



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

Análisis del plexo nervioso corneal en el ojo
seco

Presentado por Blanca Gerbolés Andrés

Tutelado por: Marta Blanco Vázquez y Margarita Calonge Cano

Tipo de TFG: Investigación

En Valladolid, a 22 de mayo de 2020

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Hipótesis	7
1.2. Objetivos	7
2. MATERIAL Y MÉTODO	8
3. RESULTADOS	11
4. DISCUSIÓN	16
5. CONCLUSIONES.....	18
6. BIBLIOGRAFÍA.....	19
ANEXOS	21
Anexo I: Aprobación del Comité de Ética de la Investigación	21
Anexo II: Aprobación de la Comisión de Investigación del IOBA	22

RESUMEN

Introducción y objetivo

La enfermedad de ojo seco (EOS) es una patología multifactorial e inflamatoria de la superficie ocular que afecta a millones de personas. Existen numerosas técnicas para el diagnóstico de esta enfermedad, entre las que se encuentra la microscopía confocal *in vivo*. Esta técnica permite la exploración de las diferentes estructuras de la córnea de forma mínimamente invasiva, proporcionando información sobre el estado del plexo nervioso subbasal. El objetivo de este estudio es comparar el plexo nervioso subbasal entre sujetos con y sin la EOS, así como relacionar algunas de las variables analizadas en él.

Material y método

Se recogieron datos ya tomados anteriormente de sujetos con y sin la EOS. Así mismo, se analizaron 3 imágenes ya tomadas del plexo nervioso corneal mediante microscopía confocal *in vivo* de cada sujeto. Para el análisis de estas imágenes se empleó el programa ImageJ junto con el plugin NeuronJ. En cada imagen se evaluaron los siguientes parámetros: el número de nervios, de ramificaciones y de células dendríticas, la longitud media de los nervios, la densidad nerviosa, el grado de tortuosidad nerviosa y la presencia o ausencia de microneuromas. Posteriormente estos datos se analizaron estadísticamente mediante el programa SPSS.

Resultados

Se incluyeron 40 sujetos agrupados en dos grupos: 20 sujetos con la EOS y 20 sin la EOS. No se encontraron diferencias significativas en el plexo nervioso corneal entre los dos grupos de estudio. Sin embargo, se apreció un mayor número de células dendríticas en los sujetos con mayor grado de tinción conjuntival ($p=0,006$), así como en los sujetos con mayor número de años desde el diagnóstico de la EOS ($r=0,577$; $p=0,008$). Además, en los sujetos con la EOS se observó que aquellos con mayores grados de tortuosidad nerviosa tenían más sintomatología ocular ($p=0,01$), mayor número de nervios ($p<0,001$) y de ramificaciones ($p<0,001$), mayor densidad nerviosa ($p=0,05$) y menor longitud media de los nervios ($p=0,01$).

Conclusiones

El plexo nervioso corneal no difiere significativamente entre los sujetos con y sin la EOS. El número de células dendríticas aumenta en relación con los años desde el diagnóstico y con la tinción conjuntival. La tortuosidad del plexo nervioso parece estar relacionada con la sintomatología ocular, el número de nervios y ramificaciones, la densidad nerviosa y la longitud media de los nervios.

Palabras clave: enfermedad de ojo seco, microscopía confocal *in vivo*, córnea, plexo nervioso.

ABSTRACT

Introduction and objective

Dry eye disease is a multifactorial and inflammatory ocular surface pathology which affects millions of people. *In vivo* confocal microscopy is one of the numerous techniques used for the diagnosis of this disease. This technique is used to explore the corneal structures, such as the corneal subbasal nerve plexus, in a minimally invasive way. The objective of this study is to compare the parameters of the corneal subbasal nerve plexus between subjects with and without dry eye disease, as well as to relate some of the parameters analyzed in it.

Material and methods

Data that had been previously measured in subjects with and without dry eye disease was collected for this study. In addition, three images already taken of the corneal nerve plexus of each subject by *in vivo* confocal microscopy were analyzed. These images were analyzed with the ImageJ program and its NeuronJ plugin. The following parameters were analyzed in each image: the number of nerves, branches and dendritic cells, the average nerve length, the nerve density, the grade of nerve tortuosity and the presence or absence of microneuromas. These data were then analyzed statistically using the SPSS program.

Results

Forty subjects were included in two groups: 20 subjects with dry eye disease and 20 subjects without dry eye disease. No statistically significant differences were found in the corneal nerve plexus parameters between the two study groups. Nevertheless, a higher number of dendritic cells was observed in the subjects with a higher grade of conjunctival staining ($p=0.006$), as well as in the subjects with a higher number of years since the dry eye diagnosis ($r=0.577$; $p=0.008$). Moreover, in the subjects with dry eye it was found that those with greater grades of nerve tortuosity had more ocular symptoms ($p=0.01$), a higher number of nerves ($p<0.001$) and branches ($p<0.001$), greater nerve density ($p=0.050$) and a shorter average nerve length ($p=0.01$).

Conclusions

The corneal nerve plexus of patients with dry eye disease does not differ significantly from that of subjects without dry eye disease. The number of dendritic cells increases in relation to the conjunctival staining and to the years since the diagnosis of dry eye disease. The nerve tortuosity seems to be associated with ocular symptoms, the number of nerves and branches, nerve density and average nerve length.

Key words: dry eye disease, *in vivo* confocal microscopy, cornea, subbasal nerve plexus.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de ojo seco (EOS) es una patología multifactorial de la superficie ocular, que se caracteriza por una pérdida de la homeostasis de la película lagrimal y por ocasionar síntomas oculares como escozor, sensación de cuerpo extraño, picor, etc. La inestabilidad e hiperosmolaridad de la superficie ocular, la inflamación y daño de la superficie ocular, y las anomalías neurosensoriales desempeñan papeles etiológicos.^{1,2}

Se trata de una patología muy prevalente que afecta a millones de personas. Se estima que el 25% de las personas que acuden a una clínica oftalmológica presenta esta enfermedad.³ Cabe destacar que este porcentaje varía en función del país o de la raza y está firmemente asociado a factores como la edad, el sexo, la disfunción de las glándulas de Meibomio, el uso de lentes de contacto u ordenadores, el uso prolongado de ciertos fármacos (ansiolíticos, vasodilatadores, etc.)¹, la realización de cirugía refractiva LASIK, etc.² Sin embargo, hoy en día, aún hay factores que se desconocen en cuanto a la etiología de la EOS.

