



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO DE MEDICINA

**MICROSCOPIA CONFOCAL IN VIVO COMO TÉCNICA DIAGNÓSTICA DE
PATOLOGÍA CORNEAL**

**IN VIVO CONFOCAL MICROSCOPY AS A DIAGNOSTIC TOOL FOR
CORNEAL PATHOLOGY**

Autora: Cecilia Millán Malnero

Tutor: Dr. Jesús Merayo Lloves

Cotutora: Rosa Elena Alvarado Villacorta

Fecha: 11 de mayo de 2023

Trabajo Fin de Grado

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO FIN DE GRADO

(de acuerdo con lo establecido en el artículo 8.3 del Acuerdo de 5 de marzo de 2020, del Consejo de Gobierno de la Universidad de Oviedo, por el que se aprueba el Reglamento sobre la asignatura Trabajo Fin de Grado de la Universidad de Oviedo)

D./D.^a Cecilia Millán Malnero, con DNI

DECLARO QUE:

El Trabajo Fin de Grado titulado “Microscopia confocal in vivo como técnica diagnóstica de patología corneal”, que presento para su exposición y defensa, es original y he citado debidamente todas las fuentes de información utilizadas, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía.

En Oviedo, a 11 de mayo de 2023

Firmado: Cecilia Millán Malnero

RESUMEN

El microscopio confocal supuso un avance en cuanto a resolución, capacidad de aumento y no-invasividad en el estudio de la superficie ocular. En el presente trabajo se realizó una revisión bibliográfica de los principios óptico del microscopio confocal, así como de su empleo como herramienta diagnóstica de diversas patologías corneales. De la misma forma, se revisaron tres casos clínicos de pacientes con diagnóstico de queratitis amebiana, en los cuales se visualizaron los quistes y trofozoítos en el estroma corneal y la presencia de perineuritis, considerados como elementos diagnósticos de esta patología. Por otra parte, se ha encontrado evidencia que la microscopía confocal posibilita el estudio de la distribución nerviosa en patologías con alteración de la sensibilidad corneal, en distrofias corneales, así como de los cambios posteriores a un trasplante corneal, entre otras patologías.

ABSTRACT

The confocal microscope represented an advance in terms of resolution, magnification capacity, and non-invasiveness in the study of the ocular surface. In this work, a bibliographic review of the optical principles of the confocal microscope was carried out, as well as its use as a diagnostic tool for various corneal pathologies. Similarly, three clinical cases of patients diagnosed with amoebic keratitis were reviewed, in which the cysts and trophozoites in the corneal stroma and the presence of perineuritis were observed, considered as

diagnostic elements of this pathology. On the other hand, evidence has been found that confocal microscopy enables the study of nerve distribution in pathologies with alteration of corneal sensitivity, in corneal dystrophies, as well as in changes following corneal transplantation, among other pathologies.

ÍNDICE

1. Introducción.....	7
1.1 Utilidad del microscopio confocal.....	7
1.2 Componentes y principios físicos del microscopio confocal.....	8
1.3 Descripción de aparatos comerciales.....	9
1.3.1 Microscopio confocal de barrido en tándem.....	10
1.3.2 Microscopio confocal de hendidura de barrido.....	10
1.3.3 Microscopio confocal de barrido láser.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Material y métodos	12
4. Resultados y discusión.....	13
4.1 Anatomía de una córnea sana.....	13
4.2 Aplicación en las queratitis amebianas.....	20
4.2.1 Queratitis amebiana.....	20
4.2.2 Epidemiología y fisiopatología de las queratitis amebianas.....	20
4.2.3 Manifestaciones clínicas de las queratitis amebianas.....	21
4.2.4 Visualización mediante microscopía confocal.....	22
4.3 Revisión de 3 casos del IUFV.....	23
4.4 Otras aplicaciones en patología corneal.....	31
5. Conclusiones.....	34
6. Bibliografía.....	35
7. Anexos.....	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Utilidad del microscopio confocal

El estudio de las estructuras y tejidos corneales ha sido un tema de gran interés a lo largo del desarrollo de la oftalmología. Los microscopios ópticos empleados tradicionalmente acarrearón siempre un gran problema: la iluminación general de la muestra provoca que los tejidos adyacentes reflejen esa luz y oscurezcan la imagen (1). Además, la casi total transparencia de la córnea, que al principio parecía una gran ayuda para poder emplear lámparas de hendidura y oftalmoscopios, supuso con el tiempo un problema sobreañadido, ya que esta estructura únicamente refleja en torno al 1% de la luz proyectada (2).

En 1957, con su posterior patente en 1961, Marvin Minsky creó el primer microscopio óptico confocal, basado en que el sistema de iluminación y la lente de detección se enfocasen en el mismo punto (dándole el nombre de “confocal”). Para concentrar la luz que llegaba a la muestra, Minsky colocó un agujero del tamaño de un alfiler frente a la fuente de iluminación, y posteriormente una segunda lente que proyectaba esa luz ya concentrada sobre un plano por encima de la lente de detección, que era un fotomultiplicador de bajo ruido. Así, iluminando concretamente un plano del tejido, se consiguieron imágenes mucho más nítidas, con mayor contraste y definición, ya que se eliminaron las interferencias de las regiones adyacentes.

Se lograron aumentos de hasta 600, con una resolución lateral de 1-2 *micras*, y axial de 5-10 *micras* (2,3).

Debido a esta iluminación tan concreta y limitada, también se necesitó un mecanismo de reconstrucción de imágenes, uniendo las obtenidas de los diferentes planos en una imagen global (1,2).

La introducción de la microscopía óptica confocal en la investigación oftalmológica supuso conseguir imágenes de mucha resolución, posibilitando el estudio detallado de los tejidos y estructuras corneales (llegando a visualizar detalles a nivel subcelular), así como la creación de un instrumento de estudio in-vivo rápido no invasivo, que proporciona “biopsias” de varios planos de un tejido, regulando el enfoque del microscopio (1,2,3).

1.2 Componentes y principios físicos del microscopio confocal

Los componentes básicos de la microscopía óptica confocal in vivo (IVCM, por sus siglas en inglés) son los orificios o “pinholes”, la lente objetivo y el detector (3).

- Los orificios regulan el paso de luz para conseguir la iluminación concreta de un plano. Generalmente se colocan en dos puntos: uno para disminuir la cantidad de luz enviada por el emisor, y otro para disminuir la cantidad de luz reflejada por la muestra y eliminar la que provenga de fuera del foco (4).
- La lente objetivo, que concentra la luz del emisor, previamente regulada por los orificios, hacia la muestra a estudio. Para ello, generalmente

también se necesita un espejo dicróico (5), que desvía la luz del emisor hacia la lente, reflejando selectivamente aquella con una longitud de onda determinada.

- El receptor recoge la luz emitida por la muestra y filtrada por los diversos sistemas y la transforma en una señal eléctrica, que posteriormente será procesada junto a las imágenes de los demás planos para generar una imagen completa del tejido (6).

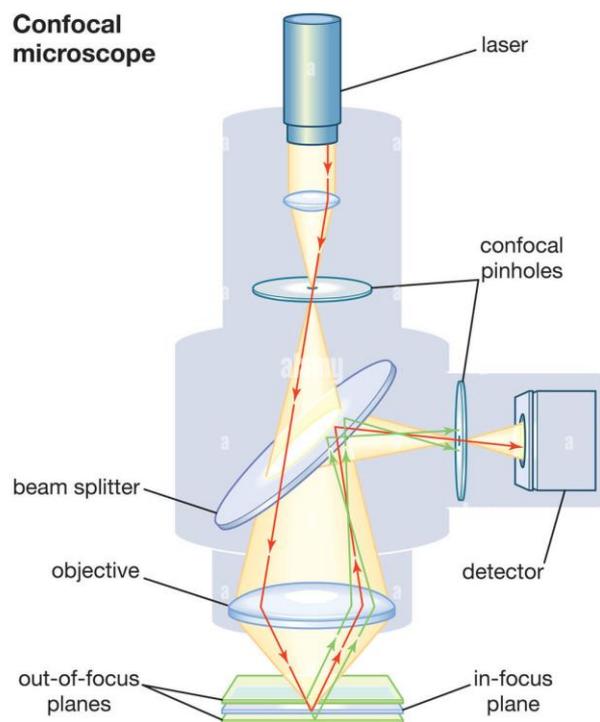


Figura 1: esquema general de un microscopio confocal

1.3 Descripción de varios aparatos comerciales

La principal diferencia entre los distintos tipos de IVCM radica en el método de escaneo de la muestra que se emplea. Los componentes básicos del instrumento, como los orificios o las lentes, suelen ser los mismos, pero la

manera en la que la iluminación se mueve a través de la muestra y consigue las imágenes de los distintos planos es lo que varía.

