

**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE PINAR DEL RÍO
HOSPITAL GENERAL DOCENTE “ABEL SANTAMARÍA CUADRADO”**

**CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS IN VIVO DEL QUERATOCONO: SU
EVOLUCIÓN Y ASOCIACIÓN CON LA GRAVEDAD CLÍNICA**

Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en

Ciencias Médicas

Dra. Janet González Sotero

Pinar del Río

2014

**INSTITUTO SUPERIOR DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA HABANA
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE PINAR DEL RÍO
HOSPITAL GENERAL DOCENTE “ABEL SANTAMARÍA CUADRADO”**

**CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS IN VIVO DEL QUERATOCONO: SU
EVOLUCIÓN Y ASOCIACIÓN CON LA GRAVEDAD CLÍNICA.**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en
Ciencias Médicas**

Autora: Dra. Janet González Sotero.

Tutor: Dr. C. Miguel Omar Mokey Castellanos.

Pinar del Río

2014

AGRADECIMIENTOS

A los Dr. C. Miguel O. Mokey Castellanos y Rosendo Villar Valdés, por el asesoramiento científico.

Al Dr C. Teddy O. Tamargo Barbeito por el asesoramiento en el procesamiento estadístico, y su perseverancia.

A la Dra. María del Carmen Benítez Merino por iniciarme en el conocimiento de la microscopía confocal.

Al Lic. Humberto J. Álvarez Padrón, por su colaboración en la asesoría literaria de la tesis.

A los doctores Patricia Andújar Coba, Alexeide Castillo, Armando Capote Cabrera, Raúl Pérez Suárez, Aleida Lavandero Espina, por su apoyo en mi formación profesional.

Al Dr. Eduardo Rojas Alvarez por su incondicional ayuda en todos los proyectos profesionales.

A Alexei Díaz Pérez, Carmen García Muñoz, Lislyem Fonticoba Valdés, Eduardo García Noguera, por su apoyo y comprensión.

A todos los que de una forma u otra han colaborado con este proyecto científico.

Especialmente a mi familia.

A mi familia

SÍNTESIS

El queratocono se caracteriza por adelgazamiento, debilitamiento y protusión de la córnea, de etiología desconocida, que provoca disminución de la visión. Se realizó un estudio observacional, descriptivo, longitudinal prospectivo, entre enero de 2010 y enero de 2011, en el Hospital Abel Santamaría Cuadrado, con seguimiento de 24 meses. Los objetivos de la investigación fueron describir las características morfométricas in vivo de la córnea en estos pacientes, su evolución y relación con la gravedad clínica. Para ello, se realizó microscopía confocal de la córnea a los pacientes, divididos en cuatro grupos, según su gravedad, cuyos resultados se compararon con sujetos sanos. Se utilizó el análisis de varianza, el coeficiente de correlación de Spearman y el Índice de Kappa. Se identificaron como principales hallazgos: reducción del grosor corneal y de la población celular en el epitelio basal y estroma, y alteraciones en la microarquitectura del plexo nervioso subbasal, asociados a su gravedad. Los primeros parámetros morfométricos que sufren alteraciones son la paquimetría y la densidad de queratocitos anteriores. Esta investigación aporta elementos que pudieran ser punto de partida para otros estudios que profundicen en el análisis de mecanismos fisiopatogénicos del queratocono, su diagnóstico precoz y la conducta más personalizada.

ÍNDICE

Contenido	Páginas
INTRODUCCIÓN.....	8
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO CONTEXTUAL.....	17
1.1 Caracterización del queratocono.. ..	18
1.2 Microscopía confocal de la córnea normal.....	22
CAPÍTULO II. DISEÑO METODOLÓGICO.....	29
2.1. Clasificación de la investigación.....	30
2.2. Universo y muestra.....	30
2.3. Variables y su operacionalización.....	33
2.4. Recogida, procesamiento y análisis de los datos.....	41
2.5. Consideraciones éticas.....	49
CAPÍTULO III. RESULTADOS	51
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES.....	85
RECOMENDACIONES.....	87
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA.....	105
ANEXOS.....	.107

INTRODUCCIÓN

Queratocono es un término usado para definir una enfermedad en la cual la córnea adopta una forma cónica como resultado de adelgazamiento, debilitamiento y protusión no inflamatorios de la misma.¹

En esta enfermedad de la córnea, el encurvamiento del tejido, generalmente asimétrico, provoca miopía y astigmatismo irregular, asociados a aberraciones ópticas de alto orden.^{2, 3} La protusión y el adelgazamiento pueden progresar hasta provocar alteraciones en la microestructura corneal, lo cual origina como consecuencia, edema y procesos cicatrizales que conllevan a opacidades como secuela.⁴ Todos estos procesos son responsables de la reducción en la agudeza visual corregida de estos pacientes.¹

El grado de protusión puede variar notablemente, desde una situación en que la córnea adquiere la forma típica de cono, donde el diagnóstico es fácil de realizar, hasta casos solo detectables por procedimientos especializados.⁵

Incluso, es probable que aún no se detecten estadios muy incipientes de esta enfermedad, teniendo en cuenta la existencia de pacientes con ectasia tras cirugía refractiva corneal con Láser Excímer, en los cuales, durante los exámenes preoperatorios de rutina, no se detectaron alteraciones.^{4, 6, 7}

Entre el 10 y el 20 % de los pacientes con queratocono requieren trasplante de córnea para restaurar la visión e integridad de la misma,^{8, 9} a una edad relativamente joven.¹⁰ Otra de las características de esta enfermedad corneal es su bilateralidad,⁴ lo que puede deteriorar la visión del paciente de manera más invalidante desde los puntos de vista social, económico y psicológico.¹¹

Se recoge escasa bibliografía acerca de países que cuentan con investigaciones sobre la prevalencia del queratocono.^{12, 13} Estudios internacionales aislados, reportan estimados que varían desde 0,3/100 000 en Rusia¹⁴ hasta 2300/100 000 en la India,¹³ influidos por factores como la localización geográfica, criterios y medios diagnósticos empleados en ellos, así como las características de la muestra.¹⁴⁻¹⁶

Aunque la práctica asistencial evidencia que esta enfermedad en Cuba es frecuente, no existen estudios que la cuantifiquen, por lo que se desconoce su verdadera magnitud. Tras el comienzo en el país de la cirugía refractiva corneal asistida por Láser Excímer y la introducción de las nuevas tecnologías para el análisis de la superficie ocular, como la topografía corneal; se han estudiado con más rigor científico y a mayor escala, pacientes con defectos de refracción

que han acudido a la consulta especializada; en una cantidad considerable de ellos se diagnostica el queratocono.

La herramienta diagnóstica universalmente difundida para obtener imágenes de la córnea ha sido la biomicroscopía anterior. La evolución tecnológica ocurrida durante los últimos dos decenios ha permitido la introducción de nuevos instrumentos, tales como: topógrafo corneal, biomicroscopio ultrasónico y tomógrafo de coherencia óptica. Estos proveen detalles de la curvatura corneal o realizan secciones macroscópicas de las estructuras examinadas. En contraste, la morfología microscópica de los tejidos de la superficie ocular solo podía ser evaluada a través del análisis histológico ex vivo (con las limitaciones debidas a la degeneración del tejido y artefactos) y de la citología de impresión, este último limitado al análisis de una muestra de epitelio superficial; además de ser procedimientos invasivos. Esta realidad cambió con el desarrollo de los microscopios confocales, disponibles para uso clínico desde el año 1995.¹⁷

La microscopía óptica confocal presenta como principales ventajas, con respecto a la convencional, la capacidad de obtener cortes ópticos seriados de forma no invasiva en organismos vivos, la adquisición de imágenes de diferentes profundidades del espesor de una pieza de tejido, lo que elimina la

necesidad de realizar procedimientos de seccionado y procesamiento de muestras. Además, brinda la posibilidad de analizar rigurosamente las imágenes digitales del tejido desde el punto de vista cuantitativo.⁶

Desde su aplicación y difusión en la práctica médica en el mundo, se han dado pasos de avance en la perspectiva microestructural del análisis de los pacientes con queratocono; pero son escasos los estudios publicados, en los cuales la microscopía confocal se usa específicamente para investigar las características de las córneas en pacientes con esta enfermedad. En general, las investigaciones publicadas al respecto han analizado una muestra muy reducida,¹⁸ lo cual puede influir en la disparidad de criterios que existe entre los autores. Una parte considerable de ellos se limitan a analizar la respuesta cicatrizal de la córnea de pacientes con esta ectasia a procedimientos quirúrgicos.^{4, 19-27}

En la bibliografía revisada no se han identificado publicaciones de estudios prospectivos de las características morfométricas in vivo de la córnea de pacientes con queratocono. Además, en Cuba, no se han encontrado estudios publicados que analicen las características morfométricas in vivo de todas las capas de la córnea en pacientes con queratocono.

La **justificación** de esta investigación está dada por la elevada frecuencia de presentación del queratocono, enfermedad que es causa de discapacidad visual y de la que no se conoce aún su etiología. Además por la necesidad de conocer, en este medio, las características morfométricas in vivo de la córnea en pacientes con queratocono, su evolución y relación con la gravedad clínica de la enfermedad. Justifica también su realización la disponibilidad de los recursos necesarios para llevarla a cabo.

Problema científico

Existe necesidad de realizar estudios más profundos sobre el queratocono, con el fin de buscar elementos que pudieran contribuir a realizar el diagnóstico de la enfermedad en etapas precoces, dilucidar su patogenia y orientar hacia una conducta más personalizada en el futuro.

Se desconocen, en este medio, las características morfométricas in vivo de la córnea en pacientes con queratocono, su evolución y relación con la gravedad clínica de la enfermedad.

Lo anteriormente planteado fundamenta las siguientes **preguntas científicas**:

1. ¿Cuáles son las diferencias morfométricas corneales entre pacientes con diferentes grados de gravedad del queratocono y sujetos sanos?

2. ¿Están relacionadas las características morfométricas de la córnea entre sí, y con la gravedad clínica de la enfermedad?
3. ¿Cuáles son las características morfométricas de la córnea que sufren cambios significativos durante su evolución?

El **objetivo general** de la presente investigación consiste en describir las características morfométricas in vivo de la córnea en pacientes con queratocono, su evolución y asociación con la gravedad clínica.

Los **objetivos específicos** formulados son:

1. Describir las características morfométricas in vivo de la córnea en pacientes con queratocono, con respecto a sujetos sanos.
2. Identificar la asociación de las variables morfométricas entre sí y con la gravedad del queratocono.
3. Describir la evolución de las características morfométricas de la córnea en pacientes con queratocono.

Se trata de probar la **hipótesis científica** de que las principales alteraciones morfométricas in vivo de las córneas de pacientes con queratocono son: disminución del grosor corneal y de la densidad de células en las porciones

corneales anteriores, así como alteraciones en la arquitectura de sus nervios; asociadas a la gravedad clínica de la enfermedad.

De acuerdo con los objetivos e hipótesis planteados, se aplicó como **diseño metodológico** un estudio observacional, descriptivo, longitudinal prospectivo, en el hospital Docente General “Abel Santamaría Cuadrado”, de Pinar del Río. Se estudiaron pacientes con queratocono, los cuales fueron distribuidos en cuatro grupos, según su gravedad clínica. Como no existe consenso acerca de la mayoría de los parámetros de normalidad de las características morfométricas in vivo de la córnea, se calcularon estas variables en un grupo de sujetos sanos, cuyos resultados se compararon con los obtenidos en los pacientes con queratocono. A todos se les realizó microscopía confocal de la córnea. En el análisis estadístico se aplicó comparación de medias mediante ANOVA de clasificación simple y de medidas repetidas, con las correspondientes comparaciones múltiples, realizadas posteriormente, por la prueba de Scheffé o de Bonferroni. La asociación entre variables se comprobó mediante el coeficiente de correlación de Spearman. También fue calculado el Índice de Kappa.

La memoria gráfica que se presenta consta de: Introducción, Desarrollo, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias bibliográficas y Anexos. El cuerpo del trabajo cuenta con 5 capítulos.

El **aporte teórico** consiste en la adquisición de un nuevo conocimiento científico, al describir, por primera vez en este medio, las características morfométricas in vivo de la córnea en pacientes con queratocono, la evolución de las mismas; así como la relación de estas variables entre sí y con la gravedad clínica de la enfermedad.

La presente investigación posee **significación práctica**, porque contribuye a realizar un estudio más detallado y profundo a los pacientes con queratocono que se atienden en la consulta, al incorporar en su historia clínica, además de los estudios clínicos tradicionales, la descripción de los hallazgos morfométricos corneales in vivo y su evolución. Esta investigación establece bases morfométricas in vivo que pudieran ser punto de partida para otros estudios que ayuden a profundizar en el análisis de hipótesis acerca de los mecanismos fisiopatogénicos del queratocono, su diagnóstico precoz y la conducta más personalizada de la enfermedad a partir de la detección de cambios morfométricos desde sus estadios iniciales.

La **novedad** de esta investigación radica en que no se han encontrado estudios publicados en Cuba que analicen las características morfométricas in vivo de todas las capas de la córnea en pacientes con queratocono. Para ello se aplicó una tecnología cuyo funcionamiento se basa en el novedoso principio de la confocalidad, que por primera vez en la historia de la oftalmología, permite una visión directa de la córnea a nivel microscópico en condiciones fisiológicas del tejido, in vivo, en tiempo real y de manera reiterada; este último elemento es muy importante, por tratarse de una enfermedad progresiva. Por otra parte, se analizaron las variables morfométricas de la córnea asociadas a características clínicas de la enfermedad, lo cual provee un enfoque más integral al abordar la enfermedad.