Como resultado de esta gran prevalencia, existen numerosas líneas de investigación cuyo fin es reducir el gran impacto económico asociado a esta patología, e intentar disminuir las consecuencias que ocasiona en algunos sujetos, tales como un deterioro de la calidad de vida o dolor ocular persistente.¹ Así mismo, es una enfermedad muy relevante, ya que cursa con gran diversidad de síntomas oculares que varían de un paciente a otro y que pueden llegar a limitarles la realización de sus actividades de la vida diaria. Sin embargo, estas molestias que refieren los sujetos no siempre correlacionan con los signos clínicos, por lo que en ocasiones el diagnóstico puede ser complicado. Es por lo que varias líneas de investigación se centran en desarrollar pruebas diagnósticas objetivas.⁴

Además, hay sujetos que manifiestan síntomas característicos de la EOS, pero a falta de signos clínicos se puede suponer que se encuentran en un estado preclínico o inicial o tratarse incluso de un dolor neuropático.² Así mismo, hay sujetos con signos específicos y con ausencia de síntomas, los cuales se asocian con una predisposición a la EOS o una sensibilidad corneal reducida.^{1,2}

La EOS se puede clasificar en dos grandes categorías según su etiología: hiposecretor y evaporativo. Sin embargo, estas categorías no se excluyen entre sí, pudiendo existir una superposición de ambas categorías.¹

La EOS de tipo hiposecretor es aquella en la que se produce una reducción de la secreción lagrimal en presencia de una tasa normal de evaporación lagrimal. Sin embargo, en la EOS de tipo evaporativo se produce una evaporación excesiva de la película lagrimal en presencia de una secreción lagrimal normal.² Conviene subrayar que en la actualidad la EOS de tipo evaporativo es la más prevalente de ambas y la causa asociada más frecuente suele ser la disfunción de las glándulas de Meibomio.⁵

Respecto al diagnóstico de esta patología, ante la sospecha de un paciente con la EOS, se evalúa su sintomatología ocular y se le realiza una batería de pruebas clínicas para explorar la superficie ocular.

Para la evaluación de los síntomas oculares, existen diferentes cuestionarios validados, siendo el *Ocular Surface Disease Index* (OSDI) y el *Dry Eye Questionnaire-5* (DEQ-5) los que la *Tear Film and Ocular Surface Society* (TFOS) recomienda para el diagnóstico de la EOS. El cuestionario OSDI tiene un total de 12 preguntas y se puede obtener en él una puntuación de 0 a 100. El cuestionario DEQ-5, versión reducida del *Dry Eye Questionnaire* (DEQ), consta de 5 preguntas y la puntuación obtenida va de 0 a 22.⁴ Para el diagnóstico de la EOS se toma como referencia una puntuación mayor o igual a 13 en el cuestionario OSDI, o mayor o igual a 6 en el DEQ-5.²

Respecto a la exploración de la superficie ocular, es de especial relevancia en esta patología evaluar la integridad de la superficie ocular con tinciones vitales, la estabilidad de la película lagrimal mediante el tiempo de ruptura lagrimal (BUT, del inglés *Break-Up Time*), o la producción de lágrima mediante el test de Schirmer, entre otras pruebas.⁴

En cuanto a la evaluación de la integridad de la superficie ocular mediante tinciones vitales, como son la fluoresceína o el verde de lisamina, estas se instilan en la superficie ocular y, tras 2 minutos, se observa con la lámpara de hendidura la presencia o ausencia de tinciones localizadas, tanto en la conjuntiva como en la córnea, las cuales indican un daño epitelial por esta patología.⁴

Para la medida del BUT, se instila fluoresceína y, mediante la lámpara de hendidura, se mide el tiempo que transcurre desde el último parpadeo y la ruptura de la película lagrimal (esta se observa como puntos o zonas negras). El criterio de corte para el diagnóstico de la EOS varía entre autores. Se suele considerar un valor menor de 7 o 10 segundos.^{4,6}

El test de Schirmer se realiza, con o sin anestesia, colocando una pequeña tira de papel milimetrada en la zona temporal del pliegue palpebral inferior durante 5 minutos con los ojos cerrados. Tras esto, se anota la cantidad de la tira de papel impregnada con la lágrima. Respecto al criterio de corte para el diagnóstico de la EOS, también existen discrepancias entre autores. En algunos casos se considera un valor menor o igual a 10 mm sin anestesia⁴ o menor o igual a 5 mm con anestesia⁷.

Otra prueba clínica de gran interés en los sujetos con la EOS es la microscopía confocal *in vivo* de la córnea. Es una técnica mínimamente invasiva que nos permite observar las diferentes capas de la córnea a nivel microscópico y a tiempo real.⁸ Entre ellas, el plexo nervioso subbasal, permitiéndonos conocer su estado, lo cual es de especial relevancia en determinadas condiciones oculares como son la queratitis infecciosa, la EOS o tras cirugía refractiva corneal.^{9,10,11} Así mismo, facilita la evaluación de la densidad celular y ofrece información sobre la inflamación, factor clave en la EOS. Bien es cierto que su aplicación principal está asociada a la investigación de patologías corneales y en la cicatrización tras cirugías. Sin embargo, la aplicación en la clínica es fundamental para definir el diagnóstico en casos de queratitis por hongos o por *Acanthamoeba*.¹²

