Corneal Sub-basal Nerve Plexus Parameters: Protocol for a Systematic Review. En *BMJ Open*. 2017; pag 1-8
20. Scarpa F, Zheng X, Ohasbi Y, Ruggeri A. Automatic Evaluation of Corneal Nerve Tortuosity Images from In Vivo Confocal Microscopy. En *Investigye Ophthalmology and Visual Science*. August 2011;22;9; Pag:6404-6408
21. González J, Rojas E, Benítez. In vivo microscopic characteristics or the subbasal corneal nervous plexus in patients with keratoconus. En: *Revista cubana de oftalmología*. 2013;26;2
22. Neira C, Montalvo C, Sedano E. Demostración histoquímica de las células de Langerhans en córnea humana. En: *Alma Máter*, 1994;8; pag:89-96
23. Annunziata R, Kheirhah A, Aggarwal S, Cavalcanti B, Hamrah P, Trucco E. Two-Dimensional Plane for Multi-scale Quantification of Corneal Subbsal Nerve Tortuosity. En *Investigation Ophthalmology and Visual Science*, 2016; 57;1132-1139
24. Zhivovo A, Winter K, Hovakimyan M, Peschel S, Harder V, Schober H, Kundt G, Baltrush S, Guthoff R, Stachs O. Imaging and Quantification od subbsal nerve plexus in Healthy volunteers and diabetic patients with ot without retinopathy. En: *Plos One*, january 2013; 8; 1; 52157
25. Parissi M, Karanis G, Randjelovic S, Germundsson J, Poletti E, Ruggeri A, Utheim T, Lagili N. Standardized baseline human corneal subbasal nerve density for clinical investigations with laser-scanning in vivo confocal microscopy. En: *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2013; 54; Pag:7091-7102
26. Fernández A, Moreno F, Prósper F, García M, Echeveste J. regeneration of the ocular Surface: stem cells and reconstructive techniques. En: *An. Sistema Sanitario. Navarra*.2008 Vol.31.Nº 1, enero-abril.Pag:53-69
27. Castellanos M O, Pérez R, G, Martorell J, A. El banco de ojos y el donante idóneo. En *revista cubana oftalmología*. 2007. Vol. 20, Nº2
28. Batawi H, Shalabi N,Joag M, Koru-Senguk T, Rodríguez J,Green P, Campingotto M, Karp C, Galor A. Sub-basal cornea nerve plexus analysis using a new software technology. En; *Eye and Contac lens*;2017 ;0;0;Pag:1-7
29. Petropoulos I, Manzoor T.Morgan, Fadavi H, Asghar O, Alam U, Ponirakis G, Dabbah M, Chen X, Grahan J, Tavaki M, Malik R. Repeatability Corneal Microscopy to Quantifi Corneal Nerve Morphology. En: *Cornea*; 2013; 32;5; Pag: 83-89
30. Al-Fahdawi S, Qahwayi R, Al-Waisy A, Ipson S, Malik R, Brahma A y Xin C. a fully automatic nerves segmentation and morphometric parameters quantification system for early diagnosis of diabetic neuropathy. En *Computer methods and programs in biomedicine*; 2016;135; pag: 151–166
31. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves in soft contact lens wear. A comparative study using confocal microscopy. En: *Ophthal. Physiol. Opt*; 2003; 23;2; Pag 163-174