Previamente, se han realizado estudios prospectivos en pacientes con queratocono, enfocados en la descripción de características clínicas y topográficas^{5, 28-31}, pero no se han identificado estudios publicados sobre esta enfermedad que analicen de esta manera las características morfométricas de la córnea in vivo, por lo que se aporta evidencia que puede ser punto de partida para nuevas investigaciones, enfocadas en la dilucidación de la etiopatogenia de la enfermedad y el diagnóstico precoz.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

En este capítulo, primeramente se realiza una caracterización general del queratocono y, posteriormente, se describen las principales características morfométricas in vivo de la córnea normal.

1.1. Caracterización del queratocono

El queratocono es una enfermedad primaria no inflamatoria de la córnea, en la que esta sufre protusión, adelgazamiento y debilitamiento de su estructura.¹

Numerosas investigaciones han encontrado evidencias que sugieren la influencia de factores genéticos³²⁻³⁶ y ambientales en la génesis de esta ectasia.³⁷ Se ha constatado una clara relación con las enfermedades atópicas, frotamiento ocular, el uso de lentes de contacto,³⁸ Síndrome de Down³⁹ y enfermedades del tejido conectivo.^{38, 40}

Estudios de laboratorio sugieren la participación de enzimas degradativas e inhibidores de proteinasas, así como un posible rol del sistema interleukina – 1 en su patogénesis. Sin embargo, a pesar de las numerosas investigaciones

clínicas y de laboratorio, su patogénesis permanece como un enigma para la ciencia.³⁸

El queratocono es una enfermedad generalmente bilateral y asimétrica, caracterizada por alteraciones corneales, tales como: irregularidad, distorsión, adelgazamiento, cicatrización, así como astigmatismo irregular, miopía, aberraciones ópticas de alto orden^{41, 42} y, en consecuencia, disminución de la visión. Típicamente la enfermedad comienza en la pubertad con una progresión variable hasta el decenio de los '30 o de los '40 años. No existen resultados concluyentes con respecto a la mayor frecuencia de pacientes de un género u otro en el queratocono.¹

Los estadios más precoces de la enfermedad suelen pasar inadvertidos, y es frecuente que el paciente acuda a consulta solo cuando se percata de la disminución de la visión y es entonces que se realiza el diagnóstico.⁴³ En ocasiones, el paciente asiste por primera vez al especialista en Oftalmología con el fin de ser estudiado para valorar una cirugía refractiva por su astigmatismo, miopía, o ambos. En estadios avanzados del queratocono, los pacientes pueden referir también fotofobia y diplopia monocular.

Es frecuente que los pacientes con queratocono no logren una visión adecuada con el uso de espejuelos, por lo que recurren habitualmente al uso de lentes de contacto. En algunos casos, incluso con el uso de esta corrección, no se obtiene una adecuada visión;¹⁶ en otros, los pacientes no toleran su uso, por lo que se requiere un procedimiento quirúrgico.¹⁰

El diagnóstico clínico de esta enfermedad puede realizarse mediante la detección de signos específicos, mediante biomicroscopía anterior y otros medios que estudian la córnea.^{44, 45} La observación del llamado “reflejo en tijeras” durante la realización de la retinoscopía es uno de los primeros signos que se hacen evidentes.²

Otro hallazgo que permite sospechar la presencia de la enfermedad es la observación de distorsión en los anillos de Plácido, en la imagen de las miras del queratómetro, reflejadas en la superficie corneal anterior.³⁸

Durante el desarrollo de la ectasia se incrementa la curvatura de la superficie corneal, tanto anterior como posterior,⁴⁶ y las lecturas de las queratometrías se hacen mayores. Además, aparece astigmatismo irregular⁴⁷ y miopía; no obstante, la existencia de hipermetropía no lo descarta, aunque es muy poco frecuente que coexista el queratocono con esta ametropía.¹

En casos más avanzados, la biomicroscopía anterior revela mayor visibilidad de las fibras nerviosas en el estroma, conicidad (generalmente central o paracentral inferior), estrías de Vogt, depósito de hierro en el epitelio corneal en forma de anillo, parcial o total (anillo de Fleischer), localizado en la base del cono, opacidades y adelgazamiento que se puede confirmar mediante la realización de paquimetría. Además, puede observarse el signo de Munson, que consiste en una protusión de la córnea en forma de “V” en relación con el borde libre del párpado inferior cuando el paciente dirige la mirada hacia abajo.⁴⁸

La topografía corneal genera mapas de la superficie corneal (anterior y más recientemente de la posterior) con códigos de colores diseñados según la curvatura de la córnea e índices topográficos que permiten sospechar el diagnóstico de la enfermedad en estadios incipientes.^{49, 50} Este examen permite evolucionar estas características de la superficie corneal en los pacientes con queratocono, así como diferenciarlo de otras enfermedades ectásicas, degeneraciones corneales y alteraciones causadas por el uso de lentes de contacto. Es característico observar en córneas con esta enfermedad, determinadas áreas con elevado poder dióptrico rodeadas de áreas concéntricas de menor poder. En la mayoría de los casos, estas áreas son

excéntricas, especialmente en el sector inferior, seguido del sector central, y con menor frecuencia, superiores; con asimetría del patrón astigmático y alteración de los índices topográficos.⁴⁸

1.2. Microscopía confocal de la córnea normal

El estudio de la córnea mediante la microscopía confocal in vivo ha incrementado el arsenal de conocimientos con relación con esta estructura ocular en condiciones fisiológicas y patológicas.

En 1955, Minski expresó por primera vez el concepto “confocal”, en el cual plantea que la imagen final es obtenida al enfocar el haz de luz en el mismo plano del lente objetivo, dándole a la técnica el nombre familiar de microscopía confocal.⁵¹

Subsecuentemente, en 1968, Petran y colaboradores desarrollaron el primer microscopio confocal Tandem scanning. Sin embargo, no fue hasta 20 años más tarde que este microscopio fue usado para examinar tejidos oculares. En 1985, Lemp y colaboradores fueron los primeros en obtener imágenes a espesor completo de córneas humanas ex vivo.⁵¹

En paralelo con el desarrollo del microscopio Tandem scanning, se desarrolló el microscopio confocal de escaneo en hendidura Confoscan, disponible comercialmente para uso clínico e investigativo en seres humanos, desde el año 1995.^{51, 52} Este es el microscopio confocal más difundido en Cuba, introducido en el año 2004 en el país y en el 2006 en Pinar del Río.

Los microscopios confocales de escaneo en hendidura, como el Confoscan, usan una apertura vertical para la iluminación y observación del campo. Dos espejos de dos lados que oscilan rápidamente, escanean las imágenes confocales al atravesar el campo. El ancho de la apertura en hendidura (300 μm), así como una considerable profundidad de campo (26 μm) permiten un incremento del paso de la luz, lo cual mejora el brillo y contraste del campo en relación con el microscopio confocal Tandem. Como resultado, las estructuras aparecen más brillantes y con más detalles.⁵³

La córnea está constituida por cinco capas: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio.⁵⁴ Mediante el microscopio confocal Confoscan es posible analizar el epitelio, plexo nervioso subbasal, estroma, nervios estromales y endotelio.⁵⁵ La resolución y magnificación

disponibles permiten obtener imágenes de las células de la córnea y de sus núcleos en algunos casos, pero no del resto de los organelos.⁴⁸

El epitelio corneal posee tres subpoblaciones celulares con características diferentes: células superficiales, células aladas o intermedias y células basales.⁴⁸

Las células epiteliales superficiales son poligonales, con núcleo visible rodeado de una banda oscura en forma de anillo y sus bordes celulares son brillantes. Las células en conjunto presentan diferente tamaño y reflectividad.^{17, 56}

Las células intermedias o aladas presentan la menor reflectividad de todas las células de la córnea; como consecuencia, su visualización es difícil y poco frecuente mediante el empleo del Confoscan. Se caracterizan por ser células poligonales, sin núcleo visible, citoplasma hiporreflectivo, aunque con variaciones en este parámetro entre las diferentes células, y sus bordes son brillantes. Estas células también muestran variación en su tamaño.^{17, 52}

Las células epiteliales basales forman un mosaico, en el que aparecen homogéneamente oscuras, con bordes celulares brillantes y su núcleo no es visible.⁵³

Al observar la membrana de Bowman con el Confoscan, no se precisan detalles de la misma en condiciones normales, solo su apariencia amorfa.⁵³

Esta es atravesada por el plexo nervioso subbasal.⁵⁷

El estroma corneal está constituido por queratocitos, las células principales de esta capa, dentro de una matriz extracelular de fibrillas de colágeno y proteoglicanos.⁵⁸

Los queratocitos, de acuerdo a su función, se asemejan a las células fibroblásticas, ya que producen, degradan y remodelan el estroma. Además regulan el tamaño de las fibrillas de colágeno y el espaciado dentro de la matriz de proteoglicanos, lo cual contribuye al mantenimiento de la transparencia de la córnea.⁵⁸

Es posible que, de manera similar a la densidad de células endoteliales, se requiera una densidad mínima de queratocitos para mantener la transparencia corneal.⁵⁶

La morfología de los queratocitos fue descrita por primera vez en los años '50 y se usaron métodos histológicos ex vivo. Detalles ultraestructurales fueron posteriormente descubiertos mediante el empleo de la microscopía electrónica.

Más recientemente, marcadores fluorescentes usados con la microscopía

óptica han tenido éxito en la identificación ex vivo de queratocitos. El contenido estromal de ADN ha sido determinado con el fin de cuantificar la densidad de queratocitos, pero desafortunadamente todos estos métodos son invasivos y requieren procesamiento del tejido, lo cual es capaz de alterarlo.⁵⁹

En contraste con estos métodos, usamos la microscopía confocal de la córnea para cuantificar la densidad de queratocitos en el estroma. Al emplear este método, solo es posible observar los núcleos de estas células, los cuales se identifican como objetos brillantes. En sujetos sanos, los núcleos de los queratocitos se observan con menor tamaño en el estroma anterior en relación con el estroma posterior, con forma elíptica y más elongados hacia la periferia.⁵³

La matriz extracelular del estroma corneal se manifiesta como áreas hiporreflectivas, sin mostrar detalles de la misma, que rodean a los objetos brillantes que representan los núcleos de los queratocitos.¹⁷

En cuanto a las estructuras nerviosas; sin embargo, solo son observados haces de fibras nerviosas, y no fibras individuales.^{17, 59}

La córnea es uno de los tejidos más densamente innervados del organismo humano.⁶ Estudios previos sobre modificaciones en la densidad y morfología

de la inervación corneal han estado limitados por la pobre disponibilidad de tejido corneal sano para análisis ex vivo, así como por la rápida degeneración del tejido tras la muerte. Estos inconvenientes son rebasados por la microscopía confocal in vivo de la córnea, la cual provee imágenes de las secciones ópticas del tejido que permiten el análisis de las estructuras nerviosas del tejido en condiciones fisiológicas.^{6, 60}

La córnea humana está ampliamente inervada por nervios sensoriales y autonómicos. Los sensoriales, que constituyen la mayoría, derivan de la rama oftálmica del nervio trigémino. Los nervios autonómicos consisten en fibras simpáticas, derivadas del ganglio cervical superior, y fibras parasimpáticas originadas en el ganglio ciliar.^{6, 61}

El plexo nervioso subbasal está localizado entre la membrana de Bowman y el epitelio basal, y forma una red radiada de haces de fibras nerviosas que convergen con un patrón en espiral hacia un área localizada aproximadamente uno a dos mm inferior al ápice corneal.⁵⁷

Este plexo nervioso se origina de los nervios estromales que pasan a través de pequeñas fenestraciones de la membrana de Bowman y de nervios limbales subbasales periféricos. Las terminaciones nerviosas finales del plexo nervioso

subbasal penetran el epitelio corneal y son demasiado diminutas como para ser observados por los actuales microscopios confocales.⁵⁷

En las imágenes confocales, los haces de nervios subbasales aparecen como estructuras lineales bien definidas con reflectividad homogénea.⁶² En este plexo se observan bifurcaciones en sus ramas, más finas, con aspecto de letra Y, e interconectan haces de fibras con apariencia de letra H.^{6, 63}

En las imágenes confocales del estroma corneal es posible distinguir dos tipos diferentes de nervios, ambos localizados en el estroma anterior y medio; uno de ellos se caracteriza por ser estructuras lineales rectas, gruesas, frecuentemente con patrón bifurcado, con variaciones en su orientación. La segunda variedad de nervios estromales incluye nervios tortuosos, más finos, con menor densidad y son observables en una menor cantidad de pacientes.⁶⁴ No son perceptibles detalles internos de estos nervios.^{65, 66}

El endotelio corneal, por su parte, consiste en una monocapa de células hexagonales, dispuestas regularmente con bordes celulares oscuros y citoplasma brillantemente reflectivo.^{60, 67}

CAPÍTULO II. DISEÑO METODOLÓGICO

CAPÍTULO II. DISEÑO METODOLÓGICO

La descripción del diseño metodológico presentado en este capítulo abarca la clasificación de la investigación, los criterios de selección de pacientes, las variables analizadas y las técnicas y procedimientos empleados para dar respuesta a los objetivos trazados en esta investigación.

2.1. Clasificación de la investigación

Se realizó un estudio observacional, descriptivo y longitudinal prospectivo, en pacientes diagnosticados de queratocono en consulta entre enero de 2010 y enero de 2011.

