

Estudio del plexo nervioso sub-basal epitelial en pacientes diabéticos mediante microscopía confocal corneal

Study of the sub-basal epithelial nerve plexus in diabetic patients thorough corneal confocal microscopy

Yanisey Ponce Torres, Miguel Omar Mokey Castellanos, Tian Yang, Aylin Espinosa Gómez

Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: evaluar los cambios morfológicos del plexo nervioso sub-basal epitelial corneal en ojos de pacientes diabéticos y su relación con la gravedad de la retinopatía diabética.

Método: se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal que incluyó 39 ojos de 21 pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, el cual quedó conformado en: Grupo 1: pacientes sin retinopatía diabética, Grupo 2: retinopatía diabética no proliferativa, Grupo 3: retinopatía diabética proliferativa y el Grupo control con 38 ojos de 19 sujetos sanos. A todos se les realizó el examen de microscopía confocal para el estudio de la neuropatía diabética corneal analizando 4 parámetros que fueron: el número de fibras, número de arrosamiento, patrón de ramificación y tortuosidad de la fibra.

Resultados: el número de fibras, el de arrosamiento y el patrón de ramificación disminuyeron significativamente en pacientes diabéticos con respecto al grupo control ($p < 0,001$, $p < 0,001$ y $p < 0,001$ respectivamente). La tortuosidad de la fibra se encontró aumentada en pacientes diabéticos con respecto al grupo control. Se observó que a medida que progresa la retinopatía diabética existe una disminución en cuanto al número de fibras y el arrosamiento.

Conclusiones: existen cambios morfológicos del plexo nervioso sub-basal epitelial en ojos de pacientes diabéticos con respecto a los sujetos sanos. Estas alteraciones se hacen más severas a medida que aumenta la gravedad de la retinopatía diabética.

Palabras clave: microscopía confocal corneal; plexo sub-basal epitelial; retinopatía diabética.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the morphological changes of the sub-basal epithelial corneal nerve plexus in eyes of diabetic patients and their relation with the severity of diabetic retinopathy.

Method: A descriptive cross-sectional study was carried out, including 39 eyes from 21 patients diagnosed with type 2 diabetes mellitus. Group 1 included patients without diabetic retinopathy; Group 2, non-proliferative diabetic retinopathy; Group 3, Proliferative diabetic retinopathy; and the Control group, with 38 eyes of 19 healthy subjects. All were submitted to the confocal microscopy examination for the study of corneal diabetic neuropathy by analyzing 4 parameters: number of fibers, beading grading, branching pattern and fiber tortuosity.

Results: The numbers of fibers and beading grading, and the branching pattern decreased significantly in diabetic patients compared to the control group ($p < 0.001$, $p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). The fiber tortuosity was found to be increased in diabetic patients compared to the control group. It was observed that as the diabetic retinopathy progresses there is a decrease in the number of fibers and beading grading.

Conclusions: There are morphological changes of the sub-basal epithelial nerve plexus in the eyes of diabetic patients with respect to healthy subjects. These alterations become more severe as the severity of diabetic retinopathy increases.

Keywords: corneal confocal microscopy; sub-basal epithelial plexus; diabetic retinopathy.

INTRODUCCIÓN

La córnea es el tejido más densamente inervado del cuerpo humano,¹ suplido por fibras nerviosas sensoriales provenientes de los nervios ciliares que son ramas terminales de la división oftálmica del nervio trigémino.²⁻⁴ El plexo nervioso sub-basal corneal se caracteriza por ampliaciones axonales localizadas o arrosamientos, los cuales son acúmulos de mitocondrias y partículas de glicógeno situadas en la periferia de los troncos nerviosos.^{5,6}

La arquitectura de los nervios corneales ha sido estudiada usando microscopios ópticos y electrónicos.⁷ Su uso en combinación con técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas ha proporcionado un mayor entendimiento de la inervación corneal con respecto a la distribución y anatomía ultraestructural de las fibras nerviosas, terminales axónicas y tipos de neurotransmisores.⁴ Estos estudios tienen la limitación de haber sido realizados en tejido corneal obtenido de ojos enucleados o de cadáveres, y es por esto que son afectados por la aparición de artefactos resultantes del tejido procesado y *posmortem* o *ex vivo*.

