

Título del Proyecto:

Capacidad diagnóstica de un nuevo método de medición de los niveles de hemoglobina en la cabeza del nervio óptico en pacientes con esclerosis múltiple.

Alumno: M^a Pilar Bambó Rubio

Directores: Elena García Martín/ Susana Pérez Olivan

Servicio Oftalmología (Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza)



ABREVIATURAS

AV: Agudeza visual.

CCI: Coeficiente de correlación intraclase.

CFNR: Capa de fibras nerviosas de la retina.

COV: Coeficiente de variación.

DE: Desviación estándar.

DO: Disco óptico.

EM: Esclerosis múltiple.

Hb: Hemoglobina.

OCT: Tomografía de coherencia óptica.

PIO: Presión intraocular.



INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	Página 4
2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	Página 7
3. HIPÓTESIS.....	Página 10
4. OBJETIVOS.....	Página 11
5. METODOLOGÍA.....	Página 11
5.1. Sujetos de estudio.....	Página 11
5.2. Protocolo exploratorio.....	Página 12
5.3. Recogida y análisis de datos.....	Página 17
6. RESULTADOS.....	Página 18
7. DISCUSIÓN.....	Página 23
8. CONCLUSIONES.....	Página 25
9. BIBLIOGRAFÍA.....	Página 25

1. INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante y degenerativa que afecta al sistema nervioso central. Los doctores Cruveilhier y Carswell la describieron por primera vez entre 1835 y 1838, hace más de 130 años.

Según datos publicados en 2009 por la Organización Mundial de la Salud en colaboración con la Federación Internacional de Esclerosis Múltiple (Atlas of Sclerosis Multiple Database), esta entidad afecta preferentemente a personas en edad adulta joven, y su prevalencia es mayor en mujeres que en hombres.

El diagnóstico suele realizarse en edades comprendidas entre los 20 a los 40 años, y se estima que su incidencia (50-80 casos cada 100.000 habitantes), tiene un reparto irregular, siendo más elevada en las zonas septentrionales.

Una de las principales causas de discapacidad en la EM es el déficit visual, que aparece en el 80% de los pacientes y suele presentarse como pérdida de agudeza visual (AV) o como alteración en la motilidad ocular. Aproximadamente en la mitad de los pacientes, la enfermedad debuta con alteraciones visuales.¹

En la actualidad, la patogénesis de la EM no está totalmente definida; pero la mayoría de los autores coinciden en que se trata de una patología en la que confluyen procesos de inflamación, desmielinización y daño axonal, con una relación causal y temporal desconocida por el momento.^{2,3}

Existen evidencias de que el daño axonal aparece desde fases precoces de la enfermedad, sin relación con episodios inflamatorios o autoinmunes contra la mielina, y de que esta degeneración axonal está directamente relacionada con la discapacidad funcional permanente.^{2,3} Se ha demostrado que el deterioro axonal de los pacientes con EM puede ser observado y cuantificado a nivel de la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR) mediante técnicas de análisis digital de la imagen.^{1,4-8}

La atrofia cerebral en la resonancia magnética era hasta ahora el marcador más utilizado para cuantificar la progresión de la enfermedad. Sin embargo, las correlaciones entre las mediciones de resonancia magnética y la discapacidad clínica son limitadas.

La retina es una parte del sistema nervioso central de fácil acceso para el examen clínico. La CFNR se compone fundamentalmente de axones no mielinizados de las células ganglionares de la retina; por lo que las mediciones de su espesor aportan una valoración relativamente directa de las fibras nerviosas y por lo tanto del daño axonal. Estos axones de la CFNR confluyen a nivel del disco óptico (DO), por donde salen del globo ocular para formar la vía visual que llevará la información hasta los centros correspondientes del córtex occipital.

Cuando se produce una pérdida de axones (y de sus correspondientes células ganglionares) a nivel del nervio óptico, se observa en la exploración del fondo de ojo un DO más pálido, lo cual se define como atrofia óptica (Figura 1). La atrofia óptica no glaucomatosa puede observarse tras episodios isquémicos agudos, procesos inflamatorios a nivel del nervio óptico, en algunas enfermedades genéticas; y también asociada a enfermedades desmielinizantes, como es el caso de la EM (con o sin episodios de neuritis óptica previos). El diagnóstico de la atrofia del nervio óptico mediante examen de fondo de ojo, sólo se puede realizar en fases avanzadas, cuando el número de axones que se pierden supera el 50% del total.



Figura 1. Imagen de atrofia óptica.

La estructura del DO consta de una zona externa donde se sitúan los axones de las células ganglionares (anillo neuroretiniano) y una zona interna (excavación) donde se disponen los vasos centrales de la retina y el tejido conectivo, el cual forma un entramado que recibe el nombre de lámina cribosa. Por detrás de la lámina cribosa, los axones se mielinizan y viajan hasta el cuerpo geniculado lateral (Figura 2). El tamaño de la excavación varía según el tamaño de la papila, pero la relación excavación/disco suele ser habitualmente de 1-2/5 en sujetos sanos. Así pues, el color rojizo de la papila que podemos observar al explorar el fondo de ojo, traduce esencialmente diversas profundidades de diluciones de hematíes reflejándose sobre el plano reflectante de la mielina, a través de la lámina cribosa (que aporta cierta coloración grisácea). Este hecho sirve de punto de partida a la hora de detectar cambios en el tamaño de la excavación (como sucede en el glaucoma) o en la coloración del DO (como sucede en la atrofia óptica, en la que se produce una palidez del disco).