2.2. Universo y muestra

Universo 1

Estuvo constituido por todos los pacientes atendidos en la consulta de Córnea y Cirugía refractiva del Hospital “Abel Santamaría Cuadrado”, en Pinar del Río.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con queratocono, definido por cumplir con, al menos, dos de las siguientes características:
 - Reflejo “en tijeras” a la retinoscopía.
 - Adelgazamiento corneal regional.
 - Protusión cónica de la córnea (signo de Munson).
 - Curvatura corneal aumentada.
 - Acumulación de hemosiderina en la base del cono (anillo de Fleisher).
 - Presencia de estrías de Vogt.
 - Patrón topográfico sugestivo de queratocono. Se aplicó el test modificado de Rabinowitz – McDonnell para confirmarlo.
2. Edad superior a 18 años.
3. Pacientes que otorgaron el consentimiento informado, por escrito (Anexo 1).

Criterios de exclusión:

Generales:

1. Tratamiento farmacológico sistémico con efectos oculares conocidos.

2. No cooperación para la realización de la microscopía confocal.

Oculares:

1. Antecedente de cirugía u otro tipo de trauma.
2. Otra enfermedad presente o referida.
3. Opacidad corneal.
4. Hiperreflectividad en imágenes confocales que dificulte el análisis de la misma.
5. Tratamiento tópico ocular (presente o culminado en un periodo inferior a tres meses con respecto al momento de estudio).
6. Usuarios de lentes de contacto por un tiempo superior a un año, en los últimos cinco años.

Universo 2:

Estuvo constituido por sujetos que cumplieron con los siguientes criterios:

Criterios de inclusión:

1. Edad superior a 18 años.
2. Ausencia de enfermedad sistémica presente o referida.
3. Ausencia de enfermedad ocular presente o referida.

4. Pacientes que otorgaron el consentimiento informado, por escrito (Anexo 1).

Criterios de exclusión:

1. No cooperación a la realización de la microscopía confocal.

Muestra 1

Quedó finalmente conformada por 352 pacientes con queratocono que cumplieron con los criterios establecidos en el periodo comprendido entre enero de 2010 y enero de 2011.

Muestra 2

Quedó finalmente conformada por 68 sujetos sanos que cumplieron con los criterios establecidos en el periodo comprendido entre enero de 2010 y enero de 2011.

La incorporación de un grupo de sujetos sanos en esta investigación, se debe a que no existe consenso aún en la literatura científica acerca de los parámetros

de normalidad de las variables morfométricas analizadas, excepto de la densidad celular en el endotelio corneal, pleomorfismo y polimegatismo.

2.3. Variables y su operacionalización

La selección de las variables a incluir en la investigación estuvo determinada por las revisiones bibliográficas realizadas que conforman el marco teórico de la presente investigación, así como por la opinión de la autora.

La descripción de las variables morfométricas se realizó agrupándolas según su relación con las subcapas de la córnea, ordenadas estas en sentido anteroposterior.

Operacionalización de variables:

-Densidad celular en el epitelio superficial. Variable cuantitativa continua.

El epitelio superficial fue identificado por presentar células poligonales de variado tamaño y reflectividad, con bordes celulares hiperreflectivos y núcleo visible. Se expresó en células/mm² (Anexo 2.1). Se estimó la densidad de estas células, mediante la siguiente fórmula: $Densidad = N/A$,⁵³ donde se define:

N: número de células; A: Área seleccionada (predefinida como área de ROI: 0.05).

- **Diámetro celular en el epitelio superficial.** Variable cuantitativa continua.

Se expresó en micrómetros (μm). El diámetro medio fue determinado al cuantificar el diámetro mayor de diez células, seleccionadas al azar en cada imagen confocal, con la ayuda del software NAVIS (Nidek Advanced Vision Information System). Posteriormente se calculó la media de esos valores.

- **Densidad celular en el epitelio basal.** Variable cuantitativa continua. El epitelio basal se definió como la capa epitelial más profunda, con células pequeñas, de bordes uniformemente brillantes, citoplasma homogéneo y núcleos no visibles (Anexo 2.2). Se estimó la densidad de estas células, expresada en células/ mm^2 , mediante la siguiente fórmula: Densidad = N/A ,⁵³.

- **Diámetro celular en el epitelio basal.** Variable cuantitativa continua. Se expresó en micrómetros. El diámetro medio fue determinado al cuantificar el diámetro mayor de diez células, seleccionadas al azar en cada imagen confocal, con la ayuda del software NAVIS. Posteriormente se calculó la media de esos valores.

- **Grosor del epitelio.** Variable cuantitativa continua. Fue expresado en micrómetros. El grosor del epitelio corneal se determinó mediante la cuantificación de la distancia entre los picos de reflectividad del epitelio

superficial y del plexo nervioso subbasal en la curva CMTF del software NAVIS (Anexo 2.3).

- Densidad del plexo nervioso subbasal. Variable cuantitativa continua.

Los nervios subbasales fueron definidos como todas las estructuras lineales que representan fibras nerviosas, localizados en posición anterior a las primeras imágenes en las que se visualizan los objetos brillantes que representan los queratocitos. (Anexo 2.4) Se expresó en mm/mm^2 .

Para la selección de las imágenes que contenían al plexo subbasal se tuvo en cuenta además que fueran aquellas que contenían el mayor número de fibras nerviosas a ese nivel. Se determinó la densidad de fibras nerviosas del plexo nervioso subbasal en las imágenes seleccionadas, como la suma de la longitud total de todas las fibras nerviosas visibles y sus ramas (mayores de 50 micrómetros), dividida entre el área predefinida de la imagen, expresada finalmente en mm/mm^2 .⁵³ Si la trayectoria de una fibra nerviosa subbasal se extendió a través de varias imágenes, su longitud total fue medida como si estuviera proyectada solo en una imagen confocal.

- Coeficiente de tortuosidad de fibras nerviosas del plexo subbasal.

Variable cualitativa ordinal. Se agruparon en cuatro categorías, según la clasificación de Olivera Soto, desde el Grado 0 hasta el IV^{65, 68} (Anexo 2.5).

- **Densidad de queratocitos en el estroma anterior.** Variable cuantitativa continua. Se expresó en células/mm³.

La imagen típica del estroma corneal en el Confoscan 4 se identificó por presentar numerosos objetos brillantes de forma y dimensiones que varían según la profundidad de la córnea que representa la imagen dada, rodeados de áreas hiporreflectivas.

El estroma anterior fue definido como las dos primeras imágenes nítidas (no borrosas y sin líneas de compresión) que contienen objetos brillantes. (Anexo 2.6)

En cada imagen seleccionada, cada observador, de manera independiente, contó los objetos brillantes, que representan núcleos de queratocitos, dentro del área predefinida, y usaron como método marcar cada objeto brillante por un punto en su centro; de esta forma se evitó contar doble o dejar de contar alguno de ellos. Los objetos truncados que contactan con los lados inferior o izquierdo del rectángulo, fueron contados, no así los que contactaron con los lados superior o derecho. La densidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula: $Densidad = N / A\delta$,⁵³ donde: N representó el número de objetos brillantes contados; A representó el área seleccionada del rectángulo (con

dimensiones: 212 × 238 μm; horizontal × vertical; mientras que δ representó la profundidad de campo, valor constante, equivalente a 26 micrómetros).

- **Densidad de queratocitos en el estroma medio.** Variable cuantitativa continua. Se expresó en células/mm³.

El estroma medio se definió como las dos imágenes equidistantes entre la primera imagen de estroma anterior y el endotelio (Anexo 2.7). Se empleó el mismo método de cuantificación que en la densidad de queratocitos en el estroma anterior.

- **Densidad de queratocitos en el estroma posterior.** Variable cuantitativa continua. Se expresó en células/mm³. El estroma posterior se definió como las dos primeras imágenes nítidas localizadas inmediatamente anteriores al endotelio corneal (Anexo 2.8). Se empleó el mismo método de cuantificación que en la densidad de queratocitos en el estroma anterior.

- **Densidad de nervios estromales.** Variable cuantitativa continua.

Se definieron los nervios estromales como aquellas estructuras lineales brillantes de bordes bien definidos incluidas en imágenes confocales que contienen objetos brillantes que representan a los queratocitos⁵³ (Anexo 2.9).

Se determinó la densidad de fibras nerviosas en el plexo nervioso estromal como la longitud total del nervio / Área de ROI; expresada en mm/mm².

Para seleccionar la imagen a analizar del plexo nervioso estromal se identificó aquella que mostrara el nervio más largo a ese nivel.

-Densidad de células endoteliales. Variable cuantitativa continua. Se expresó en células/mm².

El endotelio corneal se definió como una monocapa de células hexagonales, dispuestas regularmente con bordes celulares oscuros, citoplasma brillantemente reflectivo y núcleos celulares no visibles (Anexo 2.10).

Se realizó automáticamente, a través del software NAVIS, previa selección de una imagen nítida de esta subcapa celular, donde fueron evaluadas como mínimo 50 células. (Anexo 2.11)

- Pleomorfismo endotelial. Variable cuantitativa continua. Fue expresada en porciento.

- Polimegatismo endotelial. Variable cuantitativa continua. Fue expresada en porciento.

- Paquimetría. Variable cuantitativa discreta. Representa el grosor total de la córnea. Se expresó en micrómetros. Se calculó mediante el cálculo de la

distancia entre el pico epitelial y el pico endotelial en la curva CMTE (Anexo 2.3).

- **Presencia de estrías de Vogt por biomicroscopía anterior.** Variable cualitativa nominal dicotómica. Fueron identificadas como líneas finas verticales en el estroma corneal, mediante el examen biomicroscópico anterior en lámpara de hendidura, con su máxima magnificación. Se consideró la siguiente escala:

- Sí o no.

- **Presencia de estrías de Vogt por microscopía confocal** (bandas estromales). Identificadas como bandas alternantes claro – oscuras localizadas en el estroma corneal (Anexo 2.12). Se tuvieron en cuenta solo los pacientes con grados II, III y IV de gravedad de queratocono. Se consideró la siguiente escala:

- Sí o no.

- **Extensión de las bandas estromales.** Variable cualitativa ordinal. Se agrupó de acuerdo con la siguiente clasificación; según la extensión de las bandas en las subregiones del estroma corneal:

Grado I: bandas presentes solamente en el estroma posterior.

Grado II: bandas presentes en el estroma medio y posterior.

Grado III: bandas presentes desde el estroma anterior hasta el posterior.

- **Orientación de las bandas estromales.** Variable cualitativa nominal politómica. Se agrupó de acuerdo con la siguiente clasificación; según la orientación de las bandas en las subregiones del estroma corneal:

- Vertical.

- Horizontal.

- Oblicua.

- **Grado de gravedad del queratocono.** Se agrupó de acuerdo con la siguiente clasificación:

Grado I: Astigmatismo aislado, agudeza visual mejor corregida $\geq 0,6$ con optotipo de Snellen y queratometrías hasta 48 D.

Grado II: astigmatismo, miopía, agudeza visual corregida 0,3 – 0.6; queratometrías hasta 52 D, anillo de Fleisher, incremento de visualización de fibras nerviosas, afinamiento del estroma corneal y distorsión del perfil anterior y posterior de la córnea;

Grado III: deformación transparente corneal, agudeza visual mejor corregida de $\leq 0,2$; queratometrías hasta 58 D y presencia de estrías de Vogt.

Grado IV: adelgazamiento del cono, rupturas de la membrana de Descemet, agudeza visual mejor corregida $\leq 0,05$ y queratometrías mayores de 59 D.

2.4. Recogida, procesamiento y análisis de los datos

En los pacientes con queratocono bilateral, se seleccionó el ojo derecho para el estudio.

En los sujetos sanos, solo el ojo derecho se seleccionó para el estudio.

Los datos fueron recogidos en el horario de la tarde para evitar el documentado edema corneal subclínico resultante del cierre palpebral durante el sueño.

En cada paciente se realizó interrogatorio y examen oftalmológico completo para verificar los criterios de inclusión o exclusión. El examen oftalmológico se realizaba en una etapa previa a la microscopía confocal de la córnea, para lo cual se empleó biomicroscopía anterior (en lámpara de hendidura 30 SL, Zeiss), oftalmoscopia indirecta (con oftalmoscopio indirecto HEINE Omega 180) y tonometría de aplanación (con tonómetro tipo Goldmann, APO 20).

Como medios complementarios para la realización del diagnóstico de queratocono se empleó: retinoscopia (retinoscopio NEITZ), biomicroscopia del segmento anterior (en lámpara de hendidura 30 SL, Zeiss), queratometría (con unidad de refracción NIDEK), topografía corneal (con topógrafo corneal Magellan) y paquimetría (con paquímetro ultrasónico Altair 2000, Optikon).

Para controlar la variabilidad en los resultados obtenidos en los exámenes que se realizaron a los pacientes, originados por el factor operador, solo se incluyeron en el estudio los casos definidos por la autora como sanos o con queratocono; mientras que los exámenes oculares que dependieron de un licenciado en óptica y optometría (retinoscopía, queratometría y refracción) fueron realizados en todos los casos por el de más experiencia de la institución.

Las características morfométricas in vivo de la córnea se analizaron mediante microscopía confocal. Para ello se empleó el Confoscan 4, (tecnología NIDEK, Aligned, Italia) (Anexo 2.13) microscopio confocal de cuarta generación que usa plataforma Microsoft Windows XP y software NAVIS.

Previo al procedimiento, se administró una gota de colirio anestésico (lidocaína; Quimefa). A continuación, la punta de la lente objetivo (Achroplan, marca Zeiss, Oberkochen, Alemania; de inmersión, x40, con apertura numérica = 0.75) y del anillo Z fueron cubiertas por una solución viscosa (gel de lágrimas artificiales; Novartis Ophthalmics, East Hanover). Por su parte, el paciente, sentado en una silla frente al Confoscan 4, colocaba la barbilla sobre la mentonera del equipo con la frente apoyada en la frentonera. Se le pidió que mirara a un punto fijo situado al frente. Posteriormente, con la ayuda del joystick manual del equipo,

el cual controla el eje “z”, se hizo avanzar la lente objetivo hasta que la solución de acoplamiento viscosa contactó la córnea, tras lo cual quedó una distancia entre la córnea y la lente de aproximadamente 1.92 milímetros. El operador, entonces, ajustó la posición de la lente hasta que quedó centrada en la córnea y presionó el botón para iniciar el escaneo confocal.