La córnea es el tejido con mayor inervación del cuerpo humano, lo cual provoca una sensibilidad mucho mayor en esta zona. El plexo nervioso subbasal está compuesto por pequeñas terminaciones nerviosas procedentes de la rama oftálmica del nervio trigémino. El recorrido que realizan para alcanzar la zona subbasal de la córnea es: entrando por la periferia de la corneal, y tras

desprenderse de la mielina, llegan a la capa de Bowman y a partir de aquí constituyen el plexo nervioso subbasal corneal.¹³ A medida que los nervios van alcanzando las zonas más superficiales de la córnea, su anchura disminuye. Este plexo nervioso corneal juega un papel esencial en la proliferación, integridad y en la recuperación de posibles daños. Además, ofrece una función protectora a estructuras proximales tales como la capa de Bowman y el epitelio basal corneal.¹⁴

La evaluación del plexo nervioso subbasal corneal mediante microscopía confocal *in vivo* en sujetos con la EOS es cada vez más importante, ya que puede ser una buena herramienta para evaluar objetivamente esta enfermedad y para una mejor comprensión de su fisiopatología. Por ello, en este trabajo nos planteamos evaluar el plexo nervioso subbasal y sus posibles alteraciones en los sujetos con la EOS.

1.1. Hipótesis

Existen diferencias en los parámetros del plexo nervioso corneal entre los sujetos con y sin la EOS, así como relaciones entre algunos de estos.

1.2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

1. Evaluar si existen diferencias en el plexo nervioso corneal entre sujetos con y sin la EOS.
2. Determinar la relación entre la cantidad de células dendríticas y el resto de las variables.
3. Examinar la correlación entre los años desde el diagnóstico de la EOS y los parámetros del plexo nervioso corneal en los sujetos con la EOS.
4. Determinar la relación entre el grado de tortuosidad de los nervios y el resto de las variables en los sujetos con la EOS.

2. MATERIAL Y MÉTODO

Para el desarrollo de este Trabajo Fin de Grado se han recogido datos de un estudio retrospectivo de casos y controles que ya se había realizado previamente. Este trabajo ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Valladolid (Anexo I) y la Comisión de Investigación del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (Anexo II), y cumple con los principios de la declaración de Helsinki.

En este trabajo se han incluido 40 sujetos, excluyéndose a aquellos que presentaran cualquiera de los siguientes criterios de exclusión:

- Menos de 18 años.
- Estar embarazada o lactando.
- Enfermedad con afectación ocular diferente de la EOS en los últimos 3 meses antes del estudio.
- Cirugía realizada sobre la superficie ocular con fines refractivos o visuales.
- Cirugía ocular (sin fines refractivos o visuales) en los 6 meses antes de la visita del estudio.
- Oclusión de puntos lagrimales en los 3 meses antes de la visita del estudio.
- Con medicación que afecte a la cantidad de lágrima desde hace menos de 3 meses (respecto al día de la visita).
- Si ha usado corticoides, ciclosporina, o sustitutivos lagrimales el día del estudio.
- Si ha usado lentes de contacto la semana antes del estudio.

De estos 40 sujetos incluidos, la mitad presentaban la EOS. Se consideró que los sujetos presentaban la EOS si obtuvieron una puntuación en el cuestionario OSDI mayor o igual a 13, y al menos dos de estas pruebas en ambos ojos:

- BUT menor o igual a 7 segundos.
- Tinción corneal con fluoresceína (escala Oxford) mayor o igual a grado 1.
- Tinción conjuntival con verde de lisamina (escala Oxford) mayor o igual a grado 1.
- Test de Schirmer con anestesia menor o igual a 5 mm.

Los otros 20 sujetos que no cumplían con los criterios anteriores se consideraron sujetos sin la EOS.

Por tanto, para este trabajo se tomaron datos de la historia clínica, para comprobar que no presentaban los criterios de exclusión, y los datos de las pruebas clínicas mencionadas previamente. Además, se recogieron las imágenes de plexo nervioso corneal de estos sujetos, que ya habían sido tomadas con anterioridad con el microscopio confocal Heidelberg Retina

Tomograph 3 (Heidelberg Engineering, Alemania) y el módulo de córnea Rostock.

Para este trabajo, se seleccionó aleatoriamente el ojo de estudio de cada sujeto, así como tres imágenes del plexo nervioso corneal por cada ojo, siendo estas las de mejor calidad. Estas imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ junto con su *plugin* NeuronJ, el cual facilita el trazado de los nervios. Posteriormente, se realizó la media de las tres imágenes por sujeto. Las variables que se analizaron en cada imagen fueron:

- Número de nervios (Figura 1): se describe como el total de nervios presentes en cada imagen.
- Número de ramificaciones (Figura 1): se corresponde con el total de intersecciones que se producen entre los nervios.
- Número de células dendríticas (Figura 1): considerándose como estructuras brillantes, lo cual facilita su identificación, con cuerpo celular alargado junto con numerosas dendritas.¹⁵ Para una mejor visualización, previamente se modificó el brillo y contraste de la imagen.
- Longitud media de los nervios: media de la longitud de todos los nervios de la imagen. La unidad de medida es $\mu\text{m}/\text{mm}^2$.
- Densidad nerviosa: corresponde con la suma de la longitud de todos los nervios de la imagen. La unidad de medida es $\mu\text{m}/\text{mm}^2$.
- Grado de tortuosidad del plexo nervioso: se asigna un grado de tortuosidad de 0 a 4 según la escala de *Oliveira-Soto y Efron*, siendo 0 nada de tortuosidad y 4 mucha tortuosidad.¹⁶
- Presencia o ausencia de microneuromas: considerándose como pequeños engrosamientos en las fibras nerviosas relacionados con el daño corneal localizado.¹⁷