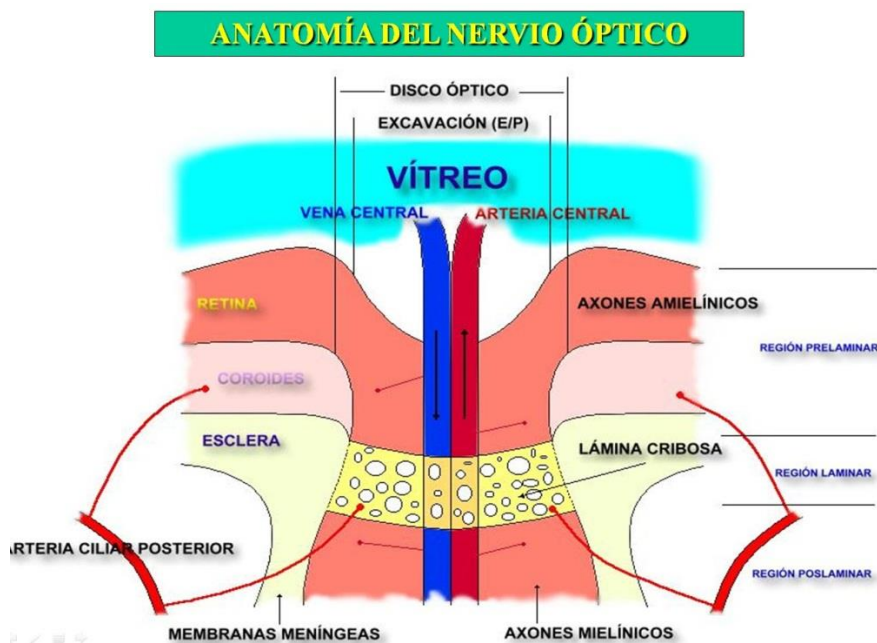


Figura 2. Estructura del nervio óptico.

Cualquier estudio epidemiológico debe garantizar la calidad de sus mediciones, no sólo porque condicionarán en gran medida la validez de sus conclusiones, sino por la importancia de las decisiones clínicas que se apoyen en esa investigación.⁹ La calidad de una medida depende tanto de su validez como de su fiabilidad.¹⁰ Mientras que la validez expresa el grado en el que realmente se mide el fenómeno de interés, la fiabilidad indica hasta qué punto se obtienen los mismos valores al efectuar la medición en más de una ocasión, bajo condiciones similares.

Dado que en el presente proyecto se ha evaluado la capacidad diagnóstica de un nuevo método en sujetos con EM, conocer la fiabilidad de la prueba resulta fundamental. Para ello es necesario el cálculo de algunos parámetros como son: el coeficiente de variación (COV), que nos permite aproximarnos a la variabilidad de los resultados obtenidos; y el coeficiente de correlación intraclase (CCI), que cuantifica la concordancia entre diferentes mediciones llevadas a cabo por un mismo sujeto.¹¹



2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La capacidad para explorar el fondo de ojo se ha desarrollado progresivamente. La interacción entre la luz y el tejido intraocular condiciona el fenómeno denominado reflectancia ocular, el cual juega un papel muy importante en la aplicación e interpretación de las técnicas ópticas de diagnóstico. Ejemplo de ello son la oftalmoscopia, retinografía, angiografía y tomografía de coherencia óptica (OCT); técnicas cuyo resultado depende de la absorción y reflectancia de las distintas capas de tejidos que componen el fondo de ojo. Este fenómeno fue observado por Helmholtz en 1850, dando lugar al oftalmoscopio, que constituyó uno de los más grandes avances de la Medicina y abrió el camino al estudio de la patología de la retina (Figura 3).



Figura 3. Arriba (modelo de oftalmoscopio de Helmholtz) y abajo oftalmoscopios actuales (directo a la derecha, indirecto a la izquierda).

Posteriormente surgieron distintos dispositivos, denominados reflectómetros, que también buscaban determinar el espectro y la distribución espacial de la luz de fondo. Los modelos más interesantes fueron desarrollados por las Universidades de Utrecht, Boston y Jena durante la década de los años 80 y 90. Estos primitivos reflectómetros estaban formados básicamente por un retinógrafo de la casa comercial Zeiss modificado, con una lámpara Xenón como fuente de luz y un primitivo sistema de captura de imágenes conectado a una impresora.

La idea de medir la saturación de oxígeno en los vasos de la retina no es algo nuevo.¹²⁻¹⁴ Sin embargo en estos estudios no se tuvo en cuenta el volumen de sangre en el cual la saturación de oxígeno estaba siendo evaluada. Uno de los autores de estos trabajos, Delori, dos años después midió el espectro de reflectancia del DO en sujetos con glaucoma y estudió las variables que afectaban a las mediciones del volumen de sangre existente.¹⁵

En este sentido, el reciente desarrollo del método de análisis semi-automático de retinografías Laguna ONhE (“optic nerve hemoglobin”), ha supuesto un importante cambio. La novedad que aporta este programa informático, que ha sido desarrollado

por un grupo de ingenieros y oftalmólogos de la Universidad de La Laguna en colaboración con los servicios de Oftalmología del Hospital Miguel Servet de Zaragoza y del Hospital Clínico de San Carlos de Madrid, es que es capaz de determinar la cantidad de hemoglobina (Hb) de diferentes sectores del DO teniendo en cuenta variables como la absorción y difusión de luz que produce el cristalino, así como la intensidad y composición espectral de la luz usada en la iluminación de la fotografía.

La distribución de la Hb en la papila tiene una alta correlación con su morfología. Así, usando el oftalmoscopio tratamos habitualmente de descifrar “de visu” la relación excavación/disco y el “aspecto global” mediante la interpretación por nuestro cerebro del color de las imágenes papilares captadas por las tres familias de conos de nuestros ojos (rojo, verde y azul); los cuales constituyen nuestra particular cámara fotográfica. El problema es que el ojo es un buen instrumento interpretador, pero un mal instrumento cuantificador (Figura 4). La fotografía simple tiene los mismos problemas que el ojo. El programa Laguna ONhE ha permitido pasar de la cualidad a la cantidad en este sentido. Su finalidad no es, por lo tanto, determinar los cambios en la perfusión ni en la oxigenación del DO; sino establecer con alta reproducibilidad y de un modo sencillo, los cambios que se producen en la coloración de la papila en diferentes sectores, mediante el análisis del porcentaje de Hb. De este modo, se podrían establecer patrones que permitieran diferenciar sujetos sanos y sujetos afectados de enfermedades que producen un daño sobre el nervio óptico, como ya se ha demostrado en el caso del glaucoma crónico simple,¹⁶ donde se ha constatado además una buena correlación con otras pruebas oftalmológicas estructurales (como la OCT) y funcionales (como el campo visual).