Cada serie de imágenes confocales (lo cual se consideró un escaneo) fue grabada mientras el plano focal avanzaba desde la capa más anterior de la córnea hacia la más posterior.

A pesar de que la adquisición de las imágenes requiere solo de 10 a 15 segundos por escaneo, el tiempo total requerido para realizar todo el procedimiento fue de 15 a 40 segundos, en dependencia de la cooperación del sujeto examinado.

La lente fue desinfectada antes y después de cada examen con alcohol isopropílico al 70 %.

La distancia entre las imágenes fue de 1 μm . La presión programada del anillo Z sobre la córnea fue de 20.⁵³ Las imágenes fueron adquiridas con la cámara en modo automático, digitalizadas y almacenadas directamente en la memoria de la computadora.

La separación en profundidad promedio entre imágenes adyacentes (profundidad de campo) fue de aproximadamente 26 μm . El ancho de la apertura en hendidura fue de 300 μm . Los pixeles estuvieron espaciados aproximadamente 0.56 μm horizontal y verticalmente.⁵³

Fueron programados cuatro pases en cada escaneo y se realizaron tres escaneos en cada ojo analizado, programados para ser realizados en la posición central de la córnea. Se grabaron un total de 350 imágenes secuenciales digitales por escaneo en cada córnea analizada.

Teniendo en cuenta que en las imágenes confocales existe una disminución gradual del brillo del campo hacia los bordes de la imagen, lo cual puede limitar la detección de las estructuras y detalles que se desean identificar, se empleó para el análisis de las imágenes una muestra de área (identificada por el software como área de ROI) limitada al centro del campo, donde el brillo es más uniforme y la intensidad de la luz fue fijada al 90%. Además, al considerar que el uso de diferentes límites de áreas analizadas puede afectar el resultado de la densidad que se reporta y la comparación de los resultados con otros investigadores, se asumió un área de ROI = 0,05.⁵³

Todos los escaneos fueron revisados, y aquel que presentara menos movimiento ocular lateral y menor movimiento anteroposterior de la córnea respecto a la lente, con imágenes más nítidas, fue seleccionado para el análisis.

Posteriormente, un observador experto, en los escaneos seleccionados, separó dos imágenes de cada uno de los siguientes niveles: epitelio superficial, epitelio basal, plexo nervioso subbasal, estroma anterior, estroma medio, estroma posterior y una imagen a nivel del endotelio corneal y plexo nervioso estromal.

Para controlar la variabilidad en los resultados originados por el factor operador, las imágenes confocales seleccionadas fueron presentadas al azar a dos observadores expertos por separado para realizar los cálculos correspondientes. Durante este proceso ambos ignoraban la profundidad de la córnea a la que pertenecía cada imagen.

Se asumió la media de la densidad calculada por los dos observadores independientes como el valor definitivo de densidad para cada imagen analizada. Luego se calculó la media de la densidad de las dos imágenes seleccionadas, en los casos en los que se definió esta cantidad de imágenes a analizar.

En los casos en los que los picos de intensidad en la curva CMTF (Confocal Microscopy Through Focusing) no aparecieron bien definidos, se definió manualmente la primera imagen enfocada de la capa que se deseó tomar como referencia para determinar el grosor de la subregión determinada.

Seguimiento de los pacientes

Los pacientes con queratocono que integraron la muestra fueron evaluados en consultas de seguimiento, efectuadas a intervalos de seis meses, hasta pasados dos años de la consulta inicial. El periodo de seguimiento fue desde enero de 2010 hasta enero de 2013.

Análisis estadístico

La información obtenida se llevó a una base de datos y fue procesada con el programa estadístico SPSS, versión 15.0.

La distribución normal de las variables cuantitativas continuas fue comprobada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En aquellas en las que se encontró una distribución normal, las pruebas estadísticas paramétricas fueron las empleadas, y en caso contrario, las no paramétricas.

En el análisis estadístico se empleó la estadística descriptiva, medidas de resumen para variables cuantitativas (media y desviación estándar) y cualitativas (frecuencias absolutas y porcentajes), según fuera más apropiado en cada situación.

La comparación de las medias de las variables morfométricas cuantitativas analizadas, obtenidas en la primera consulta de cada paciente, se realizó entre cinco grupos, cuatro de ellos conformados por pacientes con diferentes grados de gravedad del queratocono (I - IV) y uno compuesto por pacientes sanos, y fue ejecutada mediante ANOVA de clasificación simple. Cada media se calculó con su respectiva desviación estándar. Posteriormente, se realizaron comparaciones múltiples de las medias de las variables entre los grupos de pacientes con queratocono con respecto al grupo de pacientes sanos, mediante la prueba de Scheffé. Se calculó el intervalo de confianza para las medias.

Para evaluar la concordancia entre la biomicroscopía anterior y la microscopía confocal para detectar la presencia de estrías de Vogt en los pacientes con queratocono, se utilizó el estadístico Kappa con su respectivo intervalo de confianza.

La asociación univariada de las variables morfométricas entre sí y con la gravedad del queratocono, se comprobó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Se realizó la comparación de las medias de las variables morfométricas cuantitativas entre las cinco consultas periódicas (inicial, seis meses, un año, un año y medio y 2 años), mediante ANOVA de medidas repetidas. Las comparaciones múltiples realizadas posteriormente fueron ajustadas en la prueba de Bonferroni.

Para todas las pruebas estadísticas realizadas, el nivel de confiabilidad fue del 95%.

Los resultados se presentaron en tablas y figuras.

2.5. Consideraciones éticas:

El protocolo usado en este estudio recibió la aprobación del Comité de Ética de la Institución responsable. El mismo se adhiere a los principios de la Declaración de Helsinki.

Se respetó la confidencialidad de la información obtenida, y se garantizó su utilización únicamente para el desarrollo de esta investigación.

A todos los pacientes y familiares se les explicó en qué consistía el estudio y los exámenes que les serían realizados. Se explicó que de negarse a participar, esto no traería ninguna repercusión en su atención médica así como que en la investigación no se usaría nombre ni identificación legal, con el objetivo de mantener la privacidad de la información recogida. Los pacientes que aceptaron participar dieron su conformidad en la hoja de consentimiento informado (Anexo 1).

Por definición, el microscopio confocal no representa ningún riesgo para la salud ocular. A pesar de garantizar la seguridad para el operador y los sujetos estudiados, la compañía productora impone un límite en el periodo máximo de exposición para sujetos en estudio y operadores de 3000 segundos (50 minutos) en cualquier sesión de examen.

Ninguno de los sujetos examinados experimentó ningún síntoma visual o complicación corneal como resultado del examen con el microscopio confocal.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

CAPÍTULO III. RESULTADOS

En este capítulo se exponen los principales resultados obtenidos en la investigación en el periodo de estudio, en correspondencia con los objetivos de investigación propuestos.

Los valores medios de las variables relacionadas con el epitelio superficial y el grosor de esta subcapa, no demostraron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 1; Anexos 3.1-3.3). Las comparaciones múltiples realizadas posteriormente tampoco revelaron resultados significativos (Anexos 4.1 y 4.2).

En el epitelio corneal de los pacientes analizados, se observaron diferencias significativas entre los grupos en relación con las variables densidad y diámetro del epitelio basal ($p < 0,01$; Anexos 3.4 y 3.5). La tendencia fue que mientras la densidad de las células basales decreció al avanzar en gravedad la enfermedad, su diámetro experimentó el efecto contrario (Tabla 1).

Al realizar posteriormente las pruebas de comparaciones múltiples, en el caso de la densidad del epitelio basal, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos de pacientes con queratocono grados II, III y IV con

respecto a los sanos. Lo mismo se observó en cuanto al diámetro de las células epiteliales basales en pacientes con queratocono grados III y IV (Tabla 1; Anexo 4.3).

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de las variables del epitelio corneal según grupos.

Variables	Sanos n = 68 (Media ± DS)	Queratocono Grado -I n = 148 (Media ± DS)	Queratocono Grado -II n = 115 (Media ± DS)	Queratocono Grado -III n = 73 (Media ± DS)	Queratocono Grado -IV n = 16 (Media ± DS)	p ^a
Densidad del epitelio superficial (células/mm ²)	1092,1 ± 97,5	1086,5 ± 103,2	1078,4 ± 118,6	1077,8 ± 102,2	1085,9 ± 105,3	0,978
Diámetro de células en epitelio superficial (µm)	23,6 ± 0,8	23,6 ± 0,8	23,6 ± 0,8	23,6 ± 0,7	23,8 ± 0,7	0,883
Densidad del epitelio basal (células/mm ²)	5522,4 ± 593,3	5279,2 ± 697,8	4908,6 ± 567,1	4427,4 ± 473,8	4389,5 ± 288,4	<0,01
Diámetro de células en epitelio basal (µm)	10,1 ± 0,7	10,4 ± 0,7	10,6 ± 0,8	11,9 ± 1,1	12,1 ± 1,2	<0,01
Grosor epitelial (µm)	44,3 ± 4,6	43,3 ± 5,8	43,2 ± 5,3	42,7 ± 5,2	43,8 ± 5,3	0,768

a: ANOVA de clasificación simple.

Al aplicar la prueba ANOVA de clasificación simple, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) en cuanto a la densidad y tortuosidad del plexo nervioso subbasal entre los grupos analizados (Tabla 2; Anexos 3.6 y 3.7). Se observó que los pacientes con estadios más severos de la enfermedad tuvieron menor densidad y mayor coeficiente de tortuosidad de estos nervios, que los pacientes sanos. En las pruebas que se realizaron con posterioridad, se demostró que estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$) desde el grado I de gravedad de la enfermedad, en el caso de la densidad, y a partir del grado II en relación con el coeficiente de tortuosidad. Estas diferencias de medias fueron mayores mientras más severa era la enfermedad (Anexo 4.4).

La densidad de nervios estromales, por su parte, no mostró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 2) ni en las comparaciones múltiples realizadas posteriormente (Anexo 4.4).

Tabla 2. Estadísticos descriptivos de las variables de los nervios corneales según grupos.

Variables	Sanos n=68 (Media ± DS)	Queratocono Grado -I n=148 (Media ± DS)	Queratocono Grado -II n=115 (Media ± DS)	Queratocono Grado -III n=73 (Media ± DS)	Queratocono Grado -IV n=16 (Media ± DS)	p ^a
Densidad del plexo nervioso subbasal (mm/mm ²)	7,992 ± 1,331	6,321 ± 1,268	5,682 ± 1,092	4,546 ± 0,885	3,792 ± 0,749	< 0,01
Coefficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal	1,10 ± 0,298	1,23 ± 0,469	1,82 ± 0,896	2,46 ± 1,127	3,33 ± 0,778	< 0,01
Densidad del plexo estromal (mm/mm ²)	2,881 ± 1,134	2,942 ± 1,325	2,911 ± 1,058	2,977 ± 1,404	3,208 ± 0,941	0,942

a: ANOVA de clasificación simple.

En el estroma corneal de los pacientes estudiados, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos en cuanto a la densidad de queratocitos en todas las porciones del estroma analizadas. La media máxima de esta variable morfométrica se encontró en la porción anterior del estroma corneal y disminuyó a medida que era mayor la profundidad del tejido en sentido anteroposterior, tanto en sujetos sanos como en los pacientes con queratocono (Tabla 3).

Las comparaciones múltiples realizadas posteriores al análisis de varianza revelaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en cuanto a la densidad de

queratocitos en las subregiones del estroma corneal anterior y medio entre todos los grupos de pacientes con queratocono y los sujetos sanos; mientras que en el estroma posterior, estas diferencias fueron significativas solamente en los pacientes con queratocono grado III ($p < 0,05$) y grado IV ($p < 0,01$) con respecto a los sujetos sanos (Anexo 4.5).

La disminución de la densidad de queratocitos entre las porciones del estroma analizadas, resultó estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en cada uno de los grupos estudiados (Anexo 5).

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de las variables del estroma corneal según grupos.

Variables	Sanos n = 68 (Media ± DS)	Queratocono Grado -I n = 148 (Media ± DS)	Queratocono Grado -II n = 115 (Media ± DS)	Queratocono Grado -III n = 73 (Media ± DS)	Queratocono Grado -IV n = 16 (Media ± DS)	p ^a
Densidad de queratocitos en el estroma anterior (mm/mm ³)	30113,2 2 ± 2010,09 0	27667,75 ± 2668,251	25043,53 ± 2683,085	23978,04 ± 2031,363	23475,58 ± 1051,632	< 0,01
Densidad de queratocitos en el estroma medio (mm/mm ³)	18941,2 0 ± 1333,29 6	17722,65 ± 1116,445	17515,26 ± 1096,377	16504,07 ± 1268,275	15975,83 ± 1546,512	< 0,01
Densidad de queratocitos en el estroma posterior (mm/mm ³)	16466,8 4 ± 1447,29 1	15813,67 ± 1528,496	15494,68 ± 1666,026	14772,31 ± 1190,917	14011,67 ± 1782,628	< 0,01

a: ANOVA de clasificación simple.

Las estrías de Vogt se observaron en el 36,36% de los pacientes con queratocono a través del microscopio confocal, y en el 30,39% mediante biomicroscopía anterior. Nótese que, si bien en la mayoría de los pacientes este signo fue visible mediante ambos métodos de observación, y que el Índice de Kappa revela que existe una buena concordancia entre los dos métodos, en dos de ellos fue posible mediante la biomicroscopía anterior y no en las imágenes confocales; mientras que en 23 se evidenciaron mediante microscopía confocal y no a través del otro método de observación aplicado (Tabla 4).