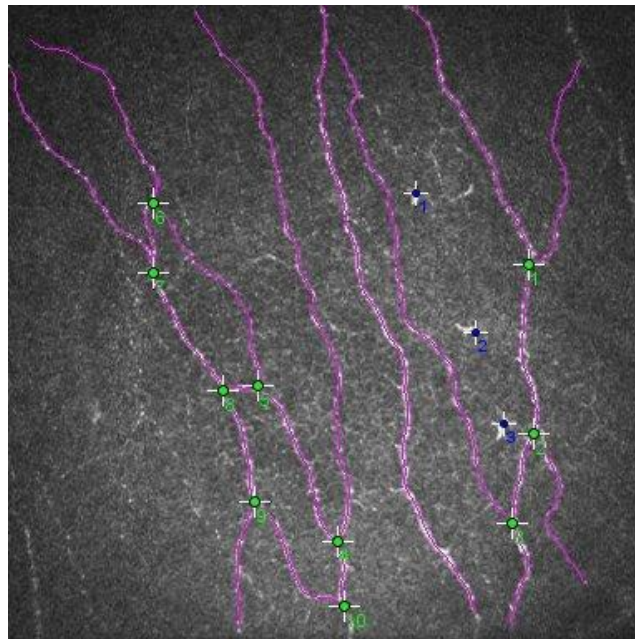


Figura 1. Imagen del plexo nervioso corneal analizada mediante ImageJ y su *plugin* NeuronJ. Se representan los nervios en morado, las ramificaciones en verde y las células dendríticas en azul. Imagen donada por el Instituto de Oftalmobiología Aplicada.

Posteriormente, se recogieron todos los datos obtenidos en una hoja de Excel para su posterior análisis estadístico con el programa SPSS (versión 24.0 para Windows). Para el análisis de las variables cuantitativas primeramente se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. A las variables con una distribución normal, se las evaluó la igualdad de varianzas mediante el estadístico de Levene. Las variables con una distribución normal e igualdad de varianzas se analizaron mediante pruebas paramétricas, mientras que las que no cumplían ambas condiciones se analizaron con pruebas no paramétricas.

Para evaluar las diferencias entre los sujetos con y sin la EOS se emplearon las siguientes pruebas: en las variables cuantitativas con una distribución normal e igualdad de varianzas se empleó la prueba T para muestras independientes, en las variables cuantitativas que no cumplían estas condiciones y en las variables ordinales se utilizó la prueba U de Mann-Whitney y en las variables nominales se empleó la prueba Chi-cuadrado.

En cuanto a la evaluación de las relaciones entre diferentes variables se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

- Para la relación entre dos variables cualitativas se empleó la prueba Chi cuadrado.
- Para la relación entre dos variables cuantitativas se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson o el de Spearman, en función de si cumplían ambas la condición de normalidad o no, respectivamente.
- Para la relación entre una variable cualitativa y una cuantitativa que cumplía las condiciones de normalidad e igualdad de varianzas se utilizó la prueba paramétrica ANOVA de un factor. Si se rechazaba la hipótesis de igualdad de medias, se realizaron las comparaciones por pares con la prueba de Tukey. Sin embargo, para la relación entre una variable cualitativa y una cuantitativa que no cumplía la normalidad o la igualdad de varianzas se empleó la prueba no paramétrica H de Kruskal-Wallis. Y al igual que anteriormente, si se rechazaba la hipótesis de igualdad de medias, se realizaron las comparaciones por pares con la prueba U de Mann-Whitney junto con la corrección de Bonferroni.

No se han realizado análisis estadísticos con la variable “presencia o ausencia de microneuromas” ya que no se ha observado ninguno en las imágenes analizadas.

Se tomó un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 40 sujetos, de los cuales 20 presentaban la EOS y 20 no presentaban la EOS. La muestra la comprendían 15 hombres y 25 mujeres con un rango de edad de 42-86 años. Las características descriptivas de los dos grupos de estudio se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Datos descriptivos en los dos grupos de estudio.

VARIABLES	PACIENTES CON EOS	SUJETOS SIN EOS	P-valor
Sexo (%hombres/%mujeres)	25/75	45/55	0,185
Edad (años)	61,10 ± 10,61	57,30 ± 8,40	0,228
Años desde diagnóstico de EOS	13,65 ± 11,84	-----	-----
Cuestionario OSDI (0-100)	41,09 ± 21,59	3,16 ± 3,38	<0,0001
BUT (segundos)	3,18 ± 1,37	4,45 ± 1,84	0,018
Tinción corneal (Esc. Oxford, 0-5)	1 [1, 2]	0 [0, 0,75]	<0,0001
Tinción conjuntival (Esc. Oxford, 0-5)	2 [1, 2]	0 [0, 1]	<0,0001
Test de Schirmer con anestesia (0-35 mm)	11,55 ± 9,26	9,55 ± 5,63	0,820

Las variables cuantitativas se expresan como media ± desviación estándar, y las ordinales como mediana [cuartil 1, cuartil 3]. EOS: enfermedad de ojo seco; OSDI: de sus siglas en inglés *Ocular Surface Disease Index*; Esc.: escala; BUT: de sus siglas en inglés *Break-Up Time*, o tiempo de ruptura lagrimal.

3.1. Diferencias en el plexo nervioso corneal entre sujetos con y sin la EOS

En primer lugar, se analizaron las posibles diferencias entre ambos grupos de estudio en las variables medidas en el plexo nervioso corneal. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna variable, tal y como se aprecia en la Tabla 2. Además, no se halló la presencia de microneuromas en ningún sujeto, por lo que no se ha realizado el análisis con esta variable.

Tabla 2. Variables analizadas en el plexo nervioso corneal en los dos grupos de estudio.

VARIABLES	PACIENTES CON EOS	SUJETOS SIN EOS	P-valor
Nº nervios (n/mm ²)	67,76 ± 26,22	68,73 ± 26,47	0,908
Nº ramificaciones (n/mm ²)	25,05 ± 17,57	25,67 ± 14,29	0,902
Densidad nerviosa (µm/mm ²)	15405,68 ± 4355,5	15829,19 ± 4160,18	0,725

Longitud media de los nervios ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)	1484,70 \pm 214,55	1536,14 \pm 251,80	0,685
Nº células dendríticas (n/mm^2)	23,23 \pm 19,25	14,74 \pm 12,77	0,109
Tortuosidad nerviosa (0-4)	2 [2, 3]	2 [2, 3]	0,925

Las variables cuantitativas se expresan como media \pm desviación estándar, y las ordinales como mediana [cuartil 1, cuartil 3]. EOS: enfermedad de ojo seco.