La microscopía confocal *in vivo* (MCIV) es una novedosa técnica que realiza secciones ópticas de la córnea humana viviente a través de todo su grosor, mostrando imágenes seriadas con gran resolución y contraste.⁸ Su naturaleza no invasiva ⁶ permite el análisis de la microestructura corneal en estado fisiológico evitando los artefactos asociados a los estados *ex vivo*.⁹

El plexo nervioso sub-basal epitelial está involucrado en diferentes enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus.^{10,11} Según la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 171 millones de personas sufrían de diabetes mellitus en el año 2000, y se estimó que este número se duplicaría para el año 2030.¹¹⁻¹³

El propósito de este estudio es emplear la microscopía confocal con el objetivo de evaluar las alteraciones morfológicas observadas en el plexo nervioso sub-basal epitelial corneal en ojos de pacientes diabéticos y su relación con diferentes estadios de retinopatía diabética.

MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal en la consulta especializada de Córnea del Servicio de Oftalmología del Hospital "Hermanos Ameijeiras" de La Habana en el período de un año (abril 2014-2015).

Se seleccionaron los pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2. Fueron excluidos los casos con cirugía ocular previa y con opacidad corneal. La muestra del estudio incluyó los pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, según los criterios antes expuestos. Se tomó como grupo control a voluntarios sanos, para comparar los parámetros con la muestra que quedó conformada por los siguientes grupos:

Grupo 1: Diabéticos sin retinopatía diabética.

Grupo 2: Diabéticos con retinopatía diabética no proliferativa.

Grupo 3: Diabéticos con retinopatía diabética proliferativa.

Los parámetros (o variables) estudiados fueron:

Número de fibras nerviosas: se definió como la suma de troncos nerviosos por imagen, calculados manualmente. Las anastomosis (uniones nerviosas cortas, perpendiculares) y ramas nerviosas no fueron consideradas. Se clasificó como normal el valor encontrado en sujetos sanos. En los casos por encima o por debajo, se consideró como aumentado o disminuido respectivamente.

Número de arrosamiento (beading): número de puntos hiperreflectivos, bien definidos que protruyen a ambos lados de la fibra nerviosa, calculados manualmente en una distancia de 100 μ de una fibra. Se clasificó como normal al valor encontrado en sujetos sanos. En los casos por encima o por debajo, se consideró como aumentado o disminuido respectivamente.

Patrón de ramificación: se define como el mayor número de ramificación, considerando solo una fibra por imagen. Se clasificó con el sistema propuesto por *Midena y otros*.¹⁴

Tortuosidad de la fibra: se definió considerando simultáneamente la frecuencia y amplitud de los cambios en la dirección de la fibra nerviosa. Se clasificó con el sistema propuesto por *Olivera-Soto y Efrom*.⁴

A todos los pacientes se les realizó un examen oftalmológico. La retinopatía diabética fue clasificada de acuerdo a la propuesta del estudio clínico controlado *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS)*.¹⁵

El examen de microscopía confocal *in vivo* se realizó con el Confoscan 4 (CS4), el cual proporciona imágenes bidimensionales con una resolución lateral de 0,6 μm / pixel. El campo de visión examinado por el equipo es un área de (x, y) 460 x 345 μm (158 700 μm^2).

Fueron seleccionadas y almacenadas digitalmente 3 imágenes de las más representativas y mejor enfocadas del plexo nervioso sub-basal epitelial.

RESULTADOS

Se analizaron las imágenes de 21 pacientes diabéticos y 19 sanos. No existieron diferencias significativas en cuanto a la edad, el sexo y el color de la piel ($p > 0,05$), lo que demostró la homogeneidad entre los 2 grupos y permite su comparación. Se encontraron diferencias significativas entre pacientes diabéticos y sanos con respecto a la densidad de fibras, $2,5 \pm 1,0$ vs. $6,9 \pm 1,6$ ($p < 0,001$) y el arrosariamiento $8,4 \pm 3,4$ vs. $16,3 \pm 1,8$ ($p < 0,001$) respectivamente ([tabla 1](#)), a diferencia de los valores encontrados en los voluntarios sanos que fue de $16,3 \pm 1,8$, lo que demostró una disminución altamente significativa de los valores del número de arrosariamiento ($p < 0,001$).