Tabla 4. Presencia de estrías de Vogt según métodos de observación.

		Microscopía confocal	
		Presentes (n=128)	Ausentes (n= 224)
Estrías de Vogt	Presentes (n= 107)	105	2
	Ausentes (n= 245)	23	222
Biomicroscopía anterior			
K= 0,84		IC de 95%: 0,78 – 0,90	p<0,01

El examen minucioso de las imágenes confocales reveló que las bandas presentaban variación de su orientación y extensión en el estroma. De acuerdo con su extensión en este estrato de la córnea, en los pacientes con queratocono predominaron los grados I y II (Tabla 5).

Las bandas en el estroma posterior y medio (grados I y II) avanzaron en una dirección aproximadamente vertical en la mayoría de los casos, mientras que en el estroma anterior (grado III) su orientación varió al ser predominantemente oblicua (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de pacientes según la extensión y orientación de las bandas estromales (estrias de Vogt).

Extensión de las bandas	Orientaciones de las bandas				Total	
	Vertical		Oblicua		Número	%
	Número	%	Número	%	Número	%
Grado I	85	77,27	6	33,33	91	71,09
Grado II	22	20,00	3	16,67	25	19,53
Grado III	3	2,73	9	50,00	12	9,38
Total	110	100	18	100	128	100

En el estroma anterior, las bandas estromales solamente fueron observadas en los casos más severos de queratocono.

En el endotelio corneal, como muestra la tabla 6, no se observaron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a densidad celular, pleomorfismo y polimegatismo. Las comparaciones múltiples realizadas con posterioridad al análisis de varianza no revelaron resultados significativos en cuanto a la diferencia de medias de estas variables entre los pacientes con queratocono y los sujetos sanos estudiados (Anexo 4.6).

Tabla 6. Estadísticos descriptivos de las variables del endotelio corneal según grupos.

Variables	Sanos n=68 (Media ± DS)	Queratocono Grado -I n=148 (Media ± DS)	Queratocono Grado -II n=115 (Media ± DS)	Queratocono Grado -III n=73 (Media ± DS)	Queratocono Grado -IV n=16 (Media ± DS)	p ^a
Densidad (células/ mm ²)	2597,44 ± 227,658	2571,44 ± 203,799	2565,68 ± 235,311	2573,96 ± 128,168	2617,75 ± 212,105	0,915
Pleomor- fismo (%)	47,435 ± 10,335	48,442 ± 9,395	48,434 ± 9,076	48,329 ± 9,729	49,275 ± 6,241	0,968
Polimega- tismo (%)	24,834 ± 6,477	24,406 ± 6,191	25,245 ± 7,6537	25,077 ± 6,384	24,017	0,972

a: ANOVA de clasificación simple.

En la tabla 7 se presentan los valores medios del grosor de la córnea para cada grupo. Se encontró que difieren significativamente ($p < 0,01$) entre los grupos. Como puede observarse, estos valores fueron menores en la medida en que la gravedad de la enfermedad era superior. Las comparaciones múltiples realizadas después del análisis de varianza, revelaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre todos los grupos de pacientes con la enfermedad y los sujetos sanos, en relación con este parámetro morfométrico (Anexo 4.7).

Tabla 7. Estadísticos descriptivos de la paquimetría corneal según grupos.

Variable	Sanos n=68 (Media ± DS)	Queratocono Grado -I n=148 (Media ± DS)	Queratocono Grado -II n=115 (Media ± DS)	Queratocono Grado -III n=73 (Media ± DS)	Queratocono Grado -IV n=16 (Media ± DS)	p ^a
Paquimetría (µm)	557,63 ± 22,677	489,79 ± 20,154	471,39 ± 22,927	430,69 ± 21,990	370,92 ± 54,298	< 0,01

a: ANOVA de clasificación simple.

Seguidamente se analizaron las asociaciones entre las variables morfométricas entre sí, y entre estas y la gravedad del queratocono.

La tabla 8 ofrece la asociación univariada entre las variables morfométricas de la córnea y la gravedad de la enfermedad. En ella se observa que no existió asociación significativa entre la gravedad del queratocono y los parámetros estudiados del epitelio superficial y endotelio, grosor del epitelio y densidad de nervios estromales.

En cambio, la asociación con la gravedad de la enfermedad resultó significativa en los siguientes parámetros (Tabla 8) densidad y diámetro celular del epitelio basal ($p < 0,01$), densidad y coeficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal ($p < 0,01$), densidad de queratocitos en el estroma anterior ($p < 0,01$), medio ($p < 0,01$) y posterior ($p < 0,05$), y paquimetría ($p < 0,01$).

Teniendo en cuenta el valor del coeficiente de correlación de Spearman, la variable que mostró mayor relación con la gravedad del queratocono, fue la paquimetría, seguida por la densidad de queratocitos en el estroma anterior y las relacionadas con el plexo nervioso subbasal. En contraste con este resultado, se observa que el nivel de correlación de la densidad de queratocitos en el estroma posterior con la gravedad de la enfermedad fue el más bajo; aunque resultó significativo desde el punto de vista estadístico, la asociación fue débil.

El signo del coeficiente nos indica que la tendencia fue que, a mayor gravedad del queratocono, existió menor densidad de células en el epitelio basal y estroma anterior, menor densidad del plexo nervioso subbasal y grosor corneal, y mayor diámetro celular en el epitelio basal y coeficiente de tortuosidad en el plexo nervioso subbasal.

Tabla 8. Asociación univariada entre la gravedad del queratocono y las variables morfométricas.

Variables morfométricas	Rho de Spearman	p
Densidad celular en el epitelio superficial	-0,066	0,198
Diámetro celular en el epitelio superficial	0,044	0,285
Densidad celular en el epitelio basal	- 0,516	<0,01
Diámetro celular en el epitelio basal	0,472	<0,01
Grosor epitelial	-0,093	0,115
Densidad del plexo nervioso subbasal	- 0,630	<0,01
Coefficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal	0,502	<0,01
Densidad de nervios estromales	0,039	0,309
Densidad de queratocitos en estroma anterior	- 0,722	<0,01
Densidad de queratocitos en estroma medio	- 0,562	<0,01
Densidad de queratocitos en estroma posterior	- 0,373	<0,01
Densidad celular en el endotelio	- 0,041	0,299
Pleomorfismo	0,041	0,301
Polimegatismo	-0,024	0,378
Paquimetría	- 0,898	<0,01

En los pacientes con queratocono se encontró correlación significativa entre los siguientes pares de variables morfométricas:

1. Densidad y diámetro celular en el epitelio basal ($r = -0,288$; $p < 0,01$).
2. Densidad celular en el epitelio basal y densidad de queratocitos en el estroma anterior ($r = 0,445$; $p < 0,01$).
3. Densidad del plexo nervioso nervioso subbasal y densidad de queratocitos en el estroma anterior ($r = 0,541$; $p < 0,01$).

4. Densidad de queratocitos en el estroma anterior y paquimetría ($r = 0,624$; $p < 0,01$).

El resultado de este análisis fue estadísticamente significativo en los cuatro pares de variables anteriormente expuestos; sin embargo, el valor de esa correlación indica que la relación de la densidad del plexo nervioso subbasal y la paquimetría con la densidad de queratocitos en el estroma anterior constituyeron las asociaciones más importantes.

Se realizó otro análisis en el que se consideró la evolución de las características morfométricas en los pacientes con queratocono, según la gravedad de la enfermedad (Anexos 6.1 – 6.10). Durante el tiempo de seguimiento, solamente la densidad de queratocitos en el estroma anterior en pacientes con queratocono grado IV ($p < 0,05$) y la paquimetría en todos los grados de gravedad ($p < 0,01$), sufrieron modificaciones estadísticamente significativas.

El anexo 6.11 muestra que la densidad de queratocitos en el estroma anterior experimentó un descenso estadísticamente significativo ($p < 0,01$), a partir de un año y medio de seguimiento, al aplicar la prueba ANOVA de medidas repetidas con corrección por la prueba de Bonferroni.

Como resultado del mismo procesamiento estadístico, se probó que la paquimetría descendió significativamente ($p < 0,01$), a partir de 1 año de seguimiento en los pacientes con grado I de gravedad de la enfermedad, y desde los seis meses ($p < 0,01$) en el resto de los pacientes con queratocono (Anexos 6.12 – 6.15). Sin embargo, al observar el valor en que disminuyó el grosor corneal en cada uno de los grados de gravedad, se observa que representa un descenso clínicamente significativo en los grados III y IV (Anexos 6.14 y 6.15).

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En este acápite se realiza una comparación de los resultados obtenidos con publicaciones recientes acerca del tema y se exponen consideraciones que otorgan validez a la investigación.

Con respecto al epitelio corneal de pacientes con queratocono, las células superficiales son identificadas como las menos afectadas de las estudiadas en esta capa del tejido, en relación con los sujetos sanos, lo cual coincide con las investigaciones consultadas.⁶⁹⁻⁷¹ Algunos autores describen desde el punto de vista cualitativo haber observado elongamiento de algunas de estas células, dispuestas en un patrón en espiral en la región del ápice del cono.^{69, 70} Desde el punto de vista cuantitativo, no es frecuente que se reporten sus características como en el caso de las basales.

Existe consenso entre los investigadores en que son las células basales las que se encuentran más afectadas en el epitelio corneal de pacientes con queratocono.⁷¹

La disminución de la densidad celular en imágenes confocales del epitelio basal ha sido observada por Niederer⁶⁹, Patel⁷² y Yenziad,⁷¹ lo cual contrasta

con los resultados de Uçakhan⁷³, quien encontró aproximadamente el doble del valor de la variable en los pacientes con esta ectasia.

Patel⁷² obtuvo valores significativamente menores de este parámetro en los pacientes con queratocono usuarios de lentes de contacto que en los que no lo eran. Los resultados en este particular sugieren que el epitelio basal puede estar involucrado en los procesos fisiopatológicos del queratocono, y que las alteraciones epiteliales se agravan posteriormente por el uso de lentes de contacto, muy frecuente en los pacientes con esta enfermedad.

Niederer⁶⁹ además encontró correlación lineal significativa entre la densidad del epitelio basal y el grado de gravedad del queratocono.

El elongamiento de estas células ha sido informado por Hollingsworth,⁷⁰ Niederer⁶⁹ y Patel⁷².

Mientras tempranos estudios por microscopía electrónica ya sugerían que las anomalías primarias en el queratocono residen en el epitelio corneal, subsecuentes estudios han documentado alteraciones en el plexo nervioso subbasal, nervios estromales, queratocitos, y endotelio.

La presente investigación confirma que la arquitectura del plexo nervioso subbasal está alterada en las córneas con queratocono, de manera significativa desde el grado I de gravedad clínica de la enfermedad.

Las características morfométricas in vivo de este plexo, específicamente en pacientes con queratocono, no han sido ampliamente estudiadas, ya que los autores se han enfocado más en el análisis de las características de las poblaciones celulares del epitelio, estroma y endotelio. Muchas de las investigaciones que abordan esta temática lo hacen de una manera cualitativa, minada por la subjetividad,⁷⁴ con pocos pacientes, por demás sin tener en cuenta la relación entre las alteraciones de las fibras nerviosas con la gravedad de la ectasia.²⁰

Niederer⁶⁹ y González – Sotero⁷⁵ describen hallazgos similares a los descritos en este estudio; además plantean haber encontrado asociación significativa entre la densidad nerviosa subbasal y la gravedad de la enfermedad.

Varios autores han sugerido que los nervios corneales están implicados en la fisiopatología y progresión del queratocono. Brookes⁷⁶ aportó evidencia que sugiere que los procesos destructivos encontrados en córneas con queratocono involucran a sus nervios, mediante la liberación de enzimas

proteolíticas (catepsina B y G) a este nivel, mayor en córneas con queratocono que en las normales.⁷⁷

Patel y McGhee⁷⁸ realizaron un montaje bidimensional de las imágenes confocales de cuatro pacientes con queratocono, y obtuvieron un mapeo de este plexo, asociado con la localización topográfica del cono, donde se observó en el ápice del cono una tortuosa red de haces de fibras nerviosas, con una orientación predominantemente oblicua y horizontal. En la base topográfica del cono la orientación nerviosa era curvilínea, y ofrecía la impresión de seguir el contorno de la base, concéntricamente. Esta novedosa técnica de procesamiento de imágenes aporta una visión panorámica de los cambios observados en las imágenes confocales individuales. La densidad del plexo en la córnea central se encontró significativamente disminuida, incluso en el caso donde la enfermedad era leve.

Estudios que usan el microscopio confocal láser han reportado la densidad en 20.3⁵⁹ y 21.7 mm/mm², mientras que otros han empleado el microscopio Tandem o el de escaneo en hendidura, los que estiman su valor normal en 8.4 y 11.1 mm/mm², respectivamente. Son varios los factores que influyen en estas

diferencias, entre ellos el método en que es definido el parámetro y el tipo de microscopio confocal empleado.⁶⁰

En la bibliografía consultada, los autores coinciden en que la densidad de fibras nerviosas en el estroma corneal de pacientes con queratocono no se encuentra alterada.⁷⁹ Sin embargo, centran más su atención en observar el diámetro de estos haces de fibras nerviosas. Al respecto, algunos reportan su engrosamiento.⁶⁹

El incremento en la visibilidad de las fibras nerviosas en el examen físico oftalmológico es un signo frecuente en el queratocono, y las fibras nerviosas prominentes han sido reportadas entre el 34 y 91 % de estos pacientes.⁵⁵

Sin embargo, la medición del diámetro de las fibras estromales posee un elevado riesgo de ser inexacto, ya que estos nervios comúnmente transcurren oblicuamente en relación con el frente de la sección de la imagen confocal.⁸⁰ La sección no es, por tanto, siempre por el centro del nervio, y en consecuencia, una sección descentrada provocaría que el nervio pareciera falsamente delgado. La orientación del nervio estromal también es un factor importante cuando se considera el análisis de la densidad nerviosa, distinto del análisis de la densidad del plexo subbasal. La longitud de los nervios visibles por área

variará con la trayectoria del nervio a través del campo, pero eso no está necesariamente relacionado con la densidad en el estroma.