3.2. Relación entre células dendríticas y el resto de las variables

En primer lugar, se analizó la relación entre el número de células dendríticas y las distintas variables (tanto las descriptivas como el resto de las variables analizadas en el plexo nervioso corneal) teniendo en cuenta todos los sujetos. Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la tinción conjuntival ($p=0,008$). Además, estas diferencias solo se observan entre los grados de tinción 0 y 2 ($p=0,006$), siendo los sujetos con grado 2 de tinción conjuntival los que mayor número de células dendríticas presentaban (Figura 2).

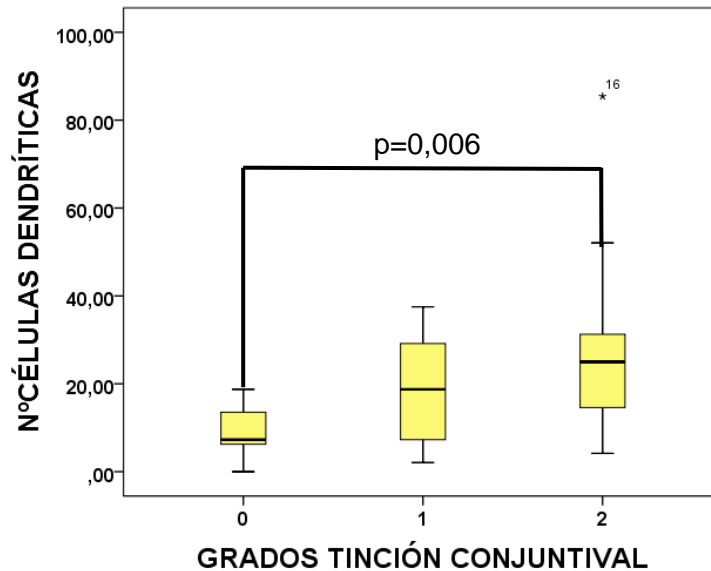


Figura 2. Gráfico del número de células dendríticas en los diferentes grados de tinción conjuntival.

En segundo lugar, se evaluó la relación entre el número de células dendríticas y el resto de las variables solo en los sujetos con la EOS. En este caso no se encontraron diferencias significativas con ninguna variable.

3.3. Correlación entre los años desde el diagnóstico de la EOS y los parámetros del plexo nervioso corneal

Se analizó la relación entre los años desde el diagnóstico de la EOS y las variables analizadas en el plexo nervioso corneal (número de nervios, densidad nerviosa, longitud media de los nervios, tortuosidad nerviosa y número de células dendríticas) teniendo en cuenta solo al grupo de sujetos con la EOS. Tras este análisis solo se encontró una relación estadísticamente significativa entre los

años desde el diagnóstico de la EOS y el número de células dendríticas ($p=0,008$). El coeficiente de correlación de esta relación lineal es de 0,577, por lo que se trata de una relación directa moderada¹⁸, y, por tanto, a mayor número de años con la EOS diagnosticada mayor número de células dendríticas en el plexo nervioso corneal.

3.4. Análisis de la tortuosidad frente al resto de variables en los sujetos con la EOS

En el grupo de sujetos con la EOS también se analizó la relación entre los grados de tortuosidad nerviosa y las demás variables (tanto las descriptivas como el resto de los parámetros medidos en el plexo nervioso corneal). Encontramos las siguientes diferencias significativas:

- Entre los grados de tortuosidad nerviosa y la puntuación del cuestionario OSDI ($p=0,01$). Estas diferencias se dan entre el grado de tortuosidad 4 y el grado 1 ($p=0,013$), el grado 2 ($p<0,0001$) y el grado 3 ($p=0,02$), siendo los sujetos con grado de tortuosidad nerviosa 4 los que mayor sintomatología ocular presentaban (Figura 3).
- Entre los grados de tortuosidad nerviosa y el número de nervios ($p<0,0001$). Se encontraron diferencias significativas entre el grado de tortuosidad 1 y los grados 3 y 4 ($p<0,0001$), entre el grado de tortuosidad 2 y los grados 3 y 4 ($p<0,0001$), y entre el grado de tortuosidad 3 y el grado 4 ($p<0,0001$). En la Figura 4 se observa que los sujetos con grados de tortuosidad nerviosa 3 y 4 son los que mayor número de nervios presentaban.
- Entre los grados de tortuosidad nerviosa y el número de ramificaciones ($p<0,0001$). Estas diferencias significativas se encuentran entre el grado de tortuosidad 1 y los grados 3 y 4 ($p<0,0001$), entre el grado de tortuosidad 2 y los grados 3 y 4 ($p<0,0001$), y entre el grado de tortuosidad 3 y el grado 4 ($p<0,0001$), siendo los sujetos con grados de tortuosidad nerviosa 3 y 4 los que presentaban mayor número de ramificaciones (Figura 5).
- Entre los grados de tortuosidad y la densidad nerviosa ($p=0,050$). La densidad nerviosa aumenta con el grado tortuosidad. Por lo que los sujetos con grado 4 de tortuosidad son los que mayor densidad de nervios presentan. Al realizar las comparaciones por parejas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ningún grado de tortuosidad de los nervios.
- Entre los grados de tortuosidad nerviosa y la longitud media de los nervios ($p=0,01$). La longitud media de los nervios disminuye con el grado de tortuosidad, por lo que los sujetos con grado 1 de tortuosidad son los que presentan una mayor longitud de los nervios. Al realizar las comparaciones por parejas, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ningún grado de tortuosidad de los nervios.