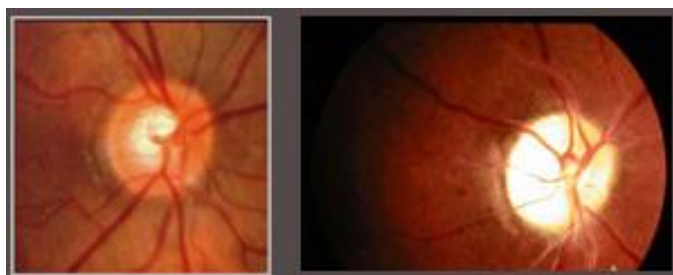


Figura 4. En las imágenes superiores, podemos diferenciar “de visu” cuál es la papila sana y cuál es la atrófica, pero: ¿qué sucedería si esta diferencia fuera menos evidente?

La aplicación de las técnicas de análisis digital de imagen en oftalmología, como la OCT, ha supuesto la aparición y desarrollo de parámetros que aportan una medición cuantitativa, objetiva y reproducible de la CFNR. Estos instrumentos han permitido observar alteraciones en la CFNR de pacientes con EM, incluso sin el antecedente de episodios clínicos de neuritis óptica, lo que sugiere la existencia de daño axonal no asociado a inflamación. Numerosos autores han sugerido la utilidad del estudio de la CFNR como marcador biológico del daño axonal en la EM,¹⁷⁻²² y se ha observado que el estudio del espesor de la CFNR con OCT puede ser un método útil para monitorizar la progresión de la EM,^{6,7} ya que el daño axonal está directamente relacionado con la discapacidad funcional secundaria a la EM. Por lo tanto, puesto que la pérdida axonal que se produce en la EM, da lugar a una atrofia óptica progresiva que inicialmente no podemos detectar en la exploración del fondo de ojo (como ya dijimos, sólo somos capaces de apreciar una palidez papilar evidente cuando se han perdido más del 50% de los axones); la utilización del programa Laguna ONhE para el análisis de retinografías de sujetos afectados de EM comparándolas con sujetos sanos, podría ser útil en la evaluación de la afectación visual y como marcador de daño axonal, aportando un dato más en la valoración global de estos pacientes, e incluso ayudando a mejorar el conocimiento de la etiopatogenia de esta compleja enfermedad.

3. HIPOTESIS

La evaluación mediante el análisis colorimétrico de fotografías del nervio óptico de pacientes con esclerosis múltiple utilizando el programa informático Laguna ONhE, es un buen marcador para el diagnóstico del daño axonal que se produce en esta enfermedad y para evaluar la disfunción visual de estos pacientes.

4. OBJETIVOS

- I. Estudiar la utilidad diagnóstica del programa informático Laguna ONhE para análisis retinográfico, mediante medición de los niveles de hemoglobina en la cabeza del nervio óptico de pacientes con esclerosis múltiple y la comparación con sujetos sanos.
- II. Determinar la situación estructural y funcional a nivel visual de los pacientes con esclerosis múltiple del área sanitaria 2 de Zaragoza, y de las posibles repercusiones que haya podido tener la enfermedad en este aspecto.
- III. Analizar la capacidad del programa informático Laguna ONhE para objetivar cambios en la coloración del nervio óptico que impliquen una disminución del número de fibras nerviosas o atrofia papilar, de forma más precoz y precisa que en la exploración del fondo de ojo que realiza el oftalmólogo habitualmente.
- IV. Evaluar la reproducibilidad de esta técnica de análisis retinográfico en sujetos sanos y en sujetos con esclerosis múltiple.

5. METODOLOGÍA

Se trata de un estudio transversal que se ha llevado a cabo entre Junio de 2012 y Abril de 2013 en las consultas externas de Oftalmología del Hospital Universitario Miguel Servet.

5.1. Sujetos de estudio

Se han incluido en el estudio 40 pacientes con EM que fueron remitidos por el servicio de Neurología para la realización de la visita de control anual y 40 sujetos controles, pareados por edad y sexo con los sujetos del estudio, trabajadores de nuestro centro hospitalario y otras personas que acudieron de forma voluntaria para ser graduados. Se seleccionó aleatoriamente un ojo de cada paciente para el análisis.

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado en el que se detallaban el objetivo del trabajo y las pruebas que se incluían en el protocolo exploratorio, así como la posibilidad de abandonarlo en el momento en que lo desearan.

Los criterios de inclusión fueron: confirmación del diagnóstico de EM por un neurólogo basándose en los criterios de Poser,²³ agudeza visual (AV) igual o superior a 0,5 con la escala de Snellen en cada ojo, y valores de presión intraocular de aplanamiento inferiores a 21 mm Hg. Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes que hubiesen padecido un episodio de neuritis óptica en los 6 meses previos a su inclusión en el estudio, aquellos cuyo defecto de refracción fuera superior a 5 dioptrías de equivalente esférico o 3 dioptrías de astigmatismo, o que presentaran alguna enfermedad sistémica u oftalmológica que pudiera repercutir a nivel visual.

5.2. Protocolo exploratorio

Todos los sujetos fueron sometidos a una exploración oftalmológica completa, que incluyó AV, test de colores (con 20 láminas isocromáticas de Ishihara), motilidad ocular, reflejos pupilares, examen del polo anterior, tonometría de aplanación, valoración funduscópica papilar y tres fotografías mediante retinógrafo Canon CF 60 DSi (Canon Incorporation, Tokio, Japan) conectado a una cámara Canon EOS 1DS Mark III. Las retinografías se procesaron mediante el programa informático semi-automático Laguna ONhE.

La agudeza visual (AV) se midió mediante optotipo de Snellen, de forma monocular y con el paciente a 6 metros de distancia (Figura 5).