Por consiguiente, a pesar de observarse mayor visibilidad de nervios corneales en el queratocono, la presente investigación no puede revelar un resultado de este parámetro, desde el punto de vista morfométrico, libre de sesgos.

Algunos autores han planteado la posibilidad de que los nervios corneales sean más visibles en el queratocono debido al adelgazamiento de la córnea;⁶⁹ sin embargo, en algunos pacientes, se esperaría encontrar mayor prominencia en relación con sus menores valores de grosor corneal, hecho que hace dudar de esta hipótesis.

Resulta paradójico, por demás, que exista aumento del diámetro de los nervios del estroma corneal en sujetos con queratocono; en cambio, se comprueba disminuida la densidad nerviosa en el plexo nervioso subbasal, cuando ambos guardan una relación anatómica directa, detalladamente descrita por Al – Aqaba,⁵⁷ en el año 2010.

Los queratocitos son células fibroblásticas presentes en el estroma corneal, responsables del mantenimiento de la integridad de esta capa de la córnea, a través de la síntesis de fibras colágenas y matriz extracelular.^{1, 58}

La densidad de queratocitos, medida por microscopía confocal, coincidió con la obtenida en trabajos previos donde se medía mediante la cuantificación del contenido de ADN, lo cual avala la exactitud de los cálculos in vivo.

En la presente investigación se demostró que la densidad de queratocitos presenta sus máximos valores en la proximidad a la membrana de Bowman y declinan a medida que se incrementa la profundidad del estroma, tanto en córneas sanas como con queratocono, lo cual coincide con la bibliografía consultada.^{21, 71} Sin embargo, es precisamente esta subregión del estroma la más afectada en el queratocono, con una asociación significativa con la gravedad de la ectasia. A medida que el estroma es más profundo, menor alteración cuantitativa, así como asociación con la enfermedad, se aprecia en relación con los queratocitos.

Si bien existe coincidencia entre la mayoría de los investigadores en lo anteriormente planteado, se observan diferencias en las cifras que reportan de la densidad de queratocitos. La autora opina que en este particular influyen los diferentes criterios que tienen en cuenta los autores para delimitar cada una de las subregiones del estroma corneal, el método empleado para realizar los cálculos y el tipo de instrumento de medición empleado.⁸¹

Hollingsworth⁷⁰ observó que la densidad media de queratocitos anteriores y posteriores fueron significativamente inferiores en ojos con queratocono que en las de los sujetos controles; sin embargo no incorporan un grupo control para los que usan lentes de contacto o presentaron cicatrización corneal. Este autor sugiere que la reducción de la densidad de queratocitos posteriores puede ser explicada meramente por el adelgazamiento corneal.

Niederer⁶⁹ observó disminuida la densidad de queratocitos en sujetos con queratocono. Este autor provee evidencias de que estas variables están correlacionadas con la gravedad de la enfermedad.

Ku⁸² encontró en su estudio una significativa disminución de la densidad de queratocitos anteriores y posteriores en sujetos con queratocono usuarios de lentes de contacto con respecto al control. La densidad de queratocitos posteriores también se manifestó significativamente inferior en pacientes no usuarios de lentes de contacto. La reducción de la densidad de queratocitos anteriores, en este caso, no fue estadísticamente significativa, posiblemente debido al reducido tamaño de la muestra. No obstante, esta variable se encontró significativamente correlacionada con la gravedad de la ectasia.

Ozgur⁸³ evaluó la densidad de queratocitos anteriores y posteriores, en córneas de pacientes con queratocono no usuarios de lentes de contacto. Ambas estaban disminuidas en comparación con controles sanos. Sin embargo, en contradicción con lo planteado por otros autores, esta diferencia de densidad fue independiente del estadio del queratocono.

Con solo algunas excepciones,⁷¹ los autores evalúan la densidad de queratocitos en los extremos anterior y posterior del estroma corneal, por lo que la región intermedia está muy poco analizada. Yeniad⁷¹ estudió la densidad de queratocitos en esta subregión estromal, y obtuvo resultados similares a los encontrados en este trabajo.

Existe evidencia científica que indica que en la fisiopatología de la disminución de la población de queratocitos estromales observada en las córneas con queratocono respecto a los controles, están involucrados procesos de apoptosis.⁸⁴ Se ha reportado incremento de este fenómeno entre el 60 y 68% de las córneas con la enfermedad.

Se ha sugerido que el daño epitelial causa la pérdida de queratocitos anteriores por apoptosis, proceso iniciado por citoquinas [interleuquina 1 (IL-1) y Fas-ligand] liberadas desde las células epiteliales. Apoyan esta teoría la

observación de un elevado número de queratocitos anteriores que muestran signos de apoptosis en las córneas queratocónicas cuando se compara con córneas normales y con córneas que sufren otras enfermedades. Se ha demostrado que los queratocitos en las córneas con queratocono tienen cuatro veces más receptores para IL-1, sensibilizándolos potencialmente a esta citoquina.⁶⁹

La causa del daño epitelial mecánico crónico puede estar dada por el uso de lentes de contacto,^{85, 86} frotamiento ocular y enfermedades atópicas oculares, ya que estos elementos se han encontrado en varios estudios con predominio en pacientes con queratocono en relación con los sujetos controles.

La presente investigación avala esta relación estrecha entre los queratocitos y el epitelio, al encontrarse una correlación significativa entre la densidad de queratocitos en el estroma anterior y la densidad celular en el epitelio basal.

Otro elemento que puede estar relacionado con la menor densidad de queratocitos observada en el estroma corneal de córneas con queratocono es la menor densidad de nervios constatada en el plexo subbasal. Apoya esta hipótesis la observación de correlación significativa entre ambos parámetros. Además, la observación, tanto en córneas operadas de queratoplastia como en

las sometidas a cirugía refractiva láser, coexistencia del déficit de queratocitos y de nervios subbasales.⁸⁷⁻⁸⁹

Si bien la conclusión de que existe disminución en la densidad de queratocitos y de su correlación negativa con la gravedad del queratocono, observada en la presente investigación, ha conseguido coincidencia en la opinión de otros autores, los valores de esta variable microscópica in vivo han resultado muy diversas entre los diferentes estudios, lo que dificulta el contraste numérico de los resultados con parámetros que se consideren de referencia.⁹⁰

Este problema se debe a que la exactitud y precisión en la medición de la densidad celular está influenciada por parámetros ópticos del instrumento para registrar imágenes del estroma, tanto como por los métodos de identificación y conteo de células en estas imágenes.

Las estrías de Vogt constituyen un signo clásico observado en el estroma corneal de ojos con queratocono mediante biomicroscopía anterior. Con el microscopio confocal, se observan como bandas alternantes de luz y oscuridad.⁹¹

Los hallazgos en esta investigación, en coincidencia con los de Mocan,⁹² sugieren que las estrías de Vogt se observan a nivel microscópico antes que

con el empleo de la biomicroscopía anterior, lo cual le confiere mayor importancia al estudio microestructural de la córnea en los pacientes con queratocono.

Un importante estudio multicéntrico (Collaborative Longitudinal Study of Keratoconus Study) reveló la presencia de las estrías de Vogt mediante biomicroscopía anterior aproximadamente la mitad de los pacientes con queratocono analizados.⁹³

Hollingsworth⁹¹ también observó las estrías de Vogt mediante microscopía confocal con mayor frecuencia que a través de la biomicroscopía anterior. Niederer⁶⁹ y Mocan⁹² las observaron en aproximadamente dos tercios de la muestra. La autora considera que estos datos varían según las características de cada población estudiada y pueden estar influenciadas por la mayor proporción de pacientes con los grados más severos de la enfermedad en los estudios citados. Las estrías de Vogt constituyen un signo que se presenta de forma bilateral en un tercio de los pacientes con esta enfermedad corneal.⁹³ La presente investigación difiere además de las anteriormente mencionadas en que solo se analizó un ojo de cada paciente, lo cual puede constituir otro factor que influya en la diferencia de los resultados encontrados.

Las imágenes confocales obtenidas sugieren que las bandas estromales observadas a la microscopía confocal representan lamelas de colágeno bajo estrés más que pliegues, en coincidencia con la opinión de Hollingsworth⁹¹ y Mocan.⁹² Fundamentan esta afirmación los resultados descritos previamente y los obtenidos por otros investigadores. En este sentido, Komai and Ushiki⁹⁴ demostraron la diferente disposición de las lamelas de colágeno en el estroma anterior y posterior, al exponer que las lamelas anteriores tienen 0.5–30 μm de ancho, aspecto de cinta plana, se distribuyen en direcciones al azar y están frecuentemente entrelazadas; mientras que las lamelas del estroma posterior son anchas (100–200 μm) y tienen la apariencia de hojas o capas anchas.

Estudios que evalúan la fuerza de cohesión de las lamelas en el meridiano horizontal demostraron una reducción en la fuerza centralmente.⁹⁵ En relación con las lamelas en el meridiano vertical se ha demostrado que la córnea central parece tener la mayor reducción en la fuerza de cohesión y existe una segunda región con reducida fuerza inferiormente,⁹⁶ lo cual explica que su localización sea central o paracentral inferior, así como que la disposición sea vertical en la mayor parte de los casos.

El patrón de estrés de las lamelas de colágeno a partir del ápice del cono fue evidenciado por Hollingsworth,⁹¹ al realizar un análisis de las imágenes confocales en relación a la imagen topográfica obtenida.

Se le ha concedido una limitada atención al endotelio corneal en el estudio del queratocono. Los resultados obtenidos no se alejan de la mayoría de los estudios reportados, los cuales plantean que el endotelio no se afecta de manera significativa en el queratocono, excepto cuando aparece el hidrops corneal.⁹⁷

Notablemente, Niederer⁶⁹ percibió una pequeña, pero estadísticamente significativa baja densidad de células endoteliales en ojos con esta enfermedad.

Algunos autores han obtenido resultados que demuestran que los pacientes con queratocono pueden presentar menor densidad de células endoteliales corneales debido al uso de lentes de contacto,^{85, 98} que es un tipo de corrección óptica frecuente en ellos por las ametropías que genera la mayor curvatura de la córnea presente en esta enfermedad.

Sin embargo, Hollingswort⁷⁰ encontró que la densidad media de células endoteliales corneales en una serie de pacientes con queratocono fue superior en relación con el grupo control, diferencia que resultó estadísticamente significativa. La autora considera que en este resultado puede influir la escasa cantidad de pacientes analizados en ese estudio.

El tamaño de estas células, representado por el nivel de polimegatismo, presente en los ojos con queratocono, fue similar al de los ojos normales en el estudio de Hollingswort.⁷⁰

Teniendo en cuenta los resultados de esta investigación, la autora coincide con el criterio de quienes afirman que las variables morfométricas relacionadas con el endotelio corneal no se afecta de manera significativa en los pacientes con queratocono.

Un rasgo definitivo del queratocono es el adelgazamiento corneal, significativo y relacionado con la gravedad de la enfermedad ⁹⁹ A pesar de ello, no está definida su participación en la fisiopatología en esta enfermedad.

Al ser los queratocitos las células principales del estroma corneal, el cual representa aproximadamente el 90% del grosor de la córnea normal, al ser por demás, las que regulan y sintetizan la matriz extracelular en esta región de la

córnea, la autora coincide con el criterio de los que afirman que desempeñan un decisivo rol en el grosor de la córnea, y que la pérdida de grosor estromal presente en el queratocono puede ser debida a la pérdida de queratocitos, matriz extracelular o ambos.

Los investigadores han notado incremento en la apoptosis de queratocitos en el queratocono, así como un desbalance entre la síntesis y la actividad de las enzimas proteolíticas en el estroma corneal y sus correspondientes inhibidores.

1

Recientemente Li encontró una relación desde el punto de vista genético entre el espesor corneal central y el queratocono, vinculada a una variante del gen COL5A1, la cual sugiere que este genotipo desempeña un importante rol en el adelgazamiento corneal asociado a esta enfermedad.¹⁰⁰

Resultados de esta investigación, tales como una significativa disminución de la densidad de queratocitos en las regiones anterior, central y posterior del estroma corneal; correlación lineal significativa entre la paquimetría y la densidad de queratocitos en el estroma anterior y la disminución simultánea de ambos parámetros en el seguimiento de los pacientes, fundamentan la hipótesis de que el adelgazamiento corneal puede estar causado por la

disminución en la densidad de queratocitos. Ku⁸² también observó significativa la correlación entre ambas variables.

Dado que ninguno de los sujetos incluidos en el estudio es usuario de lentes de contacto, ni tiene antecedentes de operaciones o enfermedad oculares, y que las alteraciones microestructurales observadas en las imágenes confocales, se asocian significativamente con la gravedad de la enfermedad, es razonable sospechar que las alteraciones morfométricas observadas en el epitelio basal, plexo nervioso subbasal y queratocitos, están relacionadas con la etiopatogenia del queratocono. La autora considera que teniendo como base este conocimiento, se debe profundizar en el tema con nuevas investigaciones que aporten e integren información en vistas a dilucidar los procesos fisiopatogénicos que intervienen en esta enfermedad.