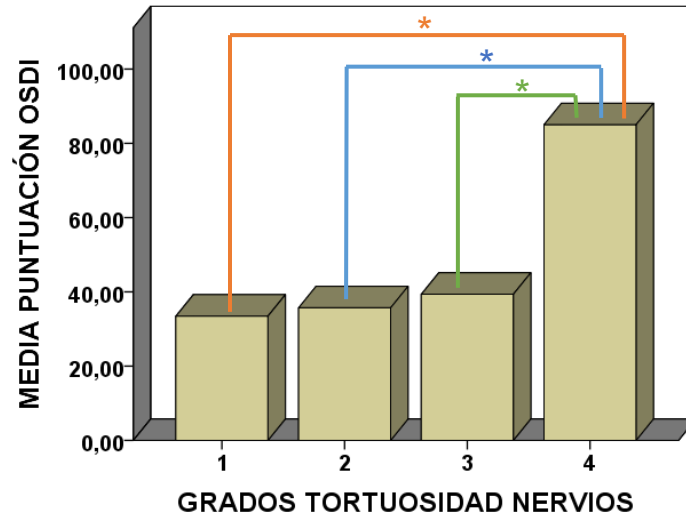


Figura 3. Gráfico de la puntuación obtenida en el cuestionario *Ocular Surface Disease Index* (OSDI) respecto a los diferentes grados de tortuosidad de los nervios corneales en el grupo de sujetos con la EOS. *p-valor \leq 0,02.

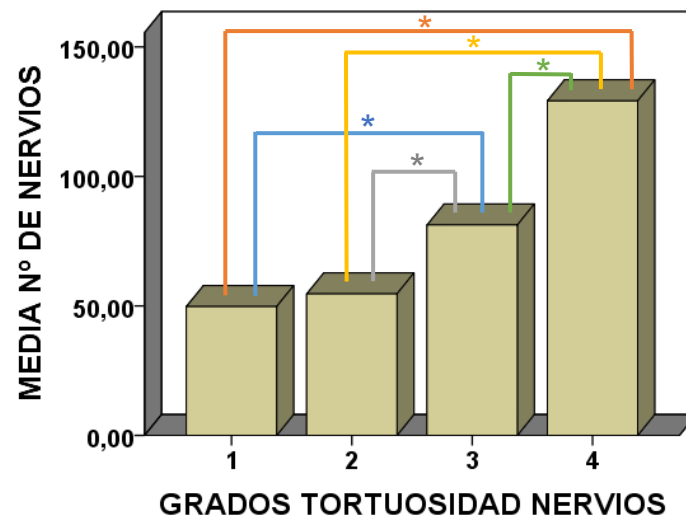


Figura 4. Gráfico del número de nervios corneales en función de los diferentes grados de tortuosidad nerviosa en el grupo de sujetos con la EOS. *p-valor $<$ 0,0001.

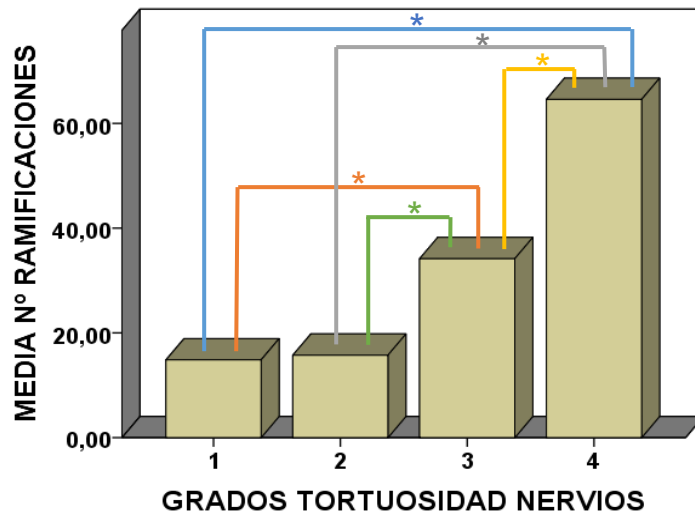


Figura 5. Gráfico del número de ramificaciones respecto a los distintos grados de tortuosidad nerviosa en el grupo de sujetos con la EOS. *p-valor<0,0001.

4. DISCUSIÓN

La EOS es una patología inflamatoria que afecta a millones de personas en el mundo, y que se ve condicionada por diversos factores como la edad, el sexo o el uso de lentes de contacto, entre otros.² Así mismo, presenta un gran impacto para los sujetos con dicha enfermedad, ya que supone un deterioro tanto en la calidad de vida como en la condición visual.¹

Actualmente hay numerosos métodos para evaluar y diagnosticar esta enfermedad. En estos últimos años se está realizando una gran cantidad de estudios en sujetos con la EOS en los que emplean la microscopía confocal *in vivo*. Esta técnica permite evaluar los posibles cambios que se producen a nivel corneal en la EOS.¹² En este estudio se utiliza la microscopía confocal *in vivo*, con el fin de evaluar el plexo nervioso subbasal corneal. De igual forma que en otros estudios, hemos evaluado la densidad nerviosa, el número de nervios, el número de ramificaciones, la longitud media de los nervios, el número de células dendríticas, la tortuosidad nerviosa y la presencia de microneuromas.^{9,15,19-23}

Estudios previos evidencian variaciones morfológicas del plexo nervioso en sujetos con la EOS que pueden ir asociados a una actividad metabólica en el plexo nervioso subbasal corneal.⁹ Algunos de estos estudios constatan un aumento de la tortuosidad junto con una disminución de la densidad nerviosa, del número de ramificaciones y de la longitud media de los nervios en sujetos con la EOS,^{9,22,24} mientras que otros autores exponen un aumento del número de nervios.²¹ No obstante, hay ciertos estudios, al igual que en este trabajo, que no muestran diferencias en la densidad y el número de nervios entre los sujetos con y sin la EOS.^{23,25} Estas discrepancias entre los diferentes estudios pueden estar ligadas a la distinta etiología y severidad de la EOS de los sujetos incluidos en cada estudio. Además, se puede deber a diferencias en el tamaño de la muestra y/o en el método de captura y análisis de las imágenes.