A. Microscopía confocal de barrido en tándem (TSCM)

Basa su método de escaneo en una versión del disco de Nipkow. Este disco contiene un gran número de agujeros diminutos, hasta 14000 agujeros de 40 a 80 micras, que regulan el paso de luz desde la fuente emisora, donde por cada agujero hay otro complementario, con el mismo diámetro y la misma distancia radial al centro del disco, pero situado justo en el punto opuesto. Así, cuando uno de los dos orificios está alineado con la fuente emisora de luz, el complementario se encuentra debajo de la lente objetivo. Al tener exactamente el mismo tamaño, se asegura que se filtra cualquier interferencia procedente de planos adyacentes. Cuando la luz ha pasado por los dos orificios complementarios, el disco gira y se obtiene la imagen de la línea de tejido paralela y adyacente, hasta completar una vuelta entera para conseguir la imagen de la muestra a estudio (2,3,6).

Salieron al mercado varios modelos con esta tecnología, como el producido por Tandem Scanning Corporation, pero ya no están disponibles.

B. Microscopía confocal de hendidura de barrido (Slit-scanning)

Esta tecnología emplea una apertura rectangular de 180 micras, que elimina haces de luz procedentes de fuera del foco y genera una hendidura de luz que

escanea toda la muestra. Así, se escanean todos los puntos a la vez y la imagen se refleja a través de una hendidura del mismo tamaño (6).

Algunos modelos comerciales Slit-Scanning disponibles en el mercado son los de Tomey Corporation, Helmut Hund o Nidek Technologies.

C. Microscopía confocal de barrido láser (LSCM)

Creada por Webb en la década de 1980, emplea un haz láser de Helio como fuente de luz de alta intensidad e introduce el uso de espejos galvanómetros, que contienen un eje rotatorio para controlar la posición del espejo, permitiéndoles rotar con mucha precisión e inclinar el haz láser sobre los ejes x e y. Posteriormente, la luz reflejada por la muestra es desviada por la lente objetivo, atraviesa los espejos galvanómetros y una apertura estenopeica ubicada frente a un detector multiplicador. Este transforma la señal luminosa en una señal eléctrica que posteriormente se reconstruye como una imagen 3D (3,6).

El modelo comercial más conocido que emplea esta tecnología láser es el Heidelberg Retina Tomograph (HRT). Se han sacado al mercado varias versiones cada vez más actualizadas del mismo. En 2002, la empresa Heidelberg colaboró con el Rostock Eye Clinic para crear el Rostock Cornea Module (RCM); este requiere de contacto entre el aparato y la córnea del paciente(6).

Nuevos modelos de IVCM son de no contacto, especialmente útiles en el estudio pacientes que no toleran el contacto; sin embargo, proporcionan una peor resolución por la falta de alineación perfecta al tejido (6).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo es describir el uso de la microscopía confocal como herramienta diagnóstica y de seguimiento en queratitis amebianas por *Acanthamoeba*.

Los objetivos secundarios son:

- Describir la etiopatogenia y el manejo de las queratitis amebianas por *Acanthamoeba*.
- Revisar el uso de la microscopía confocal en otras patologías corneales.

3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODO

Para la realización de este trabajo, se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica, tanto en inglés como en español, empleando fuentes primarias (artículos de revistas, tesis doctorales...) y secundarias (bases de datos científicas como Medline/PubMed, Scielo y Google Scholar), con fecha de última búsqueda a 20 de abril de 2023.

Las palabras claves empleadas, constituyendo los criterios de inclusión, han sido: confocal microscopy, TSCM, HRT, corneal anatomy, *Acanthamoeba* spp.,

Acanthamoeba keratitis, Acanthamoeba keratitis treatment, corneal sensibility, corneal transplant y corneal dystrophies.

Además, se revisaron 3 casos de pacientes que acudieron al Instituto Oftalmológico Fernández-Vega y que fueron diagnosticados de queratitis por Acanthamoeba, detectada mediante microscopía confocal. Los datos de identificación de los pacientes fueron anonimizados por el tutor, guardándose en todo momento la confidencialidad de la información. Para el acceso a esta información se cumplieron los requisitos establecidos por la Institución.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Anatomía de una córnea sana al microscopio confocal (HRT III)

La córnea constituye la parte anterior de la cubierta externa del ojo. Su grosor va en aumento desde el centro (0,52 mm de media) hacia la periferia (0,65 mm de media). La función principal de la córnea consiste en concentrar la luz que llega al ojo sobre un punto concreto del interior ocular, para lo cual supone el 70% del poder total de refracción del ojo (7). Además, protege al ojo frente a agresiones externas.

A nivel microscópico, se distinguen seis capas corneales, que de la más externa a la más interna son:

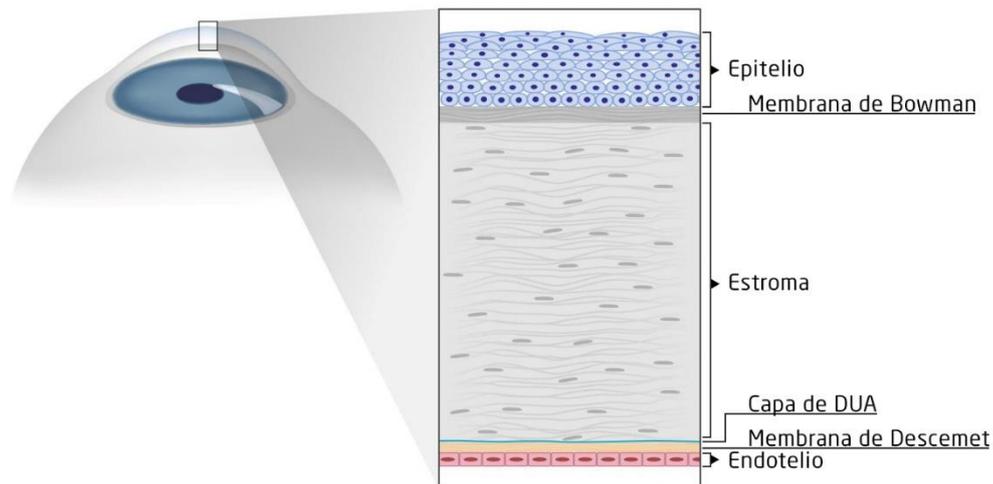


Figura 2: capas corneales

Epitelio corneal

El epitelio corneal es la capa más externa de la córnea, formado por epitelio escamoso estratificado no queratinizado. Constituye el 10% del volumen total de la córnea, con un grosor medio de 50 micras dividido en 5-7 capas celulares centrales u 8-10 capas celulares periféricas. Se pueden hallar tanto células epiteliales como células de Langerhans, linfocitos o melanocitos (7).

Con el microscopio confocal, en este caso con el HRT III de Heidelberg, pueden observarse células poligonales de distintos tamaños y grados de reflectividad, en las que se aprecia un núcleo rodeado de una banda más oscura. Éstas son las células epiteliales superficiales, con un tamaño de aproximadamente 20-30 micras de largo y 5 micras de ancho. También sería posible identificar las células del epitelio basal, que conforman de igual manera un mosaico de núcleos negros y bordes brillantes, con un diámetro algo menor (10-15 micras) (8).

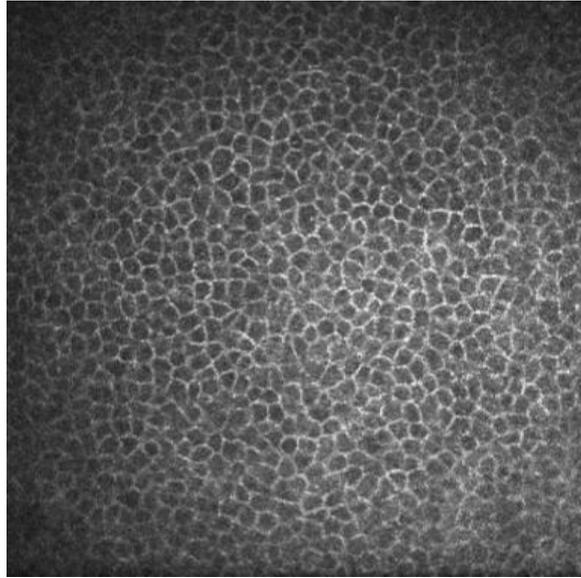


Figura 3: epitelio corneal visto al microscopio confocal

Plexo nervioso subepitelial

El plexo nervioso subepitelial o subbasal consiste en prolongaciones axonales de los nervios ciliares, procedentes del nervio trigémino (9). No es, por lo tanto, una capa como tal, pero tiene una gran importancia debido a su relación con diversas patologías corneales. Por ejemplo, empleando un microscopio confocal, se pueden estudiar los diferentes estadios de la retinopatía diabética o el grado de afectación corneal debida a queratocono (entre otras muchas más aplicaciones).