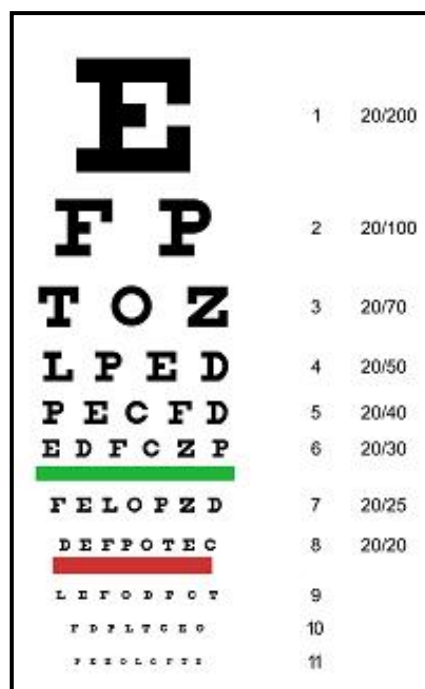


Figura 5. Optotipo de Snellen clásico.

La exploración de la visión cromática con el test de Ishihara (Figura 6) permite valorar la existencia de alteraciones en la percepción de los colores, que aparecen durante el período de estado de la neuritis óptica, generalmente en el eje rojo-verde

del espectro y, con menos frecuencia, en el azul-amarillo. En los estadios finales con atrofia óptica sólo es deficiente la discriminación del rojo-verde.

La mayor parte de los pacientes presentan alteración de la visión de colores en el ojo afectado por un episodio de neuritis óptica y el grado de afectación puede evidenciarse con el test de Ishihara, que a menudo es directamente proporcional al grado de pérdida visual. Algunos pacientes tienen una alteración de la visión cromática superior a la esperada para su afectación visual.

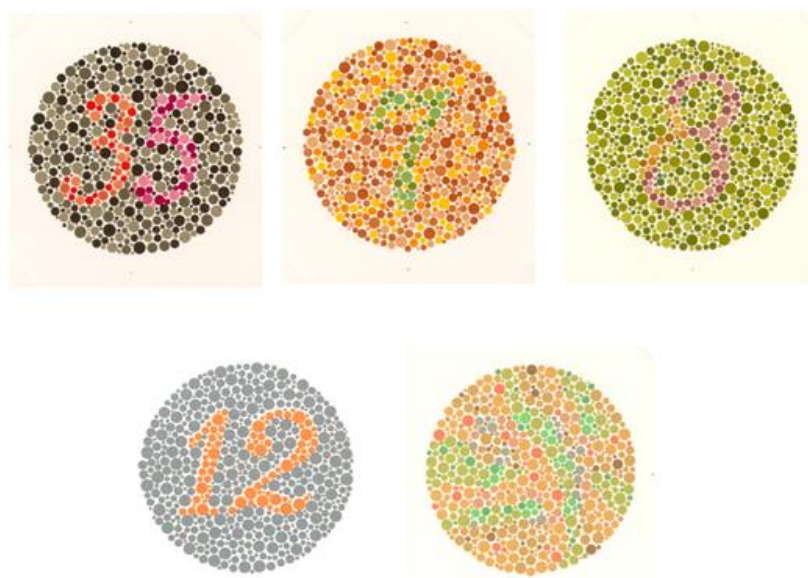


Figura 6. Ejemplos de láminas pseudoisocromáticas del test de Ishihara.

El test de Ishihara proporciona unas láminas para clasificar con precisión el defecto de visión cromática y diferenciar colores en sus diversas tonalidades. Estas láminas o mapas están dispuestas con una confusión de manchas de distintos colores. Fue ideado por el doctor Shinobu Ishihara y está disponible con diferentes números de láminas para exámenes más o menos exhaustivos. Se recomienda emplear al menos 14 láminas. En nuestro estudio se empleó un test de Ishihara con 20 láminas pseudoisocromáticas que se realizó de forma individual con cada ojo.

El **estudio del fondo de ojo** se basó en la observación del aspecto de la papila (normal, palidez difusa, palidez sectorial, edema) con la ayuda de una lente de 78

dioptrías. La forma del nervio óptico normal es verticalmente ovalada. El anillo neuroretiniano de la papila óptica es de color rosado y está formado por axones de las células ganglionares y rodea una depresión central llamada excavación óptica que no tiene axones.

Las **fotografías estereoscópicas papilares** se llevaron a cabo con un retinógrafo Canon CF 60 DSi (Canon Incorporation, Tokio, Japan) conectado a una cámara Canon EOS 1DS Mark III (Figura 7). Se realizaron una serie de 7 u 8 retinografías de cada ojo por cada sujeto a estudio. De las series de imágenes obtenidas, se seleccionaron las 3 de mejor calidad para poder hacer el estudio de reproducibilidad.



Figura 7. Imagen de retinógrafo Canon usado en el protocolo exploratorio.

El programa informático Laguna ONhE analiza 3 componentes espectrales de las fotografías del DO: azul, verde y rojo. Las áreas del DO con elevado contenido de Hb reflejan fundamentalmente luz roja. Por el contrario, las áreas con bajo contenido de Hb reflejan una baja proporción de luz roja en comparación con la azul y la verde. El programa Laguna ONhE utiliza algoritmos matemáticos para, de manera semiautomática, delimitar el borde del DO y diferenciar los vasos centrales de la retina del resto del tejido. El resultado obtenido en los vasos centrales se usa como valor de referencia para calcular el contenido de Hb en el resto del DO. La influencia de la

variación en la opacidad del cristalino en cada sujeto, es compensada analizando las diferencias entre los componentes verde y azul previamente al cálculo de la cantidad de Hb. La papila es dividida en automáticamente en 8 sectores radiales y 2 anillos concéntricos, que dan lugar a un total de 24 sectores, de los cuales se proporciona una tabla formato Excell con los valores en % de Hb en cada uno de ellos, junto con el % de Hb total (Figura 8).