Así mismo, hay autores que han encontrado un aumento significativo de células dendríticas en los sujetos con la EOS.¹⁵ Este aumento puede estar ligado a la inflamación que se produce en esta patología. Además, en otras investigaciones se propone la presencia de microneuromas en sujetos con síntomas de dolor ocular,²¹ como podría ser en la EOS. Sin embargo, en este estudio no hemos encontrado diferencias en el número de células dendríticas ni presencia de microneuromas, pudiendo ser debido al pequeño tamaño muestral y/o a los diferentes criterios de inclusión de los sujetos con la EOS.

Por otro lado, estudios previos han comprobado que la tinción conjuntival puede ser utilizada para cuantificar la inflamación de la superficie ocular en sujetos con la EOS.²⁶ En este trabajo se ha encontrado que hay relación entre la tinción conjuntival y el número de células dendríticas, observándose más células dendríticas en grados de tinción conjuntival mayores. Sin embargo, otros autores reportan una relación entre las células dendríticas y la tinción corneal.²⁷ Por lo tanto, podríamos asumir una relación entre las tinciones corneales y conjuntivales y el grado de inflamación asociado a las células dendríticas.

Además, en este trabajo se ha observado que cuantos más años han pasado desde el diagnóstico de la EOS, más células dendríticas presentan en el plexo nervioso, lo cual señala que con el avance de la enfermedad se aumenta la inflamación y por tanto el número de células dendríticas. Además, hay autores

que mencionan cambios en la morfología de las células dendríticas debido a daños o infecciones, lo que resulta en un aumento del tamaño celular por la maduración de estas células.¹⁵

De igual forma que otros autores, en este trabajo se ha encontrado que hay relación entre la puntuación en el cuestionario OSDI y el grado de tortuosidad de los nervios.²² Esto indica que los sujetos con la EOS que tienen mayor sintomatología ocular muestran una mayor tortuosidad en los nervios. Por lo tanto, podemos asumir que la tortuosidad está asociada con la sintomatología.

Así mismo, se halló una relación entre la tortuosidad y el número de nervios y de ramificaciones, indicando que la tortuosidad de los nervios es mayor cuando aumenta el número de nervios y ramificaciones. Otros autores reflejan la relación entre la tortuosidad y el número de nervios,^{22,28} aunque no hallan una correlación estadísticamente significativa entre la tortuosidad y el número de ramificaciones.²⁸ Esto puede deberse al método utilizado en el conteo de las ramificaciones, ya que ellos consideraron como ramificación las fibras nerviosas más finas que conectan con los nervios principales, mientras que nosotros consideramos como ramificaciones todas las intersecciones entre los nervios.

Por otra parte, en este estudio se observa una relación entre el grado de tortuosidad y la densidad nerviosa, así como entre el grado de tortuosidad nerviosa y la longitud media de los nervios. Igualmente, otros autores señalan la relación entre el grado de tortuosidad y la densidad nerviosa como estadísticamente significativa. En cambio, no hallan correlación significativa entre el grado de tortuosidad nerviosa y la longitud media de los nervios.²⁸ Además, también se han realizado estudios que comparan los resultados entre dos observadores diferentes a la hora de analizar imágenes con el ImageJ y se han hallado diferencias de alrededor de 1 mm entre las medidas de ambos evaluadores.¹³ Por lo tanto, estas discrepancias entre ambos estudios pueden deberse a las diferencias interobservador.

Sin embargo, este trabajo no está exento de limitaciones. Una de ellas es el pequeño tamaño muestral, siendo conveniente aumentarlo con el fin de poder encontrar mayores diferencias entre ambos grupos de sujetos y en las relaciones entre las distintas variables. También sería interesante realizar un análisis más profundo del plexo nervioso corneal, evaluando más parámetros como la reflectividad o la anchura de los nervios.^{9,12} Por último, otra limitación fue que el análisis de la tortuosidad de los nervios era subjetivo y por lo tanto susceptible a variaciones interobservador, por lo que sería interesante su evaluación de forma objetiva.