Si bien el estudio transversal de las características morfométricas de la córnea en pacientes con queratocono ofrece información valiosa sobre los cambios que acontecen a nivel celular, permitiéndonos este conocimiento describir más detalladamente en la historia clínica de cada paciente las alteraciones morfométricas encontradas, así como su relación con la gravedad, tanto desde el punto de vista clínico como microestructural, el análisis prospectivo de los

pacientes desde estadios incipientes de esta ectasia, aporta el orden en que aparecen las alteraciones y, por tanto, contribuye a sospechar el diagnóstico precozmente, lo cual pudiera contribuir además a la dilucidación de su patogenia, aún desconocida.

La autora considera que al observarse que la paquimetría y la densidad de queratocitos en el estroma anterior son los parámetros morfométricos no solo con mayor asociación con la gravedad de la enfermedad, sino también los que primero se alteran en los pacientes con queratocono, pueden constituir cambios primarios de la enfermedad, y que otras modificaciones encontradas pueden ocurrir secundariamente o como consecuencia de los mismos. Es necesario profundizar en este aspecto con nuevas investigaciones que aporten mayor información, en las que participe una cantidad superior de pacientes y sea más prolongado el tiempo de seguimiento..

No se encontraron estudios que analicen los cambios que acontecen en el tiempo, in vivo, en las características morfométricas de la córnea en pacientes con queratocono, por lo que no es posible realizar comparaciones al respecto.

En la práctica asistencial cotidiana se le debe conceder especial importancia a los pacientes con sospecha de queratocono en los que durante el seguimiento

de los parámetros microestructurales, se observen modificaciones, lo cual puede ser un elemento que oriente a la confirmación del diagnóstico.

Especialmente relevante resulta lo planteado anteriormente en aquellos pacientes con miopía y /o astigmatismo que solicitan ser evaluados para someterse a una cirugía refractiva corneal con Láser Excímer para corregir su ametropía, en los que los parámetros clínicos convencionales ofrezcan dudas sobre la completa normalidad de la córnea. En estos casos, de realizarse la operación y existir queratocono en un estadio preclínico, la consecuencia sería la aparición de la temida ectasia postquirúrgica.

CONCLUSIONES

Los pacientes con queratocono presentan una reducción de grosor corneal y de la población celular en el epitelio basal y estroma, así como alteraciones en la microarquitectura del plexo nervioso subbasal y lamelas de colágeno del estroma, más marcadas mientras mayor es la gravedad clínica de la enfermedad.

La microscopía confocal de la córnea permitió constatar, en pacientes con queratocono, que existe una asociación relevante entre la densidad celular del estroma anterior y la del epitelio basal, la densidad del plexo nervioso subbasal y el grosor corneal.

Los parámetros morfométricos de la córnea: grosor corneal, densidad de queratocitos en el estroma anterior, densidad del plexo nervioso subbasal, densidad celular en el epitelio basal, coeficiente de tortuosidad del plexo nerviosos subbasal y diámetro celular del epitelio basal, están asociados a la gravedad del queratocono, y los cinco primeros tienen mayor relevancia, lo cual indica una posible participación de estos en la fisiopatología de la enfermedad.

En pacientes con queratocono, los primeros parámetros morfométricos que sufren alteraciones son el grosor corneal y la densidad de queratocitos en el

estroma anterior, hecho que pudiera avalar su participación en los procesos etiopatogénicos primarios de esta enfermedad y orientar en su diagnóstico precoz.

RECOMENDACIONES

- Promover estudios longitudinales que analicen las características morfométricas in vivo de la córnea en pacientes con queratocono, desde sus estadios iniciales por un periodo de seguimiento más prolongado y así contribuir más en la dilucidación de la patogenia de esta enfermedad.
- Fomentar la realización de estudios multicéntricos en el país que permitan disponer de datos de prevalencia del queratocono en Cuba.
- Generalizar en el país la incorporación del análisis morfométrico in vivo de la córnea al estudio en consulta de los pacientes con queratocono.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Patel S. Characterisation of keratoconus. Br J Ophthalmol 2011;95:759-760.
2. Agrawal V. Characteristics of Keratoconus patients at a tertiary eye center in India. J Ophthalmic Vis Res 2011;6:87–91.
3. González–Sotero J, Casanueva-Cabeza HC, Alberro-Hernández M, Rojas-Alvarez E. Microscopía Confocal en las Distrofias Corneales. Arch Oftal B Aires 2011;82:33-39.
4. Wang M. Review of keratoconus and keratoctasia: prevention, diagnosis, and treatment New York, 2010:191.
5. Shirayama-Suzuki M, Amano S, Honda N, Usui T, Yamagami S, Oshika T. Longitudinal analysis of corneal topography in suspected keratoconus. Br J Ophthalmol 2009;93:34-37.
6. Patel DV MC. 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;93:853-860.
7. Moshirfar M, Edmonds JN, Christiansen SM. Corneal biomechanics in iatrogenic ectasia and keratoconus: A review of the literature. Oman J Ophthalmol 2013;6:12 -17.

8. Han D, Mehta JS, Por YM, Htoon HM, Tan DT. Comparison of outcomes of lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2009;148:744–751
9. Sharma R, Titiyal JS, Prakash G, Sharma N, Tandon R, Vajpayee RB. Clinical profile and risk factors for keratoplasty and development of hydrops in north Indian patients with keratoconus. *Cornea* 2009;28:367–370.
10. Yildiz E, Diehl GF, Cohen EJ, et al. Demographics of patients older than 50 years with keratoconus. *Eye Contact Lens* 2009;35:309-311.
11. Gothwal V, Reddy SP, Fathima A, Bharani S, Sumalini R, Bagga DK, Sudharman PM. Assessment of the Impact of Keratoconus on Vision-Related Quality of Life. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:2902-2910
12. Hossein Z, Mohammad RJ, Mohammad AJ, Farid K, Hossein P, Manijeh M et al. Epidemiology of Keratoconus in an Iranian Population. *Cornea* 2012;31:1044-1047.
13. Jonas J, Nangia V, Matin A, et al. Prevalence and associations of keratoconus in rural Maharashtra in central India: the central India eye and medical study. *Am J Ophthalmol* 2009;148:760–765.

14. Gokhale N. Epidemiology of keratoconus. *Indian J Ophthalmol* 2013;61:382 - 383.
15. Millodot M, Shneur E, Albou S, Atlani E, Gordon-Shaag A. Prevalence and associated factors of keratoconus in Jerusalem: A cross-sectional study. *Ophthalmic Epidemiol* 2011;18:91 - 97.
16. Fatima T, Acharya MC, Mathur U, Barua P. Demographic profile and visual rehabilitation of patients with keratoconus attending contact lens clinic at a tertiary eye care center. *Cont Lens Anterior Eye* 2010;33:19 - 22.
17. Nubile M, Mastropasqua L. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: where are we now? *Br J Ophthalmol* 2009;93:850–852.
18. Zhivov A, Guthoff RF, Stachs O. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside and back again. *Br J Ophthalmol* 2010;94:1557-58.
19. Kymionis GD, Dakionis DF, Kalyvianaki M, et al. One-year follow-up of corneal confocal microscopy after corneal cross-linking in patients with post Laser In Situ Keratosmilesia ectasia and keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2009;147:774–778.

- 20.Knappe S, Stachs O, Zhivov A, Hovakimyan M, Guthoff R. Results of confocal microscopy examinations after collagen cross-linking with riboflavin and uv light in patients with progressive keratoconus. *Ophthalmologica* 2011;225:95–104.
- 21.Ali Javadi M, Kanavi MR, Mahdavi M, et al. Comparison of keratocyte density between keratoconus, post-laser in situ keratomileusis keratectasia, and uncomplicated post-laser in situ keratomileusis cases. *Cornea* 2010;35:1072–1080.
- 22.Macdonald E, Gregory ME, Lockington D, Kennedy A, Roberts F, Ramaesh K. Observation of the in vivo movement of host keratocytes into donor tissue following corneal graft; a novel technique. *Br J Ophthalmol* 2010;94:790-794.
- 23.Hong C, Sinha-Roy A, Schoenfield L, McMahon JT, Dupps WJ. Collagenase-Mediated Tissue Modeling of Corneal Ectasia and Collagen Cross-Linking Treatments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2321-2327.
- 24.Peña-García P, Vega-Estrada A, Barraquer RI, Burguera-Giménez N, Alio JL. Intracorneal Ring Segment in Keratoconus: A model to predict

- visual changes induced by the surgery. Invest Ophthalmol Vis Sci
2012;53:8447-8457.
- 25.Hoyer A, Raiskup-Wolf F, Spörl E, Pillunat LE. Collagen cross-linking
with riboflavin and UVA light in keratoconus. Ophthalmologe
2009;106:133-40.
- 26.Rojas - Álvarez E, González - Sotero J. Características in vivo del
epitelio corneal versus magnitud del defecto refractivo, posterior a
tratamiento con láser de excímeros. Rev Cubana de Oftalmología
2013;26:5 -10.
- 27.Rojas - Alvarez E, González - Sotero J. Microscopía confocal en cirugía
refractiva corneal: ¿útil o imprescindible? Revista Cubana Oftalmol
2013;26:11-13.
- 28.Aguirre-González A, Baca-Lozada O, Velasco-Ramos R. Seguimiento
del queratocono mediante topografía de elevación. Rev Mex Oftalmol
2003;77:57-63.
- 29.Li X, Yang H, Rabinowitz YS. Keratoconus: Classification scheme based
on videokeratography and clinical signs. J Cataract Refract Surg
2009;35:1597–1603.

30. Ahn S, Kim MK, Wee WR. Topographic progression of keratoconus in the Korean population Korean J Ophthalmol 2013;27:162 - 6.
31. Choi J, Kim MS. Progression of keratoconus by longitudinal assessment with corneal topography. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53:927-35.
32. Tanwar M, Kumar M, Nayak B, Pathak D, Sharma N, Titiyal JS et al. VSX1 gene analysis in keratoconus. Epub 2010;16:2395-401.
33. Nielsen K, Hjortdal J, Pihlmann M, Corydon TJ. Update on the keratoconus genetics. Acta Ophthalmol 2012;91:106-13.
34. Nowak D, Karolak JA, Kubiak J, Gut M, Pitarque JA, Molinari A, Bejjani BA, Gajecka M. Substitution at IL1RN and Deletion at SLC4A11 Segregating with Phenotype in Familial keratoconus. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013;54:2207-2215.
35. Bykhovskaya Y, Li X, Epifantseva I, Haritunians T. Variation in the Lysyl Oxidase (LOX) Gene is associated with keratoconus in family-based and case-control studies. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53:4152-4157.
36. Wheeler J, Hauser MA, Afshari NA, Allingham RR, Liu Y. The Genetics of keratoconus: a review. Reprod Syst Sex Disord 2013;15:24-31.

37. Dash D, George S, O'Prey D, Burns D et al. Mutational screening of VSX1 in keratoconus patients from the European population. *Eye* 2010;24:1085–1092.
38. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: a review. *Contact Lens Anterior Eye* 2010;33:157–166.
39. McCullough S, Little JA, Saunders KJ. Higher Order Aberrations in Children with Down Syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:1527-1535
40. Nemet A, Vinker S, Bahar I, Kaiserman I. The Association of keratoconus with immune disorders. *Cornea* 2010;29:1261–1264.
41. Piñero D, Alió JL, Barraquer RI, Michael R, Jiménez R. Corneal biomechanics, refraction, and corneal aberrometry in keratoconus: an integrated study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1948-1955.
42. Atchison D, Mathur A, Read SA, Walker MI. Peripheral ocular aberrations in mild and moderate keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6850-6857.
43. Schweitzer C, Roberts CJ, Mahmoud AM, Colin J, Tison SM, Kerautret J. Screening of forme fruste keratoconus with the Ocular Response Analyzer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:2403-2410.

44. Kovács I, Miháltz K, Németh J, Nagy ZZ. Anterior chamber characteristics of keratoconus assessed by rotating Scheimpflug imaging. *Cataract Refract Surg* 2010;36:1101–1106.
45. Fukuda S, Yamanari M, Lim Y, Hoshi S, Beheregaray S, Oshika T, Yasuno Y. Keratoconus diagnosis using Anterior Segment Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:1384-1391.
46. Piñero D, Alió JL, Alesón A, Escaf Vergara M, Miranda M. Corneal volume, pachymetry, and correlation of anterior and posterior corneal shape in subclinical and different stages of clinical keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2010;36:814–825.
47. Piñero D, Alio JL, Tomás J, Maldonado MJ, Teus MA, Barraquer RI. Vector analysis of evolutive corneal astigmatic changes in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:4054-4062.
48. Krachmer J, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea*, 3rd ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2011:865.
49. Bühren J, Kook D, Yoon G, Kohnen A. Detection of subclinical keratoconus by using corneal anterior and posterior surface aberrations

- and thickness spatial profiles. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:3424–3432.
- 50.Saad A, Gatinel D. Topographic and tomographic properties of forme fruste keratoconus corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:5546–5555.
- 51.Centellas-Vargas W, Velasco R, Baca O, Babayan A. Microscopía corneal en distrofias corneales. Rev Mex Oftalmol 2009;83:26-34.
- 52.Erie J, McLaren JW, Patel SV. Confocal Microscopy in Ophthalmology. Am J Ophthalmol 2009;148:639-646.
- 53.Patel D, McGhee CN. Quantitative analysis of in vivo confocal microscopy images: a review. Survey of Ophthalmology 2013;30:10-20.
- 54.Qu Y, Wu YK, Bille JF, et al. High resolution cornea imaging by using two-photon ophthalmoscope. Invest Ophthalmol Vis Sci 2010;51:5669.
- 55.Ramírez-Fernández M, Naranjo-Tackman R. Análisis de los nervios estromales de la córnea mediante microscopía confocal in vivo. Rev Mex Oftalmol 2011;85:1-3.
- 56.Rojas - Alvarez E, González - Sotero J, Pérez - Ruiz A. Densidad celular corneal en pacientes sanos, estudio in vivo por microscopía confocal. Revista Electrónica Zoilo Marinello Vidaurreta 2012;37:15-16.