Mediante microscopía confocal, este plexo se observa como una serie de líneas agudas y brillantes con un grado homogéneo de reflectividad (8).

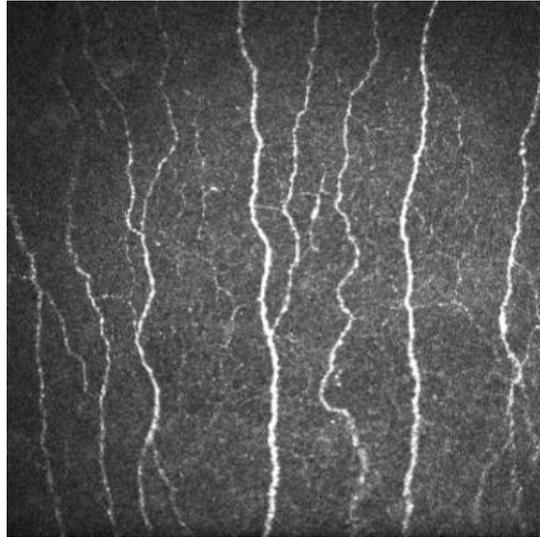


Figura 4: plexo nervioso sub-basal visto al microscopio confocal

Membrana de Bowman

La membrana de Bowman se sitúa entre el plexo nervioso subbasal y el estroma corneal, y está formada principalmente por fibras de colágeno, sustancia fundamental y células basales procedentes del epitelio. La sustancia fundamental, a su vez, se conforma de mucoproteínas bioquímicamente semejantes a las del estroma corneal. Además, una particularidad de las células de esta membrana es su ausencia de capacidad de regeneración, por lo que ante una agresión aparecerán opacidades permanentes (7).

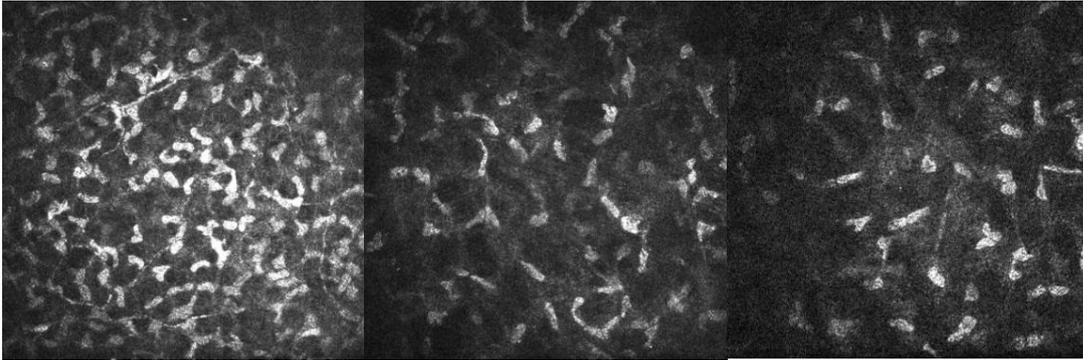
Vista a través del microscopio confocal, esta capa aparece homogénea y amorfa. Se han llegado a observar las células basales epiteliales, cuyo diámetro ronda las 15 micras, con aspecto de corpúsculo y distribuciones variables (individuales, configuradas en red...) (8).

Estroma corneal

El estroma corneal es la capa más abundante de la córnea, constituyendo cerca del 90% de su espesor total. Se compone fundamentalmente de agua (78%), sustancia fundamental, células estromales (principalmente queratocitos) y fibras de colágeno. Estas últimas se disponen en láminas paralelas entre sí y la superficie corneal, lo cual otorga transparencia a la córnea. Cuando el estroma sufre una lesión, los queratocitos se convierten en fibroblastos, productores de un colágeno que se dispone de forma desorganizada, perdiendo la transparencia del órgano (7).

Mediante el microscopio confocal podemos localizar fácilmente los núcleos de los queratocitos, aunque el colágeno no es visible mediante esta técnica.

Debido a la forma de los queratocitos, se distinguen tres partes: el estroma anterior, donde los núcleos de los mismos son redondos sobre un fondo oscuro; el estroma medio, en el que los queratocitos presentan una forma más ovalada; y el estroma posterior, donde aparecen más alargados. La densidad de queratocitos desciende cuanto más nos acercamos hacia el interior del estroma, aunque existe un aumento importante cerca de la membrana de Descemet. En el estroma anterior y medio es posible visualizar fibras nerviosas procedentes del plexo corneal profundo, siendo de 3 a 5 veces más gruesas que las fibras del plexo subepitelial (8,10).



Figuras 5, 6 y 7: estroma anterior, medio y posterior vistos al microscopio confocal

Capa de DUA

Esta capa, situada entre la parte más profunda del estroma corneal y la membrana de Descemet, ha sido recientemente descrita, gracias a casos de pacientes con edema resistente ubicado en esta localización. Esta porción corneal está constituida por 5-8 láminas finas de colágeno tipo 1, gran cantidad de colágeno tipo 6, células trabeculares y ningún o muy pocos queratocitos. Además, se ha demostrado que es el núcleo de unión de fibras de elastina corneales (11).

Así, está cobrando especial importancia en el estudio de diversas patologías corneales y de su abordaje mediante queratoplastia lamelar (11).

Membrana de Descemet

La membrana de Descemet es una membrana basal producida por el endotelio corneal, que se desprende del mismo y se regenera con facilidad, al contrario de lo que ocurre con la membrana de Bowman (7).

Esta capa es únicamente visible mediante microscopía confocal en ancianos o sujetos afectados de ciertas patologías, como desprendimiento de membrana o

glaucoma congénito primario, en los que se vería como una capa acelular entre el estroma posterior y el endotelio (8,10) .

Endotelio corneal

El endotelio corneal, porción más interna de la córnea, está formado por una única capa de células con morfología hexagonal, cuyas uniones intercelulares dificultan el paso de sustancias desde el exterior hacia el interior del ojo. Estas células endoteliales se van aplanando con el paso del tiempo, a la vez que disminuye la densidad celular (7).

Mediante microscopía confocal, esta capa aparece como una red de células hexagonales, con citoplasmas brillantes y bordes oscuros (los núcleos no son visibles) (10).

Debido a esa disminución de densidad celular, el microscopio confocal es también una herramienta muy útil para valorar el grado de pérdida (8).

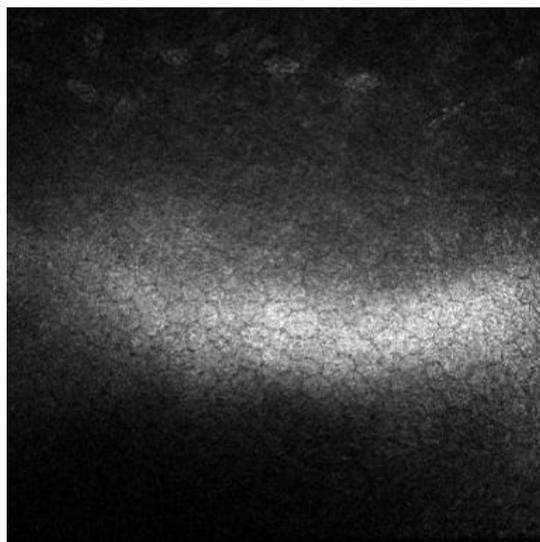


Figura 8: endotelio corneal al microscopio confocal

4.2 Aplicación de la microscopía confocal en el estudio de infecciones corneales amebianas

4.2.1 Queratitis amebiana

Las infecciones corneales amebianas, también denominadas queratitis amebianas, son entidades de gran relevancia clínica debido a la incidencia en aumento que han ido presentando en las últimas décadas.

Su principal organismo causante es la Acanthamoeba, una ameba de vida libre asociada a enfermedades en humanos. Este tipo de organismos abundan en la naturaleza, debido a su capacidad de supervivencia en una amplia variedad de hábitats, ya que requieren poco alimento y son capaces de formar quistes, otorgándoles aún más resistencia. El género Acanthamoeba ha sido aislado en tierra, polvo, aire y diversos tipos de agua. Viven como microorganismos de vida libre en la naturaleza y pueden invadir a un huésped y comportarse como parásitos dentro del mismo (12).