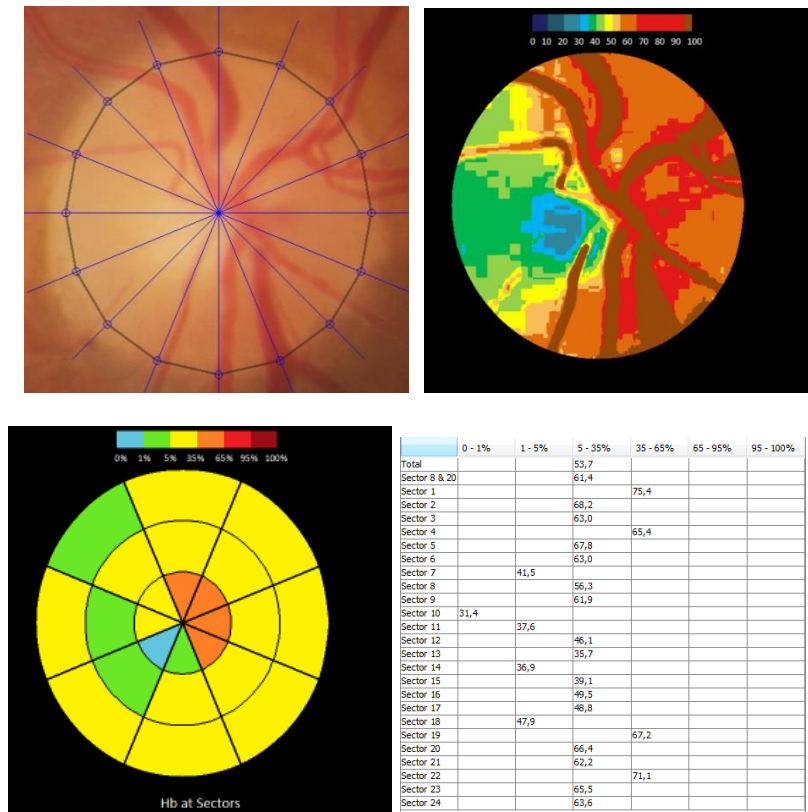


Figura 8. Resultados proporcionados por el programa Laguna ONhE al analizar una fotografía de la papila: la primera imagen (arriba-izquierda) corresponde a la segmentación semiautomática del disco óptico, después (arriba-derecha) identifica los vasos centrales de la retina que sirven como valores de referencia y por último (abajo) proporciona una imagen y una tabla con el resultado de la cantidad de Hb con un código de colores y en % en cada uno de los 24 sectores analizados y el resultado de Hb total.

De este modo, se procesaron todas las imágenes seleccionadas, se compararon los resultados obtenidos entre sujetos sanos y pacientes con EM, y se analizó la variabilidad del programa Laguna ONhE mediante un estudio de reproducibilidad.

5.3 Recogida y análisis de datos

Todas las variables mencionadas fueron registradas en una base de datos elaborada con el programa Microsoft Excell 2010. Se realizó un estudio transversal, en el que se compararon los resultados en los porcentajes de Hb obtenidos en cada uno de los sectores de la cabeza del nervio óptico entre sujetos sanos y pacientes con EM para comprobar si existían diferencias entre ambos grupos. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de la reproducibilidad de la técnica aplicada tanto en sujetos sanos como en pacientes con EM, ya que se trata de un programa novedoso cuyo uso aún no se ha generalizado.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 20.0 (SPSS Incorporation, Chicago, Estados Unidos). Previamente al análisis de los datos se comprobó el ajuste de las variables a la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados obtenidos en la exploración fueron comparados mediante un test t-Student para muestras independientes, con el objetivo de detectar diferencias en la cantidad de Hb en el DO entre ambos grupos. Un nivel de $p < 0,05$ fue considerado significativo para todos los análisis estadísticos.

Para el análisis de la reproducibilidad se calcularon los COV y los CCI comparando los resultados de las 3 fotografías realizadas a cada sujeto en la visita exploratoria con el fin de comprobar la variabilidad de los resultados y la fiabilidad o precisión de la prueba.

6. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 40 pacientes con una edad media de $49,65 \pm 12,23$ años; y 40 controles con una edad media de $47,96 \pm 10,63$ años ($p=0,514$). Se seleccionó de manera aleatoria un ojo de cada sujeto a estudio para el análisis. Los estadísticos descriptivos de los grupos de estudio aparecen recogidos en la siguiente tabla:

	GRUPO EM	GRUPO CONTROL	p
Edad (DE)	$49,65 \pm 12,23$ años	$47,96 \pm 10,63$ años	0,514
Sexo (hombre:mujer)	16:26	14:26	0,800
AV (DE)	$0,87 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,02$	0,002
PIO (DE)	$13,98 \pm 4,50$ mm Hg	$14,34 \pm 2,44$ mm Hg	0,332
Duración de la enfermedad	$7,33 \pm 1,91$ años	-	-

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de los grupos de estudio. Se observa como no existen diferencias significativas en la edad, sexo y PIO entre los dos grupos. Abreviaturas: agudeza visual (AV), presión intraocular (PIO), esclerosis múltiple (EM), desviación estándar (DE).

6.1. Comparación de los porcentajes de Hb entre sujetos control y sujetos con EM

Los resultados de esta comparación se muestran en la Tabla 2 y el Gráfico 1. Se observó un mayor porcentaje de Hb en todos los sectores del DO en los controles frente a los pacientes con EM, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,005$) en prácticamente todos menos el 1, 2, 4, 7, 19 y 22; incluyendo el porcentaje de Hb total ($p < 0,001$). Las principales diferencias entre ambos grupos en la cantidad de Hb se observan en los sectores temporales de la papila (Figura 9): 12, 13, 14, 15, 17 y 18, oscilando entre 7,44% (sector 14) y el sector 15 con 9,17% más de Hb

en controles frente a EM, que corresponde a la máxima diferencia entre ambos grupos.

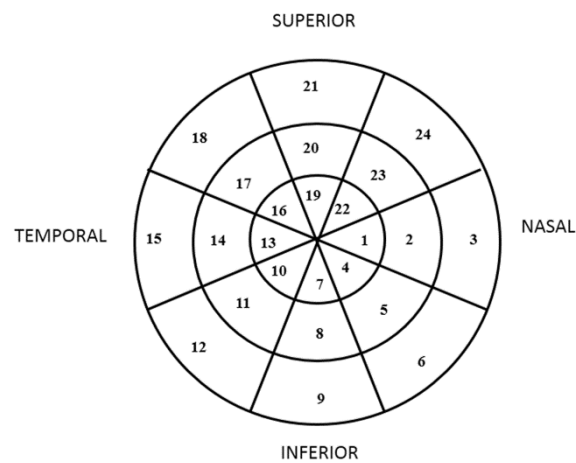


Figura 9. La imagen del disco óptico, es dividida automáticamente en 24 sectores. En la imagen podemos observar la numeración correspondiente en cada sector.