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de la densidad de fibras y el arrosariamiento según grupo de estudio

VARIABLES	ESTADÍSTICOS	DIABÉTICOS	SANOS	p*
Densidad de fibras	Media \pm DE	$2,5 \pm 1,0$	$6,9 \pm 1,6$	< 0,001
	Mínimo	1,0	4,0	
	Máximo	4,0	11,0	
Arrosariamiento	Media \pm DE	$8,4 \pm 3,4$	$16,3 \pm 1,8$	< 0,001
	Mínimo	3,0	11,0	
	Máximo	16,0	19,0	

*Prueba t de Student

Fuente: Base de datos.

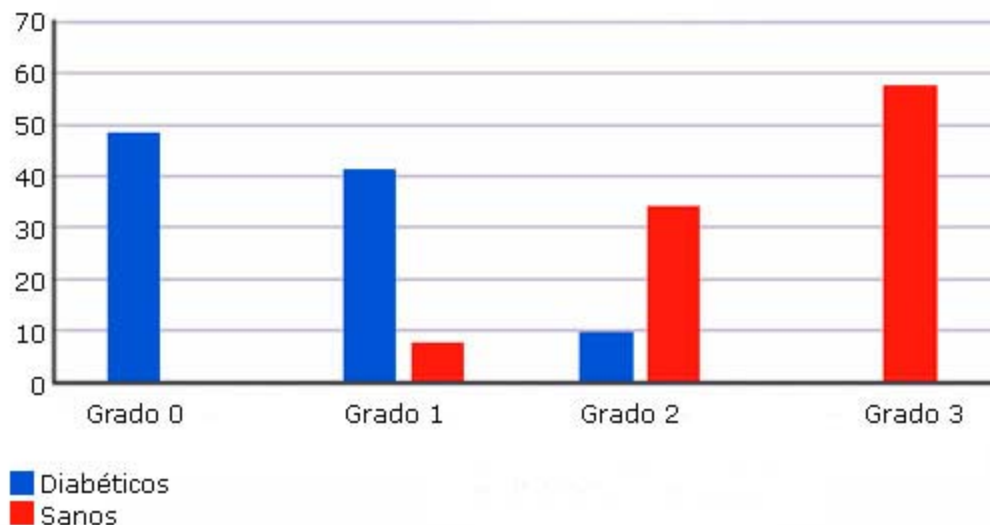
El patrón de ramificación de la fibra nerviosa fue otro de los parámetros tomados en cuenta para el análisis de la neuropatía corneal. Podemos observar en la [tabla 2](#) y la [figura](#) que en cuanto a los pacientes diabéticos, 20 para un 48,7 % presentaron Grado 0 y ninguno el Grado 3. Estos valores evidencian una disminución significativa ($p < 0,001$) del patrón de ramificación cuando lo comparamos con los resultados obtenidos en el grupo control, que fueron, ningún sujeto para el Grado 0 y predominio de los Grados 2 y 3 (34,2 % y 57,8 % respectivamente).

Tabla 2. Características de los ojos según ramificación de la fibra nerviosa y grupo de estudio

Ramificación	Diabéticos n=41		Sanos n=38		p*
	No.	%	No.	%	
Grado 0	20	48,7	0	0,0	<0,001
Grado 1	17	41,4	3	7,8	<0,001
Grado 2	4	9,7	13	34,2	<0,001
Grado 3	0	0,0	22	57,8	<0,001

*Prueba ji cuadrado (χ^2) con corrección por continuidad.

Fuente: Base de datos.



Fuente: Base de datos.

Fig. Características de los ojos según patrón de ramificación de la fibra nerviosa y grupo de estudio.

Otro parámetro estudiado fue la tortuosidad de la fibra nerviosa. La [tabla 3](#) muestra que en el Grado 0 no hubo ningún sujeto, tanto en los diabéticos como en el grupo control; predominio de los Grados 2 y 3 en el grupo de pacientes diabéticos y del Grado 1 en los sujetos del grupo control.

Tabla 3. Características de los ojos según tortuosidad de la fibra nerviosa y grupo de estudio

Tortuosidad	Diabéticos n=41		Sanos n=38		p
	Número	%	Número	%	
Grado 0	0	0	0	0	-
Grado 1	4	9,8	38	100	0,002 ^a
Grado 2	14	34,1	0	0,0	<0,001 ^a
Grado 3	13	31,7	0	0,0	<0,001 ^a
Grado 4	10	24,4	0	0,0	0,001 ^b

a: Prueba ji cuadrado (χ^2) con corrección por continuidad.

b: Prueba exacta de Fisher.