4.2.2 Epidemiología y fisiopatología de la queratitis amebiana

El principal factor de riesgo de la queratitis por Acanthamoeba es el uso de lentes de contacto, relacionándose con el 85% de los casos. Sin embargo, la incidencia es de 1 caso por cada 33.000 portadores/año, lo cual indica que este microorganismo es relativamente poco virulento y que el epitelio corneal constituye una buena medida de protección frente al mismo (13).

Dentro del uso de lentes de contacto, las prácticas que suponen un mayor riesgo son el empleo de lentes de hidrogel y de soluciones de limpieza caseras, la mala desinfección y su utilización en piscinas (14).

Otros factores de riesgo para esta queratitis son los traumatismos corneales y el contacto con agua templada o cuerpos extraños (13).

En portadores de lentes de contacto, el acceso del microorganismo se facilita por microtraumatismos repetidos, mientras que en casos con antecedentes traumáticos, el acceso puede ser directo. Aunque no se ha podido describir aún con certeza, parece que el papel de los macrófagos conjuntivales es muy relevante, ya que el descenso en su número se relaciona con una mayor gravedad de la infección, un inicio más temprano y una evolución más larga (13).

4.2.3 Manifestaciones clínicas de la queratitis amebiana

En un primer momento, la infección amebiana se limita al epitelio corneal, apareciendo enrojecimiento, dolor de intensidad variable, fotofobia y lagrimeo. Si el tratamiento se aplaza y la infección avanza hacia el estroma corneal, aparecen ulceraciones, infiltrados anulares compuestos por neutrófilos (lo cual es el signo más característico de este cuadro, aunque no es patognomónico), placas endoteliales y uveítis anterior. En casos especialmente graves pueden llegar a producirse abscesos, glaucoma o sobreinfección bacteriana (13).

4.2.4 Visualización de la queratitis amebiana mediante microscopía confocal

La microscopía confocal, como ya se mencionó anteriormente, presenta la ventaja de poder analizar individualmente cada plano corneal in vivo. Así, supone una herramienta diagnóstica con una alta sensibilidad y especificidad (15), complementaria al cultivo corneal (incluso, en ciertos casos, el cultivo puede dar un resultado falso negativo que se desmiente gracias al empleo del microscopio confocal). Además, facilita el seguimiento de los pacientes afectos de queratitis amebiana, ya que permite monitorizar la respuesta y duración del tratamiento (15).

Aun así, es importante tener en cuenta ciertos aspectos que pueden jugar como desventajas a la hora de emplear esta herramienta: la interpretación de las imágenes obtenidas requiere de una alta experiencia por parte del observador, ya que la incorrecta interpretación de los hallazgos puede dar lugar a falsos positivos y sobretreatmento; además, es importante la colaboración del paciente a la hora de mantenerse quieto durante el examen (15).

Los principales hallazgos característicos de la queratitis amebiana y observados a través de microscopía confocal son:

- Quistes de *Acanthamoeba* spp.: cuerpos redondos y muy reflectantes dispersos entre las células corneales, con un tamaño de unas 10-25 micras. Este hallazgo supone un criterio diagnóstico de queratitis amebiana en caso de cultivo negativo (15).

- Trofozoitos: estructuras ovaladas o irregulares con extensiones periféricas, con un tamaño superior a 100 micras. También suponen un criterio diagnóstico de queratitis amebiana (15).
- Perineuritis radial: los nervios corneales se engruesan y aparecen rodeados por un halo oscuro (incluso, a veces, por cuerpos brillantes, que corresponden a los trofozoítos) (15).

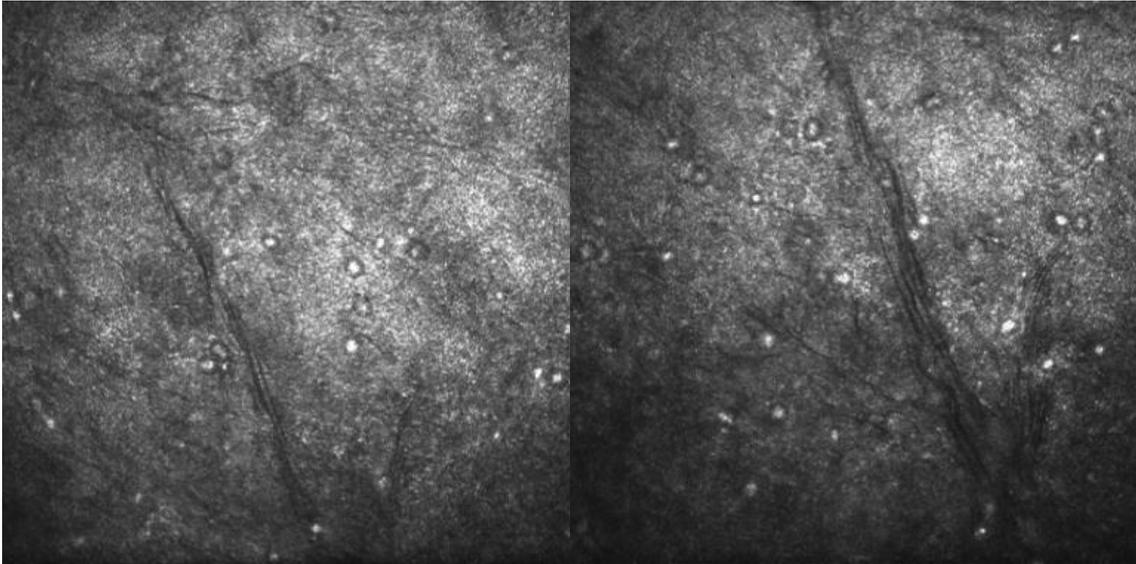
4.3 Revisión de 3 casos de pacientes diagnosticados de queratitis amebiana en el IUFV mediante microscopía confocal: diagnóstico, tratamiento y seguimiento

Paciente 1

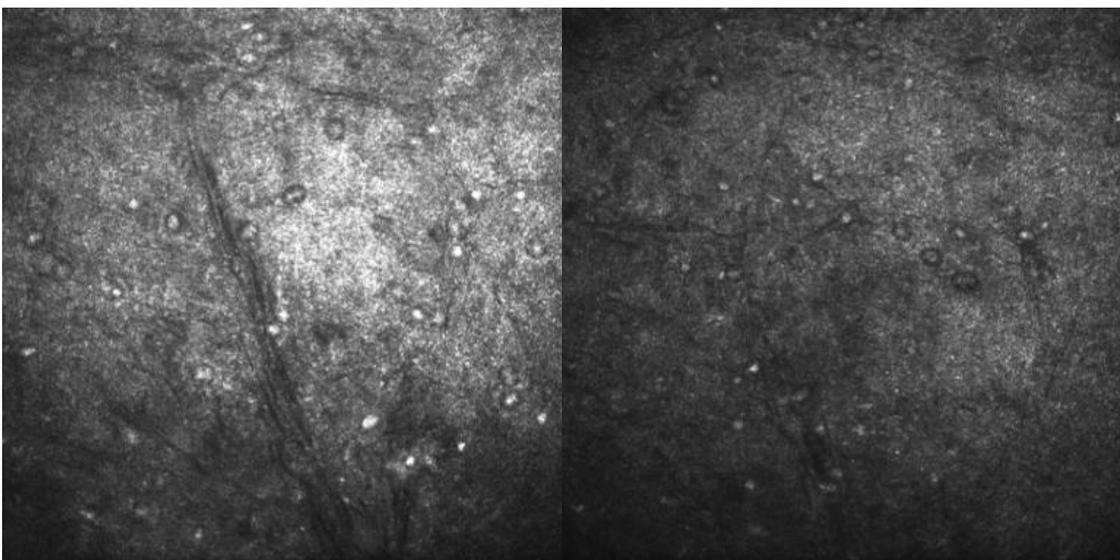
Las siguientes imágenes corresponden a uno de los ojos de un paciente portador de lentes de contacto, con un cuadro de pérdida de visión, dolor ocular y fotofobia de 72-96 horas de evolución.

En la observación mediante lámpara de hendidura se podían observar signos compatibles con queratoconjuntivitis secundaria a un agente infeccioso.