Los sectores con mayor cantidad de Hb en ambos grupos fueron los correspondientes al cuadrante superior (del 18 al 24) e inferior (del 5 al 9) de la cabeza del nervio óptico.

	Grupo EM (DE)	Grupo control (DE)	p
Hb total	58,99 (11,53)	65,39 (10,63)	<0,001
Hb 1	69,76 (17,24)	71,96 (16,09)	0,383
Hb 2	68,14 (15,40)	72,10 (14,78)	0,082
Hb 3	61,97 (12,12)	67,07 (12,24)	0,005
Hb 4	67,23 (16,70)	69,09 (15,37)	0,445
Hb 5	68,55 (14,32)	72,89 (13,77)	0,041
Hb 6	62,04 (12,34)	66,34 (12,22)	0,019
Hb 7	59,32 (17,70)	63,12 (16,06)	0,140
Hb 8	62,76 (14,19)	69,70 (11,30)	0,001
Hb 9	62,30 (11,82)	67,80 (11,48)	0,002
Hb 10	49,40 (19,38)	56,67 (17,87)	0,011

Hb 11	50,24 (16,95)	57,51 (15,45)	0,004
Hb 12	51,89 (13,15)	59,45 (12,73)	<0,001
Hb 13	47,17 (21,19)	55,28 (17,75)	0,008
Hb 14	46,31 (17,32)	53,75 (16,02)	0,004
Hb 15	47,33 (13,72)	56,5 (14,26)	<0,001
Hb 16	53,20 (21,74)	59,77 (18,22)	0,035
Hb 17	55,46 (17,34)	63,44 (15,17)	0,002
Hb 18	57,27 (13,00)	65,15 (13,36)	<0,001
Hb 19	63,17 (22,23)	66,57 (16,53)	0,277
Hb 20	68,88 (15,30)	75,97 (13,31)	0,001
Hb 21	69,04 (12,01)	74,36 (11,81)	0,003
Hb 22	70,81 (19,92)	71,76 (16,27)	0,737
Hb 23	74,17 (15,25)	78,95 (13,51)	0,031
Hb 24	69,11 (12,07)	74,03 (12,14)	0,007

Tabla 2. Porcentajes de hemoglobina (Hb) en cada sector (y su desviación estándar, DE, entre paréntesis) en el grupo de esclerosis múltiple (EM) y en el grupo control. Valor de la significación (p) de prueba T de Student al comparar ambos grupos (los valores estadísticamente significativos $p < 0,005$ aparecen en negrita). Se observa como la mayor parte de los sectores son estadísticamente significativos. Abreviaturas: esclerosis múltiple (EM), hemoglobina (Hb), desviación estándar (DE).

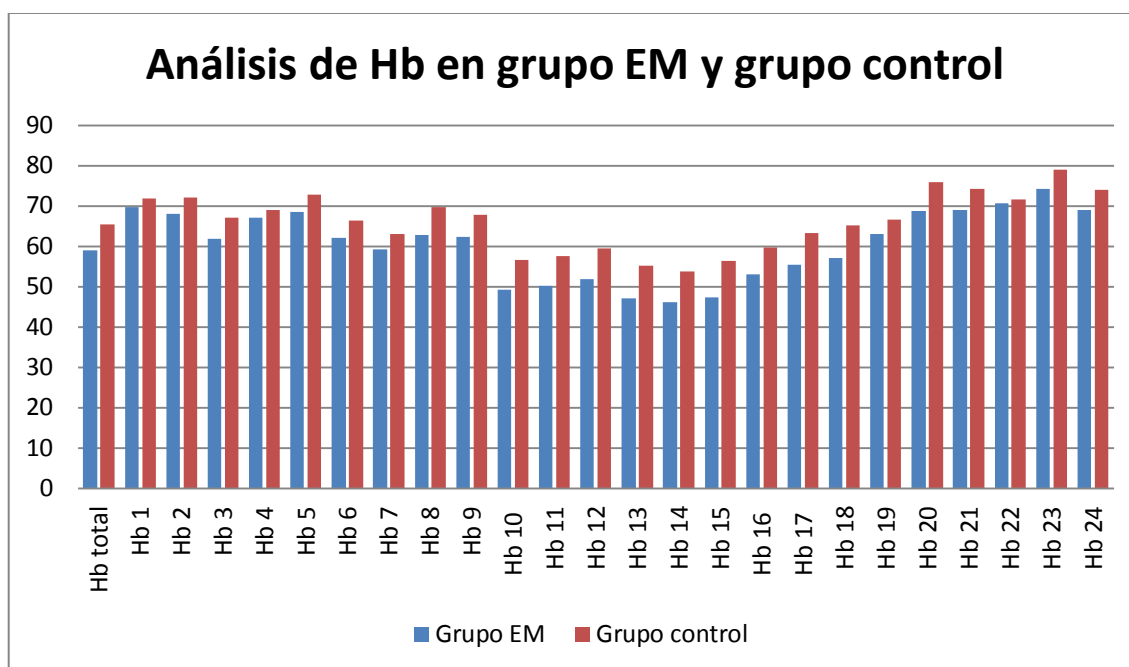


Gráfico 1. Análisis del porcentaje de hemoglobina (eje vertical) por sectores (eje horizontal) en el grupo de EM y en el grupo control. Se observa una mayor cantidad de Hb en todos los sectores en el grupo control respecto a los pacientes con EM. Abreviaturas: hemoglobina (Hb), esclerosis múltiple (EM).

6.2. Reproducibilidad del programa Laguna ONhE para análisis del porcentaje de Hb en controles y pacientes con EM

Los resultados de la reproducibilidad se muestran en la Tabla 3.

Los resultados del programa Laguna ONhE presentaron una buena reproducibilidad, con unos COV que oscilan entre 5,05% y 12,77% en pacientes con EM y entre 3,02% y 10,22% en sujetos control. Los COV fueron menores en el grupo control frente al grupo de EM, lo que demuestra una mejor reproducibilidad en los controles. Los valores más bajos de COV fueron obtenidos en el análisis de Hb total en ambos grupos (COV de 5,05% en EM y de 3,02% en controles).