5. CONCLUSIONES

1. El plexo nervioso subbasal corneal no difiere significativamente entre los sujetos con y sin la EOS.
2. El número de células dendríticas del plexo nervioso corneal aumenta con la tinción conjuntival posiblemente por su relación con la inflamación de la superficie ocular.
3. Cuanto mayor es el tiempo que el paciente lleva con la EOS diagnosticada, mayor número de células dendríticas presenta en el plexo nervioso corneal, lo cual podría deberse al avance de la inflamación.
4. El grado de tortuosidad de los nervios corneales se incrementa cuanto mayor es la sintomatología ocular, el número de nervios y ramificaciones, la densidad nerviosa y la longitud media de los nervios corneales.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Subcomité de Epidemiología de DEWS. Definición y clasificación de la enfermedad del ojo seco. *Ocul Surf.* 2007;5:75-92.
2. Craig JP, Nelson JD, Azar DT, Belmonte C, Bron AJ, Chauhan SK, et al. TFOS DEWS II Report Executive Summary. *Ocul Surf.* 2017;15:802-812.
3. Gayton JL. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol.* 2009;3:405-412.
4. Wolffsohn JS, Arita R, Chalmers R, Djalilian A, Dogru M, Dumbleton K, et al. TFOS DEWS II Diagnostic Methodology report. *Ocul Surf.* 2017;15:539-574.
5. Viso E, Gude F, Rodríguez-Ares MT. The association of meibomian gland dysfunction and other common ocular diseases with dry eye: A population-based study in Spain. *Cornea.* 2011;30:1-6.
6. Sullivan BD, Whitmer D, Nichols KK, Tomlinson A, Foulks GN, Geerling G, et al. An objective approach to dry eye disease severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:6125-6130.
7. Xu KP, Yagi Y, Toda I, Tsubota K. Tear Function Index: A New Measure of Dry Eye. *Arch Ophthalmol.* 1995;113:84-88.
8. Pinto F, Garrote JI, Vela A, Calonge M, Gonzalez MJ. Técnicas diagnósticas para el síndrome de ojo seco (I). *Gaceta de optometría y óptica oftálmica.* 2011;465:12-20.
9. del Castillo JMB, Wasfy MAS, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. An In Vivo Confocal Masked Study on Corneal Epithelium and Subbasal Nerves in Patients with Dry Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:3030-3035.
10. Labbé A, Khammari C, Dupas B, Gabison E, Brasnu E, Labetoulle M, et al. Contribution of in vivo confocal microscopy to the diagnosis and management of infectious keratitis. *Ocul Surf.* 2009;7:41-52.
11. Tervo T. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:339-358.
12. Matsumoto Y, Ibrahim OMA. Application of In Vivo Confocal Microscopy in Dry Eye Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:41-47.
13. Cottrell P, Ahmed S, James C, Hodson J, McDonnell PJ, Rauz S, et al. Neuron J is a Rapid and Reliable Open Source Tool for Evaluating Corneal Nerve Density in Herpes Simplex Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55:7312-7320.
14. Patel DV, McGhee CN. Mapping of the Normal Human Corneal Sub-Basal Nerve Plexus by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4485-4488.
15. Kheirkhah A, Rahimi Darabad R, Cruzat A, Hajrasouliha AR, Witkin D, Wong N, et al. Corneal epithelial immune dendritic cell alterations in subtypes of dry eye disease: A pilot in vivo confocal microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:7179-7185.
16. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of Corneal Nerves Using Confocal Microscopy. *Cornea.* 2001;20:374-384.
17. Aggarwal S, Colon C, Kheirkhah A, Hamrah P. Efficacy of autologous serum tears for treatment of neuropathic corneal pain. *Ocul Surf.* 2019;17:532-539.
18. Martínez Ortega RM, Tuya Pendás LC, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A; Cánovas AM. El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Rev Haban Cienc Méd.* 2009;8.
19. Gambato C, Longhin E, Catania AG, Lazzarini D, Parrozzani R, Midena E. Aging and corneal layers: an in vivo corneal confocal microscopy study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2015;253:267-275.

20. Zhang M, Chen J, Luo L, Xiao Q, Sun M, Liu Z. Altered corneal nerves in aqueous tear deficiency viewed by in vivo confocal microscopy. *Cornea*. 2005;24:818-824.
21. Al-Aqaba MA, Dhillon VK, Mohammed I, Said DG, Dua HS. Corneal nerves in health and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2019;73:100762.
22. Villani E, Galimberti D, Viola F, Mapelli C, Ratiglia R. The cornea in Sjögren's syndrome: An in vivo confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:2017-2022.
23. Hoçal BM, Örneç N, Zileliođlu G, Elhan AH. Morphology of corneal nerves and corneal sensation in dry eye: A preliminary study. *Eye (Lond)*. 2005;19:1276-1279.
24. Giannaccare G, Pellegrini M, Sebastiani S, Moscardelli F, Versura P, Campos EC. In vivo confocal microscopy morphometric analysis of corneal subbasal nerve plexus in dry eye disease using newly developed fully automated system. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019;257:583-589.
25. Tuominen ISJ, Konttinen YT, Vesaluoma MH, Moilanen JAO, Helintö M, Tervo TMT. Corneal innervation and morphology in primary Sjögren's syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2545-2549.
26. Yang S, Lee HJ, Kim DY, Shin S, Barabino S, Chung SH. The Use of Conjunctival Staining to Measure Ocular Surface Inflammation in Patients with Dry Eye. *Cornea*. 2019;38:698-705.
27. Mastropasqua R, Agnifili L, Fasanella V, Lappa A, Brescia L, Lanzini M, et al. In vivo distribution of corneal epithelial dendritic cells in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:5996-6002.
28. Labbé A, Liang Q, Wang Z, Zhang Y, Xu L, Baudouin C, et al. Corneal nerve structure and function in patients with non-sjögren dry eye: Clinical correlations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:5144-5150.

ANEXO I: Aprobación del Comité de Ética de la Investigación



Avda. Ramón y Cajal, 3 - 47003
Valladolid Tel.: 983 42 00 00 -
Fax 983 25 75 11

gerente.hcuv@saludcastillayleo
n.es

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

Valladolid a 20 de febrero de 2020

En la reunión del CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID ESTE del 20 de febrero de 2020, se procedió a la evaluación de los aspectos éticos del siguiente proyecto de investigación.

PI 20- 1586 TFG	ANÁLISIS DEL PLEXO NERVIOSO CORNEAL EN EL OJO SECO	I.P.: MARTA BLANCO, MARGARITA CALONGE. EQUIPO: BLANCA GERBOLÉS AN- DRÉS, SARA DEL CURA CORDERO UVA/IOBA RECIBIDO: 08-01-2020
-----------------------	---	---

A continuación, les señalo los acuerdos tomados por el CEIm ÁREA DE SALUD VALLADOLID ESTE en relación a dicho Proyecto de Investigación:

Considerando que el Proyecto contempla los Convenios y Normas establecidos 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** y la **aceptación** del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos Área de Salud Valladolid Este para que sea llevado a efecto dicho Proyecto de Investigación.

Un cordial saludo.

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

ANEXO II: Aprobación de la Comisión de Investigación del IOBA



IOBA - Proyectos Investigación

Conformidad del Director del IOBA / Comisión de Investigación



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-2019-33 que lleva por título "Análisis del plexo nervioso corneal en el ojo seco." 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 Margarita Calonge Cano y Marta Blanco

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

En Valladolid a , 27 de Noviembre de 2019

Fdo.: 

Director / Secretario de la Comisión de Investigación