El diagnóstico de queratitis amebiana fue confirmado mediante microscopía confocal, obteniendo las siguientes imágenes en la primera visita:



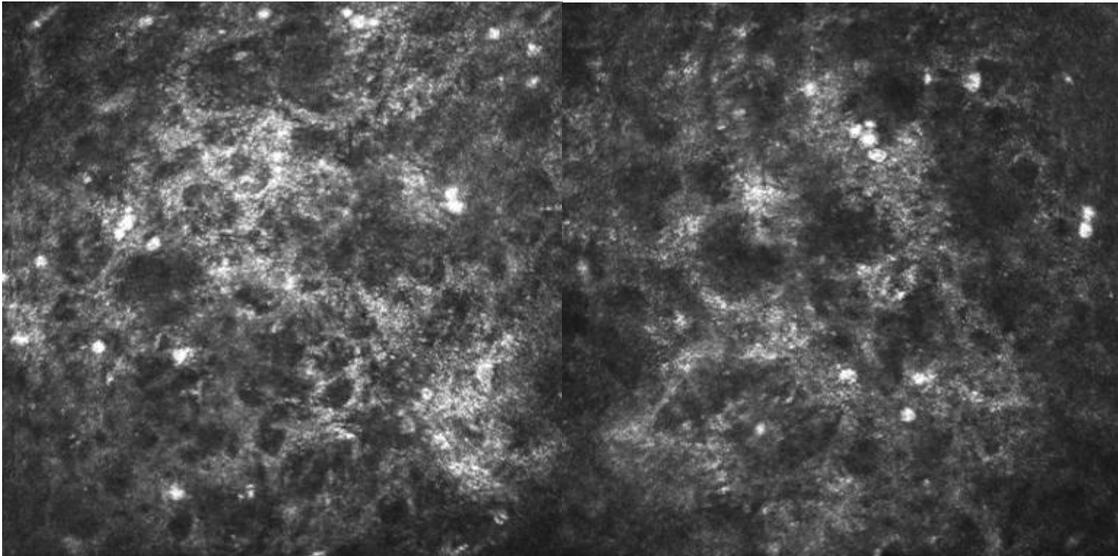
Figuras 9 y 10: imágenes diagnósticas de queratitis amebiana obtenidas mediante microscopía confocal



Figuras 11 y 12: imágenes diagnósticas de queratitis amebiana obtenidas mediante microscopía confocal

En las imágenes 9-12 pueden observarse figuras redondeadas, rodeadas por una pared externa hiporrefringente, repartidas por todo el plano a estudio (membrana de Bowman), compatibles con quistes de ameba. Este hallazgo, acompañado de clínica compatible, sería suficiente para determinar el diagnóstico de queratitis amebiana, incluso en ausencia de cultivo positivo.

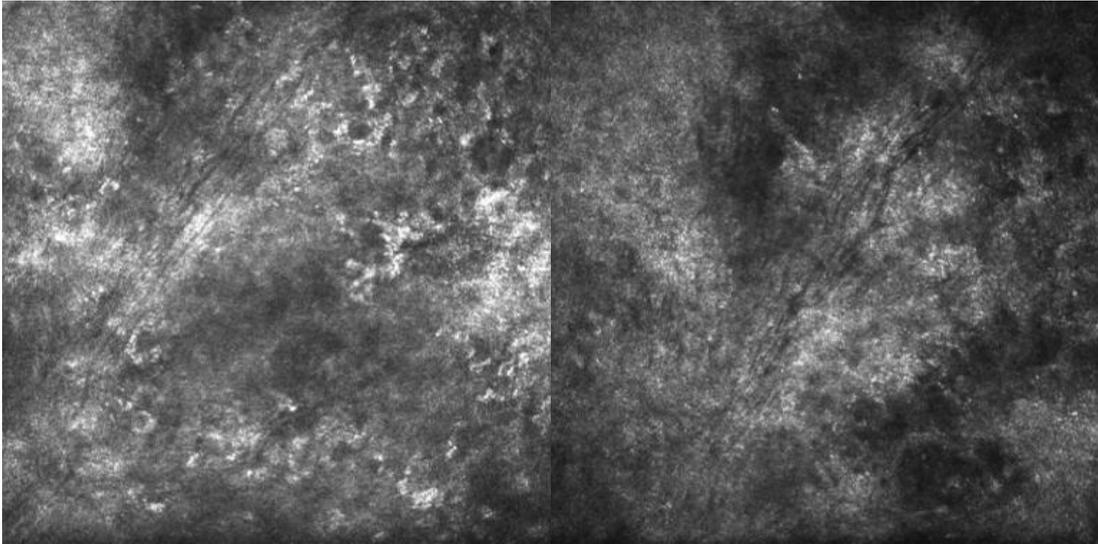
Una vez instaurado el tratamiento oportuno, que en el caso de las queratitis por *Acanthamoeba* spp. suele basarse en diamidinas (clorhexidina) y biguanidas (propamidina y hexamidina) tópicas (14), las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en el seguimiento del paciente 1, a los dos meses de la visita inicial, fueron las siguientes:



Figuras 13 y 14: imágenes de seguimiento de la queratitis por Acanthamoeba spp. obtenidas mediante microscopía confocal a los dos meses del diagnóstico.

En las figuras 13 y 14, aunque aún siguen observándose quistes de *Acanthamoeba*, éstos han disminuido en número y están más dispersos.

Finalmente, una vez resuelto el caso 3 meses más tarde, las imágenes obtenidas con el microscopio confocal del paciente 1 fueron las siguientes:

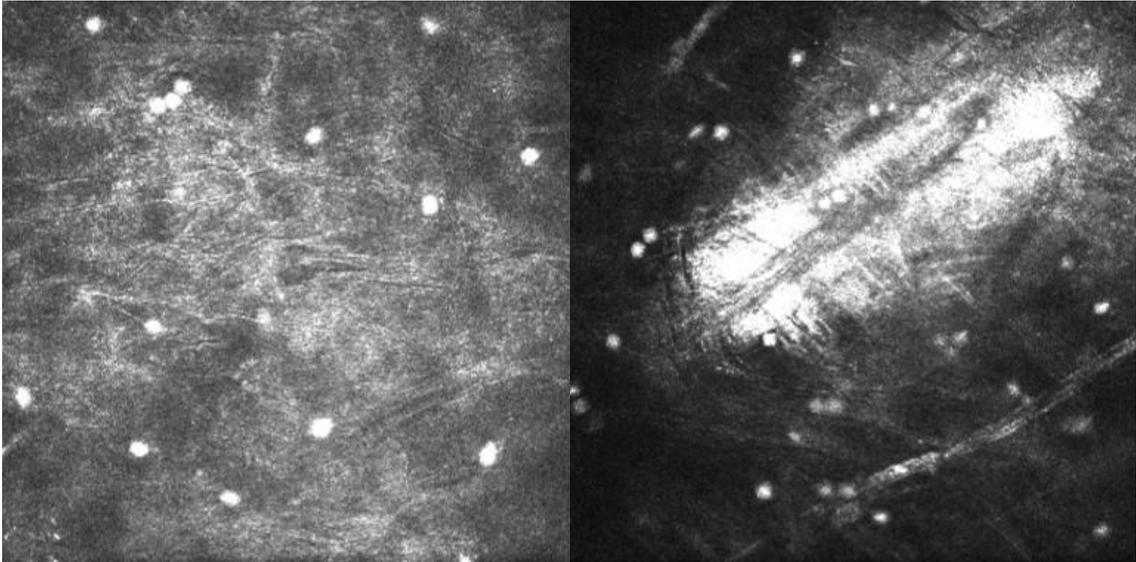


Figuras 15 y 16: resolución de la queratitis amebiana obtenidas mediante microscopía confocal 3 meses después del inicio del cuadro

Las estructuras tisulares corneales vuelven a la normalidad, con ausencia de quistes amebianos.

Paciente 2

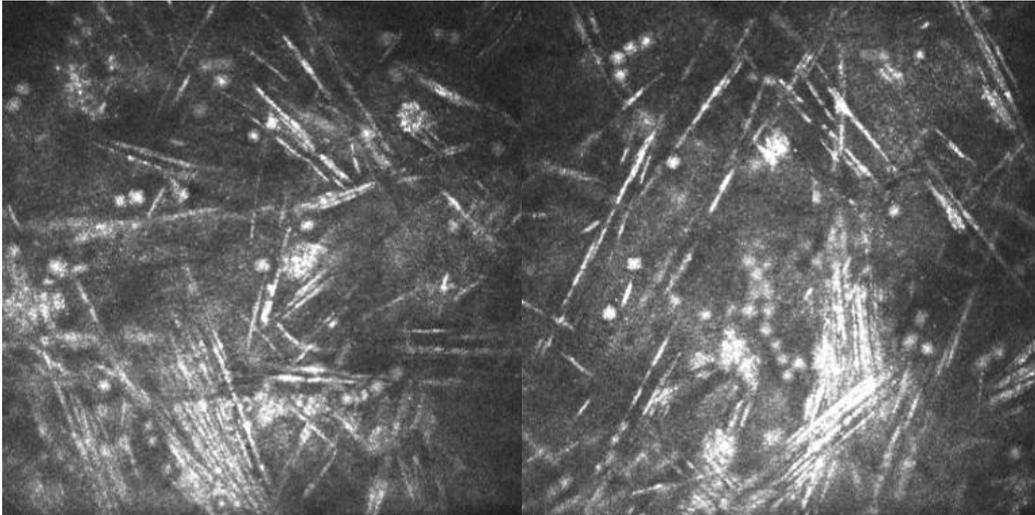
Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en el momento del diagnóstico fueron las siguientes:



Figuras 17 y 18: imágenes diagnósticas de queratitis amebiana obtenidas mediante microscopía confocal

En las figuras 17 y 18 pueden observarse, al igual que en el paciente 1, imágenes redondeadas e hiporrefringentes de unas 20-25 micras de tamaño, por todo el plano enfocado (estroma anterior). Además, en la figura 18 se visualiza una formación rectilínea, también a nivel del estroma anterior, compatible con fibrosis estromal y cicatrización corneal.