Los CCI fueron en casi todos los casos superiores a 0,850; lo que indica que existe muy buena concordancia en los resultados obtenidos por un mismo examinador al repetir la prueba varias veces en ambos grupos. En el grupo de EM los CCI oscilaron entre 0,795 y 0,979; y en el grupo control entre 0,898 y 0,989. De nuevo, la medida del porcentaje de Hb total obtuvo muy buena correlación en ambos grupos (0,974 en EM y 0,989 en controles).

	GRUPO EM		GRUPO CONTROL	
	COV (%)	ICC	COV (%)	ICC
Hb total	5,05	0,974	3,02	0,989
Hb 1	9,84	0,896	7,77	0,945
Hb 2	8,96	0,795	6,95	0,898
Hb 3	7,01	0,903	5,03	0,946
Hb 4	10,89	0,894	5,22	0,943
Hb 5	8,12	0,822	6,99	0,931
Hb 6	7,07	0,916	4,03	0,954
Hb7	9,05	0,973	3,36	0,972
Hb 8	6,29	0,972	4,02	0,987
Hb 9	6,29	0,953	4,00	0,966
Hb 10	12,26	0,941	9,92	0,965
Hb11	10,25	0,885	7,76	0,953
Hb 12	7,17	0,947	5,21	0,977
Hb 13	12,77	0,949	10,22	0,969
Hb 14	11,11	0,857	9,86	0,980
Hb 15	8,15	0,937	5,59	0,959
Hb 16	12,16	0,950	9,66	0,976
Hb 17	9,96	0,863	8,56	0,903
Hb 18	7,07	0,935	4,89	0,973
Hb 19	9,41	0,979	7,74	0,988
Hb 20	6,75	0,971	4,96	0,988
Hb 21	5,79	0,950	3,36	0,975
Hb 22	9,43	0,923	7,45	0,966
Hb 23	7,55	0,863	6,69	0,943
Hb 24	5,72	0,920	3,26	0,954

Tabla 3. Valores en grupo EM y grupo control de los COV y CCI en cada uno de los sectores analizados. Se observa una buena repetibilidad de la prueba en ambos grupos (aunque algo mejor en el grupo control) con valores de COV comprendidos entre 5 y 10% en su mayoría; y de CCI superiores a 0,850. Abreviaturas: esclerosis múltiple (EM), coeficiente de variación (COV), coeficiente de correlación intraclase (CCI), hemoglobina (Hb).

7. DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar si el análisis de retinografías mediante el programa Laguna ONhE es un buen marcador diagnóstico de daño axonal en pacientes con EM, mediante el análisis de la cantidad de Hb en diferentes sectores del DO. El cálculo del porcentaje de Hb es una manera indirecta de cuantificar la coloración de la papila y por ello de identificar las zonas con pérdida axonal o atrofia de manera más precoz y exacta que con la exploración habitual del fondo de ojo.

Numerosos estudios han demostrado que en los sujetos con EM se observa un adelgazamiento de la CFNR y una pérdida axonal progresiva no sólo en los ojos con un episodio previo de neuritis óptica, sino también en pacientes con EM que nunca han presentado un episodio clínico agudo de neuritis óptica.²⁰⁻²³

Desde el año 2006, se ha sugerido que la medición del espesor de CFNR mediante técnicas de análisis digital de la imagen puede ser útil como un marcador indirecto de atrofia cerebral en la EM.²⁴⁻²⁷ Sin embargo, estas técnicas (como el OCT) no se encuentran disponibles en todos los centros.

El programa de análisis colorimétrico Laguna ONhE en el momento actual ya se está utilizando para el estudio del glaucoma,¹⁶ sin embargo, con el presente trabajo se demuestra que su capacidad diagnóstica va más allá; y que puede resultar útil como marcador diagnóstico en el estudio de otras patologías con afectación del nervio óptico. En el caso de la EM, hemos encontrado en nuestro estudio que existen

diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de Hb en prácticamente todos los sectores de la papila, y estas diferencias han sido mayores en el cuadrante temporal, lo que coincide con los resultados de otras pruebas de imagen, como la OCT, donde se ha constatado que en las enfermedades neurodegenerativas como la EM, se produce una mayor pérdida de fibras nerviosas en el sector temporal de la papila.²⁸

En cuanto a la reproducibilidad de la prueba (aunque siendo más exactos deberíamos hablar de “repetibilidad”, ya que se ha aplicado el mismo método por el mismo ejecutor en condiciones idénticas y en un breve intervalo de tiempo); el método Laguna ONhE es una técnica con buena reproducibilidad en pacientes con EM y sujetos control, aunque algo inferior al OCT.²⁹ La fiabilidad o precisión de la prueba es muy buena, y hemos observado que la concordancia es mayor en los sujetos control que en los pacientes con EM, posiblemente porque en el grupo sano, la colaboración y capacidad de fijación para hacer las retinografías sea mayor. La Hb total es el parámetro con mayor reproducibilidad, y su capacidad de discriminación entre ambos grupos es muy buena.

En conclusión podemos afirmar que el método de análisis colorimétrico Laguna ONhE, es un buen marcador diagnóstico para la detección de daño axonal en los pacientes con EM; ya que es capaz de detectar las diferencias en la cantidad de Hb (y por lo tanto en la coloración) del nervio óptico; que son consecuencia de la progresiva pérdida de fibras nerviosas que se produce en la EM, asociada o no a episodios previos de neuritis óptica. Se necesitarían estudios con mayor tamaño muestral para corroborar estos hallazgos.