En la [tabla 4](#) se expresa la relación que existe entre la gravedad de la retinopatía diabética y 2 parámetros que representan un indicador potencial de neuropatía corneal. Se puede observar que existen diferencias significativas entre los 4 grupos estudiados ($p < 0,001$). En cuanto a la densidad de fibras nerviosas existió un número elevado de ellas en los pacientes del grupo control ($6,9 \pm 1,7$) con respecto al grupo de pacientes con no retinopatía diabética (NRD) ($3,4 \pm 0,7$), al de retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) ($2,8 \pm 0,7$), y al grupo de retinopatía diabética proliferativa ($1,8 \pm 0,9$).

Tabla 4. Relación existente entre neuropatía corneal y gravedad de la retinopatía diabética

Parámetros	Control	NRD	RDNP	RDP	p*
	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	
Densidad	$6,9 \pm 1,7$	$3,4 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,9$	<0,001
Arrosariamiento	$16,3 \pm 1,8$	$11,0 \pm 2,4$	$8,9 \pm 4,0$	$6,4 \pm 1,9$	<0,001

* Prueba de Kruskal Wallis.

Fuente: Base de datos.

De igual forma se comportó el segundo parámetro evaluado que fue el arrosamiento de la fibra en el que encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos estudiados ($p < 0,001$). Se observó mayor número de arrosamiento en el grupo control ($16,3 \pm 1,8$), que en los grupos de pacientes con NRD ($11,0 \pm 2,4$), RDNP ($8,9 \pm 4,0$) y RDP ($6,4 \pm 1,9$).

DISCUSIÓN

*Erie y otros*¹⁶ plantean que la morfología del plexo nervioso sub-basal epitelial de la córnea no se modifica con la edad del sujeto, lo que nos permite excluir un factor biológico importante cuando se evalúan los cambios en el plexo nervioso sub-basal de la córnea.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con los resultados obtenidos por otros autores,^{14,17-19} que reportaron una reducción del patrón de ramificación del plexo nervioso sub-basal del epitelio corneal en pacientes diabéticos, lo cual sugiere una reducción en la capacidad regenerativa de la fibra nerviosa con progresión de la severidad de la neuropatía.¹⁴

Los resultados de la [tabla 3](#) evidencian un aumento en la tortuosidad de la fibra en los pacientes diabéticos con respecto a los sujetos del grupo control. Similares datos informan *Midena y otros*¹⁴ y *Kallinikos y otros*,²⁰ que utilizaron la microscopía confocal para cuantificar la tortuosidad del plexo nervioso sub-basal corneal en pacientes diabéticos y sujetos sanos.

En cuanto a la densidad de fibras nerviosas en los pacientes diabéticos encontramos una reducción respecto a los sujetos sanos del grupo control. *Midena y otros*¹⁴ reportan en sus estudios de la morfología nerviosa corneal una disminución del número de fibras nerviosas en pacientes diabéticos con respecto a los sanos, al igual que *Rosenberg y otros*,²¹ y *Malik y otros*¹⁷ lo que confirma un aumento en la degeneración de los nervios y corrobora el deterioro de la sensibilidad corneal evaluada con un estesiómetro mecánico.²¹ Estos últimos autores determinaron la disminución del número de fibras en el plexo de pacientes diabéticos comparado con sujetos del grupo control con una tendencia de mayor reducción con relación al aumento de la gravedad de la neuropatía periférica diabética.

El arrosamiento de la fibra nerviosa es otro de los parámetros estudiados. La actividad metabólica del plexo nervioso sub-basal corneal es documentada por el arrosamiento de los nervios, los cuales representan acúmulos de mitocondrias a lo largo de la fibra nerviosa. Esta significativa disminución del arrosamiento en los nervios representa actividad metabólica patológica de las pequeñas fibras nerviosas en los pacientes diabéticos.¹⁴

En nuestros casos encontramos mayor arrosamiento en los sujetos sanos que en los grupos de los enfermos, lo que evidencia una disminución a medida que aumenta la gravedad de la retinopatía diabética. Resultados similares hallaron *Nitoda y otros*¹³ quienes describieron valores significativamente más bajos en los 3 grupos de pacientes diabéticos comparados con los del grupo control. La severidad de las alteraciones observadas en el plexo nervioso sub-basal epitelial de la córnea fue correlacionada con el estatus de la retinopatía diabética de los participantes.¹³

Estudios previos realizados por *Messmer y otros*²² relacionan el estatus retinal en la diabetes mellitus y la neuropatía corneal. Los hallazgos en este estudio indican que hay una fuerte asociación entre el progreso de la retinopatía diabética y la neuropatía corneal diabética.