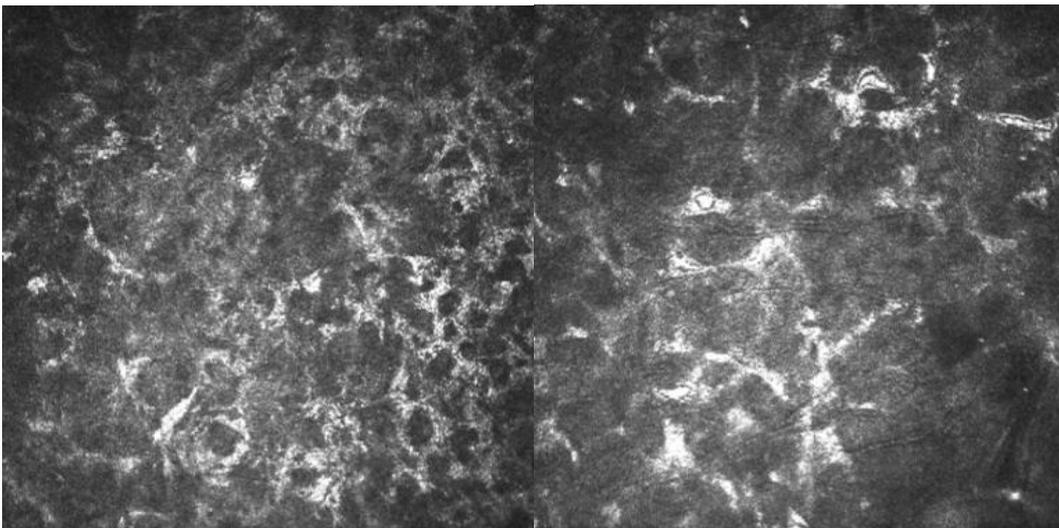
Las imágenes obtenidas en el seguimiento del paciente 2, tres meses tras instaurar el tratamiento, fueron las siguientes:



Figuras 19 y 20: seguimiento de la queratitis amebiana con microscopía confocal tres meses después de instaurar el tratamiento

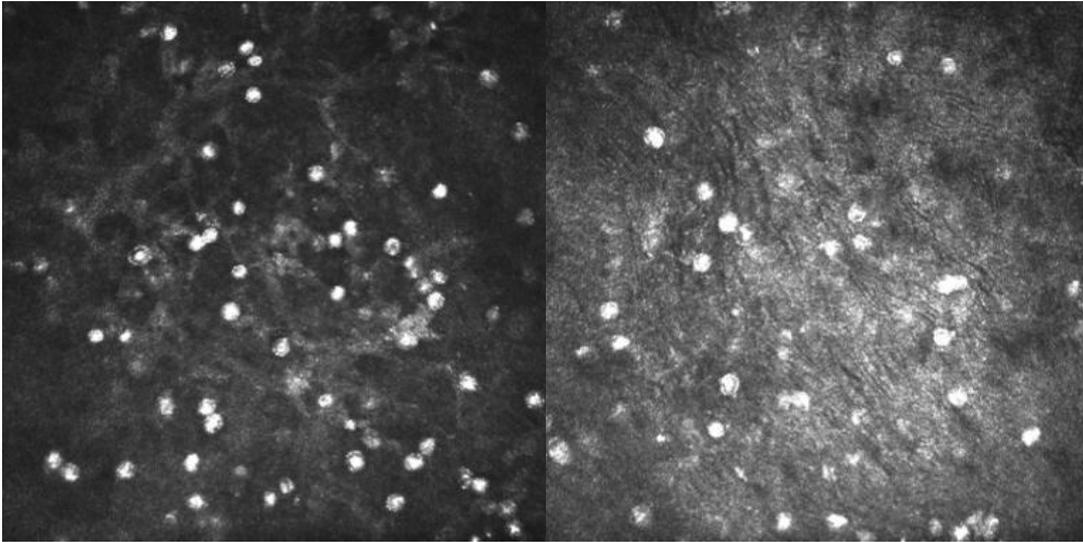
Al igual que en el caso del paciente 1, en las visitas de seguimiento del paciente 2 el cuadro infeccioso no estaba completamente resuelto, pudiendo observarse aún alguna formación amebiana y señales de cicatrización.

Por último, una vez resuelto completamente el cuadro, 5 meses más tarde, el estroma corneal volvió a la normalidad, obteniéndose las siguientes imágenes:



Figuras 21 y 22: resolución de una queratitis amebiana vista al microscopio confocal 5 meses después de su inicio

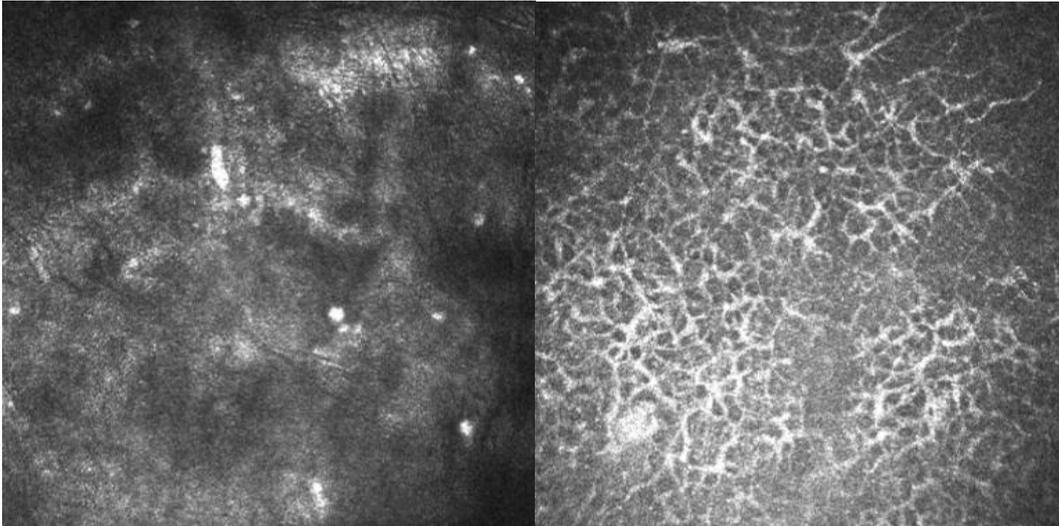
Paciente 3



Figuras 23 y 24: imágenes diagnósticas de queratitis amebiana obtenidas mediante microscopía confocal

Al igual que en los dos pacientes anteriores, en este paciente 3 se observaron cuerpos redondeados dispersos por el estroma anterior, compatibles con quistes amebianos por una queratitis.

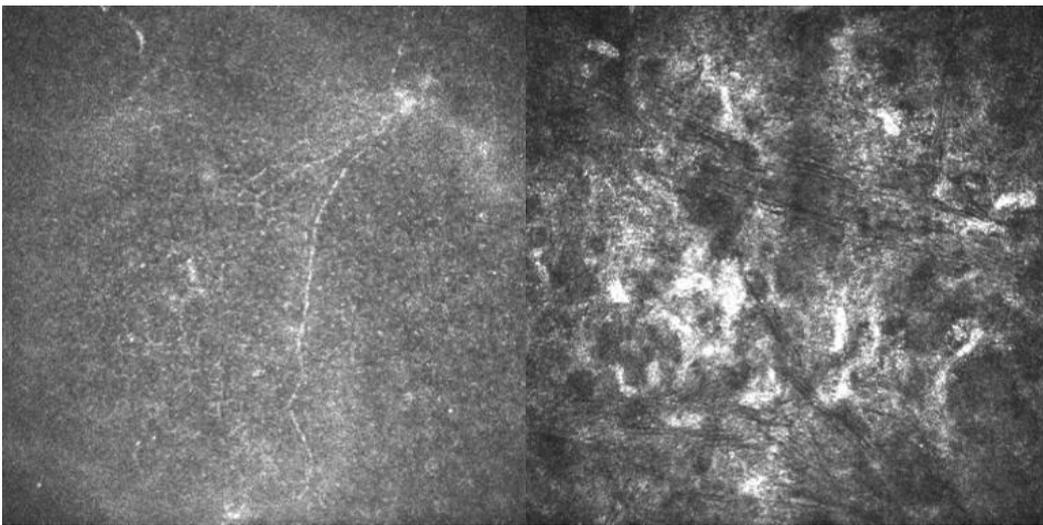
Habiendo pautado el tratamiento anteriormente descrito, las imágenes obtenidas en la visita de seguimiento, dos meses después, fueron las siguientes:



Figuras 25 y 26: imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en el seguimiento de una queratitis amebiana, dos meses después de su diagnóstico

Aún habiendo disminuido considerablemente en número, estos quistes amebianos siguieron siendo visibles durante el seguimiento.