8. CONCLUSIONES

- I. El estudio de la coloración del disco óptico mediante el análisis de la cantidad de hemoglobina utilizando el programa Laguna ONhE, es un buen marcador de daño axonal en la esclerosis múltiple.
- II. El análisis llevado a cabo por el programa Laguna ONhE permite identificar áreas de atrofia óptica en los pacientes con esclerosis múltiple de manera más precoz y exacta que la exploración habitual del fondo de ojo.
- III. La pérdida de axones en el disco óptico (atrofia) se produce tanto en pacientes con episodios previos de neuritis óptica como en los que no han presentado este antecedente, y es superior que en la personas de la misma edad que no tienen la enfermedad.
- IV. El método de análisis Laguna ONhE presenta una buena reproducibilidad tanto en pacientes con esclerosis múltiple como en sujetos sanos.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Khanifar AA, Parlitsis GJ, Ehrlich JR, Aaker GD, D'Amico DJ, Gauthier SA, et al. Retinal nerve fiber layer evaluation in multiple sclerosis with spectral domain optical coherence tomography. Clin Ophthalmol. 2010;4:1007-13.
2. Palace J. Inflammation versus neurodegeneration: consequences for treatment. J. Neurol Sci. 2007;259:46-9.
3. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. Neuron. 2006;52:61-76.

4. Sergott RC. Optical coherence tomography: measuring in-vivo axonal survival and neuroprotection in multiple sclerosis and optic neuritis. *Curr Opin Ophthalmol*. 2005;16:346-50.
5. Zaveri MS, Conger A, Salter A, Frohman TC, Galetta SL, Markowitz CE, et al. Retinal imaging by laser polarimetry and optical coherence tomography evidence of axonal degeneration in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2008;65:924-28.
6. Gundogan FC, Demirkaya S, Sobaci G. Is optical coherence tomography really a new biomarker candidate in multiple sclerosis? A structural and functional evaluation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:5773-81.
7. Garcia-Martin E, Pueyo V, Martin J, Almarcegui C, Ara JR, Dolz I, et al. Progressive changes in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Eur J Ophthalmol*. 2010;20(1):167-73.
8. Garcia-Martin E, Pueyo V, Pinilla I, Ara JR, Martin J, Fernandez J. Fourier-Domain OCT in multiple sclerosis patients: Reproducibility and ability to detect retinal nerve fiber layer atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4124-31.
9. Sackett DL. A primer on the precision and accuracy of the clinical examination. *JAMA*. 1992;267:2638-44.
10. Argimon Pallán JM, Jiménez Vill J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 2ª ed. Madrid: Harcorurt; 2000.
11. Hernández Aguado I, Porta Serra M, Miralles M, García Benavides F, Bolúmar F. La cuantificación de la variabilidad en las observaciones clínicas. *Med Clin (Barc)*. 1990;95:424-29.
12. Hickam JB, Frayser R, Ross JCA. Study of retinal venous blood oxygen saturation in human subjects by photographic means. *Circulation*. 1963;27:375-85.
13. Laing RA, Cohen AJ, Friedman E. Photographic measurements of retinal blood oxygen saturation: falling saturation rabbit experiments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1975;14:606-10.

14. Delori FC. Noninvasive technique for oximetry of blood in retinal vessels. *Appl Opt.* 1988;27:1113-25.
15. Delori FC. Reflectometry measurements of the optic disc blood volume. In: Lambrou GN, Greve EI, eds. *Ocular blood flow in glaucoma. Means, methods and measurements.* Berkeley, CA: Kugler and Ghedini;1989:155-63.
16. González de la Rosa M, González-Hernández M, Sigut J, Alayon S, Radcliffe N, Mendez-Hernandez C, et al. Measuring hemoglobin levels in the Optic Nerve Head: comparisons with other structural and functional parameters of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;1(54):482-88.
17. Henderson AP, Trip SA, Schlottmann PG, Altmann DR, Garway-Heath DF, Plant GT, et al. A preliminary longitudinal study of the retinal nerve fiber layer in progressive multiple sclerosis. *J Neurol.* 2010;257(7):1083-91.
18. Ratchford JN, Quigg ME, Conger A, Frohman T, Frohman E, Balcer LJ, et al. Optical coherence tomography helps differentiate neuromyelitis optica and MS optic neuropathies. *Neurology.* 2009;73:302-08.
19. Syc SB, Warner CV, Hiremath GS, Farrell SK, Ratchford JN, Conger A, et al. Reproducibility of high-resolution optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2010;16(7):829-39.
20. Pueyo V, Martin J, Fernandez J, Almarcegui C, Ara J, Egea C, et al. Axonal loss in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14: 609-14.
21. Pueyo V, Polo V, Larrosa JM, Mayoral F, Ferreras A, Honrubia FM. Reproducibility of optic nerve head and retinal nerve fiber layer thickness measurements using optical coherence tomography. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2006;81(4):205-11.
22. Garcia-Martin E, Pueyo V, Ara J, Almarcegui C, Martin J, Pablo L. Effect of optic neuritis on progressive axonal damage in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2011;17(7):830-37.

23. Beer S, Rösler KM, Hess CW. Diagnostic value of paraclinical tests in multiple sclerosis: relative sensitivities and specificities for reclassification according to the Poser committee criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;59(2):152-99.
24. Frohman EM, Dwyer MG, Frohman T, Cox JL, Salter A, Greenberg BM, et al. Relationship of optic nerve and brain conventional and non-conventional MRI measures and retinal nerve fiber layer thickness, as assessed by OCT and GDx: a pilot study. *J Neurol Sci*. 2009;282:96-105.
25. García-Martín E, Pueyo V, Fernández J, Martín J, Ara JR, Almarcegui C, et al. Effect of treatment in loss of retinal nerve fibre layer in multiple sclerosis patients. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2010;85(6):209-14.
26. Petzold A, de Boer JF, Schippling S, Vermersch P, Kardon R, Green A, et al. Optical coherence tomography in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2010;9(9):921-32.
27. Dörr J, Wernecke KD, Bock M, Gaede G, Wuerfel JT, Pfueller CF, et al. Association of retinal and macular damage with brain atrophy in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2011;6(4):181-6.
28. Garcia-Martin E, Pueyo V, Almarcegui C, Martin J, Ara JR, Sancho E, et al. Risk factors for progressive axonal degeneration of the retinal nerve fibre layer in multiple sclerosis patients. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(11):1577-82.
29. Garcia-Martin E, Pueyo V, Pinilla I, Ara JR, Martin J, Fernandez J. Fourier-domain OCT in multiple sclerosis patients: reproducibility and ability to detect retinal nerve fiber layer atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4124-31.