Se concluye que existen cambios morfológicos del plexo nervioso sub-basal epitelial en ojos de pacientes diabéticos con respecto a los sujetos sanos, como la disminución del número de fibras nerviosas, arrosamiento, ramificación y aumento de su tortuosidad. Y que hay asociación entre la neuropatía corneal y la gravedad de la retinopatía diabética.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muller LJ, Vrensen GF, Pels L, Cardozo BN, Willekens B.. Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:985-94.
2. Cruzat A, Pavan-Langston D, Hamrah P. In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves: Analysis and Clinical Correlation. *Semin Ophthalmol.* 2010;25(5-6):171-7.
3. Muller LJ, Pels L, Vrensen GF. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:476-88.
4. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea.* 2001;20:374-84.
5. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003;76:521-42.
6. Patel DV, McGhee CNJ. In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: a review. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:853-60.

7. Patel DV, McGhee CNJ. Mapping of the Normal Human Corneal Sub-Basal Nerve Plexus by In Vivo Laser Scanning Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:12.
8. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin and Experiment Ophthalmol.* 2009;37:100-17.
9. Erie JC, McLaren JW, Patel SV. Confocal Microscopy in Ophthalmology. *Am J Ophthalmol.* 2009;148:639-46.
10. Midena E, Cortese M, Mito S, Cavarzeran F, Gambato C, Ghirlando A. Confocal Microscopy of corneal sub-basal nerve plexus: a quantitative y cualitative analysis in health and patologic eyes. *J Refract Surg.* 2009 Jan;25 (1 suppl):S125-30.
11. Shaw JE, Sicree R. (2008). Epidemiology of type 2 diabetes. In: Feinglos MN, Bethel MA, eds. *Contemporary Endocrinology: Type 2 Diabetes Mellitus: An Evidence-Based Approach to Practical Management.* Totowa, NJ: Humana Press; 1-16.
12. Diabetes statistics. Alexandria VA: American Diabetes Association. Available from: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-satatistics> Consultado: 17 de enero de 2016.
13. Nitoda E, Kallinikos P, Pallikaris A, Moschandrea J, Amoiridis G, Ganotakis ES, et al. Correlation of diabetic retinopathy and corneal neuropathy using confocal microscopy. *Curr Eye Res.* 2012 Oct;37(10):898-906.
14. Midena E, Brugin E, Ghirlando A, Somnavilla M, Avogaro AJ. Corneal diabetic neuropathy: a confocal microscopy study. *Refract Surg.* 2006 Nov;22(9 Suppl):S1047-52.
15. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Fundus photographic risk factors for progression of diabetic retinopathy, ETDRS report no 12. *Ophthalmology.* 1991;98:757-65.
16. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea.* 2005;6:705-9.
17. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA, van Schie CH, Morgan P, Efron N, et al. Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia.* 2003;46:683-8.
18. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, Kallinikos P, Marshall A, Finnigan J, et al. Morgan P, Efron N, Boulton AJ, Malik RA. Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes Care.* 2010 Aug;33(8):1792-7.
19. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, et al. Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2007;56:2148-54.

20. Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, Boulton AJ, Efron N, Malik RA. Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:418-22.

21. Rosemberg ME, Tervo TMT, Immonen IJ, Muller LJ, Gronhagen-Riska C, Vesaluoma MH. Corneal structure and sensitivity in tipo I diabetes mellitus. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:2915-21.

22. Messmer EM, Schmid-Tannwald C, Zapp D, Kampik A. In vivo confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2010;248:1307-12.

Recibido: 5 de mayo de 2017.

Aprobado: 10 de junio de 2017.

Yanisey Ponce Torres. Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras". San Lázaro No. 701 entre Oquendo y Marqués González. La Habana, Cuba. Correo electrónico: alvaca@infomed.sld.cu