En la figura 26 aparecen unas estructuras dendríticas, compatibles con células de Langerhans, que indican la presencia de inflamación a nivel corneal, secundaria al proceso infeccioso.



Figuras 27 y 28: imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en la resolución de una queratitis amebiana, tres meses después de su diagnóstico

Finalmente, en la figura 27 se aprecia la resolución completa del cuadro infeccioso, sin presencia de formaciones sugestivas de quistes amebianos. Además, en la figura 28 pueden observarse cambios sugestivos del inicio del proceso de reinervación corneal a nivel subepitelial. Ambas imágenes fueron tomadas 3 meses después del diagnóstico de la queratitis.

4.4 Otras aplicaciones de la microscopía confocal en la patología corneal

Gracias a todas las ventajas anteriormente descritas, la microscopía confocal es una herramienta diagnóstica cada vez más empleada en el manejo de una gran variedad de patologías corneales.

Algunos ejemplos son los siguientes:

Cambios en la sensibilidad corneal

La sensibilidad corneal puede verse afectada de varias maneras. La primera es perdiendo la inervación central, lo cual provoca una disminución en la defensa frente a agresiones externas y en la producción de secreción lagrimal (que dará lugar a ojo seco) (16). La segunda es mediante el fenómeno de sensibilización, el cual provoca que el paciente sienta un dolor corneal constante, incluso ante la ausencia de estímulo doloroso (16).

En una córnea sana, los nervios corneales pierden la mielina al adentrarse en profundidad (para contribuir a la transparencia del órgano) y se distribuyen de forma radial, desplazándose en sentido horario hacia una zona inferonasal debido a la fuerza del parpadeo (16). Los cambios en esta estructura nerviosa

conducen a la alteración de la sensibilidad radial, y son objetivables mediante microscopía confocal.

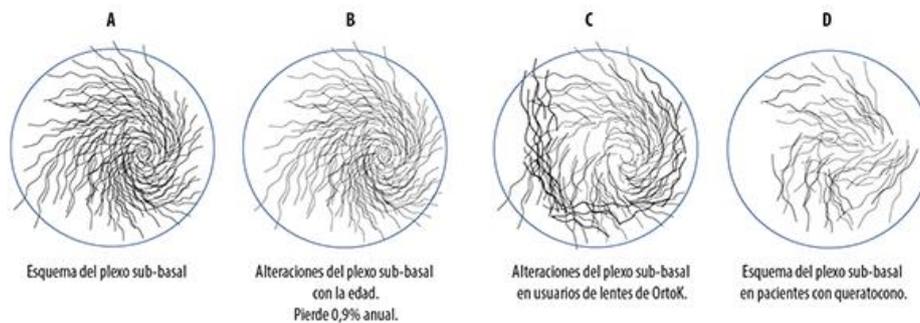


Figura 29: alteraciones de la distribución nerviosa corneal en distintas situaciones

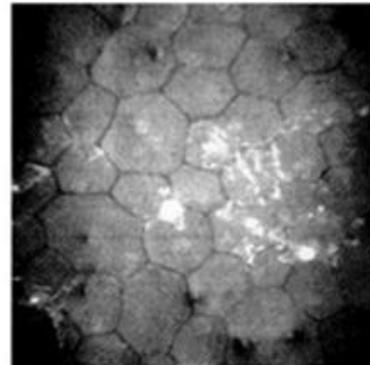
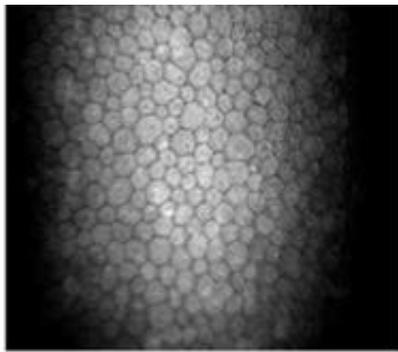
Un ejemplo concreto de cambios en el plexo nervioso corneal después de una patología es el que estudió en el artículo “*Small fiber neuropathy in the cornea of Covid-19 patients associated with the generation of ocular surface disease*” (17). Esta publicación objetivó, mediante microscopía confocal, la aparición de “axones en collar” (dilataciones o ensanchamientos axonales secundarios a un daño nervioso) después de una infección por Covid-19 en pacientes previamente sanos. También se describió la presencia de neuromas, sobre todo en pacientes con sintomatología severa, que provocaron pérdida de sensibilidad con sensación constante de dolor (17).

Evolución de un trasplante corneal

El endotelio corneal es la capa más importante a la hora de evaluar la salud de la córnea trasplantada, debido a la importancia de sus funciones (impedir el paso de agentes extraños al interior del ojo o mantener la hidratación tisular, entre otras) (18). Gracias a la microscopía confocal, se pudo observar que un

grupo mayoritario de pacientes trasplantados presentaban adelgazamiento de este endotelio corneal, sin representar por ello un fallo del tratamiento (debido a que las células endoteliales aumentan su tamaño en compensación a la pérdida en su densidad) (18).

Además, la microscopía confocal es un instrumento de gran utilidad a la hora de realizar un seguimiento sobre el desarrollo de la inervación corneal tras el trasplante del órgano, ya que se ha documentado que los plexos nerviosos corneales tardan en aparecer unos meses tras el procedimiento (18).



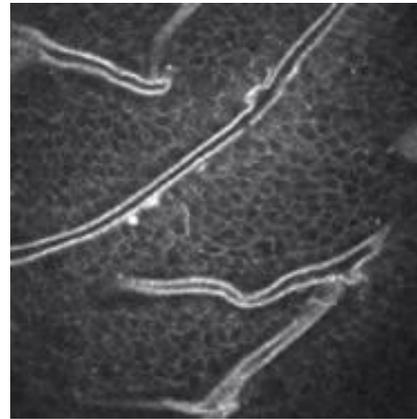
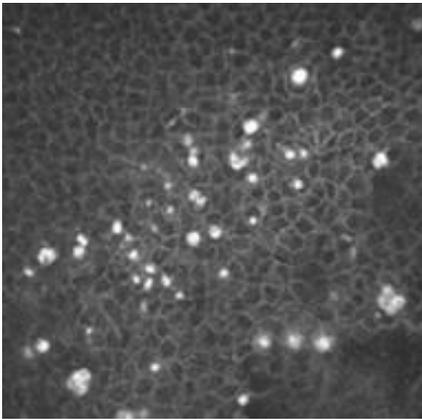
Figuras 30 y 31: endotelio corneal normal vs. endotelio corneal post-trasplante

Diagnóstico de distrofias corneales

Las distrofias corneales son un conjunto de enfermedades hereditarias, habitualmente bilaterales y de lenta progresión (19) que consisten en la acumulación de material extraño en capas variables de la córnea, causando el deterioro de su función.

La microscopía confocal ha supuesto una revolución en el diagnóstico y, sobre todo, clasificación de estas distrofias gracias a su capacidad de análisis individual de cada capa corneal. Así, permite distinguir entre distrofias que

afectan a la membrana basal (en las que parece que la misma está duplicada, con gotas y estructuras anulares) (19), a la membrana de Bowman (con depósitos hiperreflectantes que van sustituyendo a esta capa) (19), etc.



Figuras 32 y 33: distrofia corneal de Meesmann y de la membrana basal respectivamente

5. CONCLUSIONES

La microscopía confocal es una herramienta extremadamente útil en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con diversas patologías de la superficie ocular y córnea.

Permite observar in vivo la inervación corneal, así como su densidad, distribución y características concretas.

También facilita y orienta el diagnóstico de patología corneal infecciosa, gracias a la visualización directa de cuerpos infecciosos, cicatrices o reacciones tisulares defensivas.

Además de sus numerosas aplicaciones, la microscopía confocal presenta la enorme ventaja de ser un método diagnóstico comparable en cuanto a

sensibilidad y especificidad a una biopsia tisular, pero con la diferencia de ser una prueba no invasiva y en vivo, eliminando la necesidad de extraer una muestra del tejido a estudio. Así, permite el estudio de la superficie ocular y córnea en profundidad y con alta calidad de detalles sin suponer ninguna agresión a las mismas.

Su aplicación en numerosas patologías está en aumento, pudiendo llegar a convertirse en el método diagnóstico Gold Standard de muchas.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Javaloy J, Vidal MT, Ruiz-Moreno JM, Alió JL. Microscopía confocal de la córnea en la cirugía fotorrefractiva. Arch Soc Esp Oftalmol [Internet]. 2005 Sept [consultado el 5 de marzo de 2023]; 80(9):497–509. Disponible en:
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912005000900003
2. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M. In vivo confocal microscopy of the human cornea. Br J Ophthalmol [Internet]. 2003 Feb [consultado 28 de febrero de 2023]; 87(2):225–36. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1136/bjo.87.2.225>
3. Elliott AD. Confocal microscopy: Principles and modern practices. Curr Protoc Cytom [Internet]. 2019 Dic [consultado 28 de febrero de 2023]; 92(1):e68. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1002/cpcy.68>

4. Cabrera VO, Martínez RR, Correa FÁ, Díaz PA. Uso de la microscopía confocal in vivo en el diagnóstico de distrofias corneales. Rev cienc médicas Pinar Río [Internet]. 2016 [consultado el 5 de marzo de 2023]; 20(6):769–78. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69844>
5. Jhonaru P. Microscopio Óptico [Internet]. Microscopio Óptico; 2020 May [consultado el 1 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://microscopiooptico.org/tipos-de-microscopios/confocal/>
6. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. Clin Experiment Ophthalmol [Internet]. 2009 Enero [consultado 28 de febrero de 2023]; 37(1):100–17. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19338608>
7. Candela Vidal, M Teresa. Estudio sobre los parámetros que afectan a la calidad de la cirugía en pacientes intervenidos de queratomileusis in situ asistida mediante láser excímer (LASIK) [tesis en internet]. Alicante: Universidad Miguel Hernández; 2003 [consultado el 15 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://dspace.umh.es/bitstream/11000/709/24/Tesis%20M%C2%AA%20Teresa%20Vidal%20Candela%2001%20Portada%20Tesis%20MTV.pdf>
8. Cañadas P, Alberquilla García-Velasco M, Hernández Verdejo JL, Teus MA. Update on corneal confocal microscopy imaging. Diagnostics (Basel) [Internet]. 2022 Dic [consultado el 15 de

marzo de 2023]; 13(1):46. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36611338>

9. Ponce TY, Mokey CMO, Yang T, Espinosa GA. Estudio del plexo nervioso sub-basal epitelial en pacientes diabéticos mediante microscopía confocal corneal. Rev Acta Médica [Internet]. 2017 [consultado el 15 de marzo de 2023]; 18(1). Disponible en:
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=75791>
10. Gómez CZ, Fernández GK, Pérez TA, Márquez VS, Jareño OM, Cuevas RJ. Confocal microscopy results of one hundred healthy eye corneas. Rev Cuba Oftalmol [Internet]. 2012 [consultado el 15 de marzo de 2023]; 25(1). Disponible en:
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=35095>
11. Dua HS, Said DG. Clinical evidence of the pre-Descemets layer (Dua's layer) in corneal pathology. EYE [Internet]. 2016 Abril [consultado el 20 de abril de 2023]. 30(8):1144-5. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1038/eye.2016.62>
12. Castrillón JC, Orozco LP. Acanthamoeba spp. as opportunistic pathogens parasites. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2013 abril [consultado el 18 de marzo de 2023]; 30(2). Disponible en:
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000200005
13. Pérez-Irízabal J, Martínez I, Isasa P, Barrón J. Queratitis por Acanthamoeba. Rev enfermedades infecciosas y microbiología

- clínica [Internet]. 2006 Oct [consultado el 18 de marzo de 2023].
24(1):1-57. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-sumario-vol-24-num-s1-X0213005X06X40646>
14. Espinosa Barberi G, Miranda Fernández S, Tándón Cárdenes L. Nuevos tratamientos para la queratitis por Acanthamoeba: revisión de casos clínicos. Archivo de la Sociedad Canaria de Oftalmología [Internet]. 2017 [consultado el 18 de marzo de 2023]. 28:110-115. Disponible en: <https://sociedadcanariadeoftalmologia.com/wp-content/revista/revista-28/28sco19.pdf>
15. Álvarez Marín J, Rodríguez Gil R, Afonso Rodríguez A, Abreu Reyes P. Application of confocal microscopy in the diagnosis of Acanthamoeba keratitis. Archivo de la Sociedad Canaria de Oftalmología [Internet]. 2011 [consultado el 20 de abril de 2023]. 22:14-19. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3667644>
16. Juncal Romani, Sandra. Microscopía confocal in vivo en condiciones de stress mecánico: tratamiento con lentes Orto-K. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela (USC). 2022 [consultado el 20 de abril de 2023]. Disponible en: <https://dspace.usc.es/xmlui/handle/10347/29367>
17. Barros A, Queiruga-Piñeiro J, Lozano-Sanroma J, Alcalde I, Gallar J, Fernández-Vega Cueto L, Alfonso J, Quirós L, Merayo-Llodes J. Small fiber neuropathy in the cornea of Covid-19 patients

associated with the generation of ocular surface disease. Ocul Surf [Internet]. 2022;23:40-8 [consultado el 11 de mayo de 2023].

Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542012421001270?via%3DiHub#sec4>

18. Marrero Rodríguez E, Sánchez Vega O, Rosa Barrera B, Milán González N, Arias Domínguez M. Aplicación de la microscopía confocal en pacientes con trasplante de córnea. Medisan [Internet]. 2014 Nov [consultado el 20 de abril de 2023]. 18(11): 1537-43. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192014001100008

19. Cabrera Ventura O, Martínez Rodríguez R, Correa Fernández Á, Díaz Pérez A. Uso de la microscopía confocal in vivo en el diagnóstico de distrofias corneales. Rev Ciencias Médicas [Internet]. 2016 Dic [consultado el 20 de abril de 2023]. 20(6):103-112. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942016000600015&lng=es.

20. Microscopio Confocal de Barrido Láser - CONICET Rosario [Internet]. [Consultado el 1 de marzo de 2023]. Disponible en:

[https://www.rosario-conicet.gov.ar/equipamiento/centrodecomputosdealtorendimiento-](https://www.rosario-conicet.gov.ar/equipamiento/centrodecomputosdealtorendimiento-2)

[2](https://www.rosario-conicet.gov.ar/equipamiento/centrodecomputosdealtorendimiento-2)

21. Maffrand R, Pizzi R, Páez Rearte M, Tomas A, Maffrand C, Pizzi HL. Queratitis por Acanthamoeba. ¿Infección ocular emergente? Reporte de casos. Rev Salud Pública [Internet]. 2019 abril [consultado el 18 de marzo de 2023]. 23(1):41-7. Disponible en: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/RSD/article/view/21129>

7. ANEXOS

7.1 Figuras

Figura 1: Encyclopaedia Britannica Inc. Microscopio confocal [recurso de aprendizaje]. Universal Imagen Group North America; 2010 [consultado el 8 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.alamy.es/foto-microscopio-confocal-84972754.html>

Figura 2: Capas de la córnea [recurso de aprendizaje]. Badajoz: Clínica Sánchez Trancón [consultado el 20 de abril de 2023]. Disponible en: <https://vistasancheztrancon.com/cornea-que-es/>

Las figuras 3-28 fueron obtenidas de pacientes reales que acudieron al Instituto Universitario Fernández-Vega, preservando su anonimato y confidencialidad.

Figura 29: Esquema del plexo nervioso sub-basal [recurso de aprendizaje]. Argentina: Centro de Ojos Quilmes [consultado el 10 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://revistaoce.com/index.php/revista/article/download/32/56/193>

Figuras 30 y 31: Endotelio normal y post-trasplante [recurso de aprendizaje]. Ciudad de la Habana: Rev Cubana Oftalmología [consultado el 10 de mayo de

2023]. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21762009000100006

Figuras 32 y 33: Distrofias corneales [recurso de aprendizaje]. Pinar del Río:

Rev Ciencias Médicas [consultado el 10 de mayo de 2023]. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942016000600015)

[31942016000600015](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942016000600015)