57. Al-Aqaba M, Fares U, Suleman H et al. Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol* 2010;94:784-789.
58. Nishida T. Commanding Roles of Keratocytes in Health and Disease. *Cornea* 2010;29:3–6.
59. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CNJ. Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1165–1169.
60. Patel DV, McGhee CNJ. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Exp Ophthalmol* 2007;35:71–88.
61. Kubilus J, Linsenmayer TF. Developmental corneal innervation: interactions between nerves and specialized apical corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:782-789
62. Guthoff R, Zhivov A, Stachs O. Real-time mapping of the corneal sub-basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Proc SPIE* 2010;75:755-9.
63. Allgeier S, Zhivov A, Eberle F, Koehler B, Maier S, Bretthauer G, Guthoff RF, Stachs O. Image reconstruction of the subbasal nerve plexus with in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5022-5028.

64. Dabbah M, Graham J, Petropoulos I et al. Dual-Model automatic detection of nerve-fibres in corneal confocal microscopy Images. *Med Image Comput Assist Interv* 2010;13:300-17.
65. Oliveira-Soto L, Efron, N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 2001;20:374–84.
66. Patel D, McGhee CN. In vivo laser scanning confocal microscopy confirms that the human corneal sub-basal nerve plexus is a highly dynamic structure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;23:474-478.
67. Salvetat M, Zeppieri M, Miani F, Parisi L, Felletti M, Brusini P. Comparison between laser scanning in vivo confocal microscopy and noncontact specular microscopy in assessing corneal endothelial cell density and central corneal thickness. *Cornea* 2011;30:754 –759.
68. Scarpa F, Zheng X, Ohashi Y et al. Automatic Evaluation of Corneal Nerve Tortuosity in Images from In Vivo Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6404-6408.
69. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CNJ. Laser scanning in vivo confocal microscopy reveals reduced innervation and reduction in cell density in all layers of the keratoconic cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2964–2970.

70. Hollingsworth J, Efron N, Tullo AB. In vivo corneal confocal microscopy in keratoconus. *Ophthalmic Physiol Opt* 2005;25:254–260.
71. Yenzi B, Yilmaz S, Bilgin LK. Evaluation of the microstructure of cornea by in vivo confocal microscopy in contact lens wearing and non-contact lens wearing keratoconus patients. *Cont Lens Anterior Eye* 2010;33:167-70.
72. Patel D, Ku JY, Johnson R, et al. Laser scanning in vivo confocal microscopy and quantitative aesthesiometry reveal decreased corneal innervation and sensation in keratoconus. *Eye* 2009;23:586–92.
73. Ucxakhan OO, Kanpolat, AYilmaz N et al. In vivo confocal microscopy findings in keratoconus. *Eye Contact Lens* 2006;32:183–191.
74. Scarpa F, Zheng X, Ohashi Y, Ruggeri A. Automatic Evaluation of Corneal Nerve Tortuosity in Images from In Vivo Confocal Microscopy *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6404-6408.
75. González - Sotero J, Rojas - Alvarez E, Benítez - Merino MC. Características microscópicas in vivo del plexo nervioso subbasal corneal en pacientes con queratocono. *Rev Cubana Oftalmol* 2013;26:13-14.

76. Brookes NH LI, Clover GM et al. Involvement of corneal nerves in the progression of keratoconus. *Exp Eye Res* 2003;77:515–524.
77. Niederer R, McGhee CN. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2010;29:30–58.
78. Patel D, McGhee CNJ. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1348–1351.
79. McLaren J, Bourne WM, Patel SV. Automated assessment of keratocyte density in stromal images from the Confoscan 4 confocal microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1918-1926.
80. Turuwhenua J, Patel DV, McGhee CNJ. Fully Automated Montaging of Laser Scanning In Vivo Confocal Microscopy Images of the Human Corneal Subbasal Nerve Plexus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:2235-2242.
81. Twa M, Giese MJ. Assessment of corneal thickness and keratocyte density in a rabbit model of Laser In Situ Keratomileusis using Scanning Laser Confocal Microscopy. *Am J Ophthalmol* 2011;152:941–953.

82. Ku JYF, Niederer RL, Patel DV, Sherwin T, McGhee CNJ. Laser scanning in vivo confocal analysis of keratocyte density in keratoconus. . Ophthalmology 2008;115:845–850.
83. Ozgur B, Adnan Cinal. Assessment of keratocyte density in patients with keratoconus not using contact lenses. Cornea 2011;30:576–579.
84. Matthews F, Cook SD, Majid MA, Dick AD, Smith VA. Changes in the balance of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs)-1 and -3 may promote keratocyte apoptosis in keratoconus. Exp Eye Res 2007;84:1125-1134.
85. Kang Y, Park YK, Lee JS et al. The effect of the YK lens in keratoconus. Ophthalmic Physiol Opt 2010;30:267-73.
86. Hwang J, Lee JH, Wee WR, Kim MK. Effects of multicurve RGP contact lens use on topographic changes in keratoconus. Korean J Ophthalmol 2010;24:201-6.
87. Rojas - Alvarez E, González - Sotero J. Láser Excímer y microscopía confocal: plataformas tecnológicas de la visión del futuro. MEDISAN 2013;17:20-21.

88. Rojas - Alvarez E, González - Sotero J, Pérez - Ruiz A. Plexo nervioso subbasal y su relación con la magnitud de la ametropía en el LASIK. *Rev Cubana Oftalmol* 2013;26:23-24.
89. Benítez - Merino M, González - Sotero, J, Capote - Cabrera A, Cárdenas - Díaz T, Noriega - Martínez J. Cicatrización estromal y reinervación corneal por microscopia confocal en LASIK posterior a queratotomía radial de 15 años de evolución. *Rev Cubana Oftalmol* 2012;25:6-8.
90. Jay W, McLaren J, Patel SV. Automated Assessment of Keratocyte Density in Stromal Images from the Confoscan 4 Confocal Microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1918-1926.
91. Hollingsworth JG, Efron N. Observations of Banding Patterns (Vogt Striae) in Keratoconus A Confocal Microscopy Study. *Cornea* 2005;24:162–166.
92. Mocan M, Yilmaz PT, Irkec M, Orhan M. The significance of Vogt's striae in keratoconus as evaluated by in vivo confocal microscopy. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2008;36:329 - 334.
93. Wagner H, Barr JT, Zadnik K. Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study: methods and findings to date. *Cont Lens Anterior Eye* 2007; 30: 223–32.

94. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:2244–2258.
95. Smolek MK MB. Interlamellar adhesive strength in human eye bank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1087–1095.
96. Smolek MK. Interlamellar cohesive strength in the vertical meridian of human eye bank corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:2962–2969.
97. Sheng H, Parker EJ, Bullimore MA. An evaluation of the Confoscan 3 for corneal endothelial morphology analysis. *Optom Vis Sci* 2007;84:888–895.
98. Edmonds C, Wung SF, Husz MJ, Pemberton B. Corneal endothelial cell count in keratoconus patients after contact lens wear. *Eye Contact Lens* 2004;30:54–8.
99. McLaren J, Nau CB, Patel SV et al. Measuring corneal thickness with the Confoscan 4 and z-ring adapter. *Eye Contact Lens* 2007;33:185–190.
100. Li X, Bykhovskaya Y, Caiado Canedo AL et al. Genetic Association of COL5A1 Variants in Keratoconus Patients Suggests a Complex connection

between Corneal Thinning and Keratoconus. Invest Ophthalmol Vis Sci
2013;54:2696-2704.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

1. Dhaliwal J, Kaufman SC, Chiou AG. Current applications of clinical confocal microscopy. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:300–7.
2. Gajecka M, Radhakrishna U, Winters D, Nath SK, Rydzanicz M, et al. Localization of a gene for keratoconus to a 5.6-Mb interval on 13q32. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50:1531–1539.
3. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2007;245:569–75. Weed KH, MacEwen CJ, Giles T, Low J, McGhee CN. The Dundee University Scottish Keratoconus study: demographics, corneal signs, associated diseases, and eye rubbing. *Eye (Lond)*. 2008 Apr;22(4):534-41.
4. Karimi AH, Wong A, Bizheva K. Automated detection and cell density assessment of keratocytes in the human corneal stroma from ultrahigh resolution optical coherence tomograms. *Optical Society of America*. 2011; 2(10): 2905-2916.
5. Mok JW, Baek SJ, Joo CK. VSX1 gene variants are associated with keratoconus in unrelated Korean patients. *J Hum Genet*. 2008; 53:842–849.

6. Szaflik J. Comparison of in vivo confocal microscopy of human cornea by white light scanning slit and laser scanning systems. *Cornea* 2007;26:438-445.
7. Weed K, MacEwen CJ, Cox A, et al. Quantitative analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising in vivo confocal microscopy. *Eye* 2007;21:614-23.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado de participación

Nombre del Paciente: _____

CI: _____ Edad: _____

Por este medio hago constar que:

Se me han explicado claramente los aspectos relacionados con los exámenes que me realizarán (cómo, cuándo y dónde), sus posibles riesgos y beneficios y el objetivo de la investigación científica que se propone.

He comprendido con claridad las explicaciones ofrecidas.

Estoy de acuerdo en ser incluido en la investigación.

Nombre: _____

Firma: _____

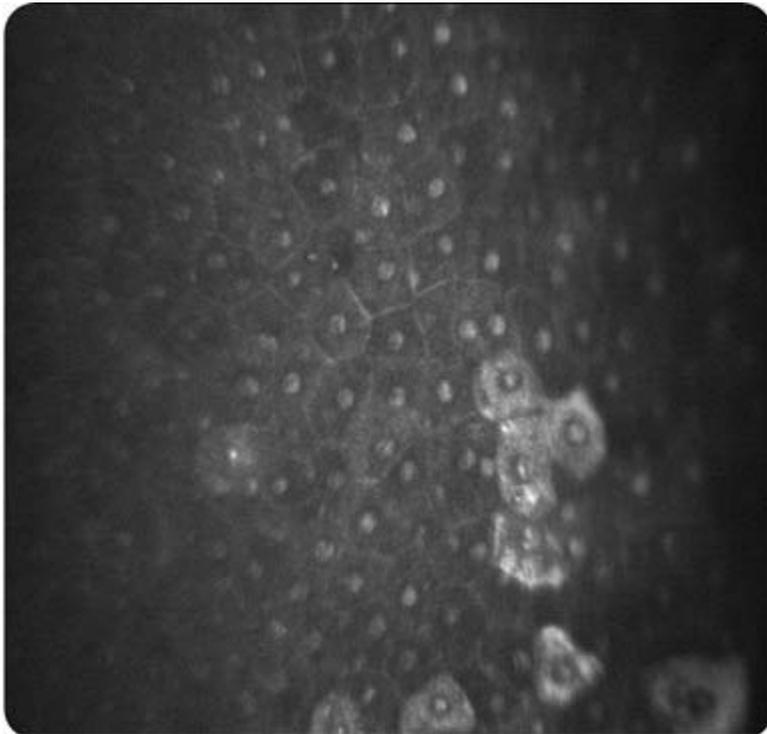
Fecha: _____

Nombre y Firma del Investigador:

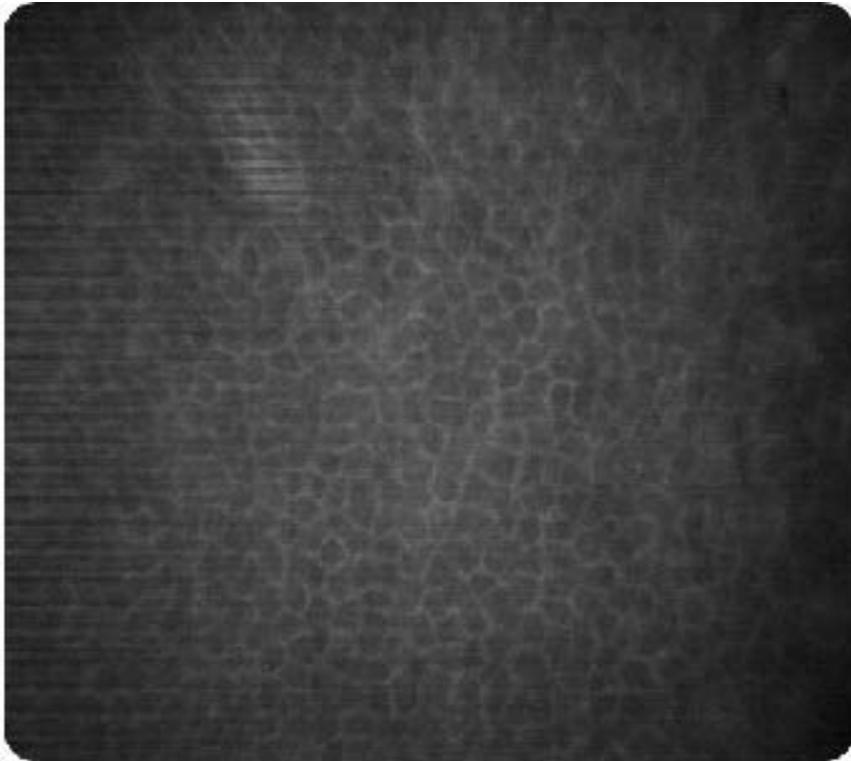
Anexo 2. Figuras relacionadas con imágenes del microscopio confocal

Confoscan 4.

Anexo 2.1: Epitelio superficial normal.

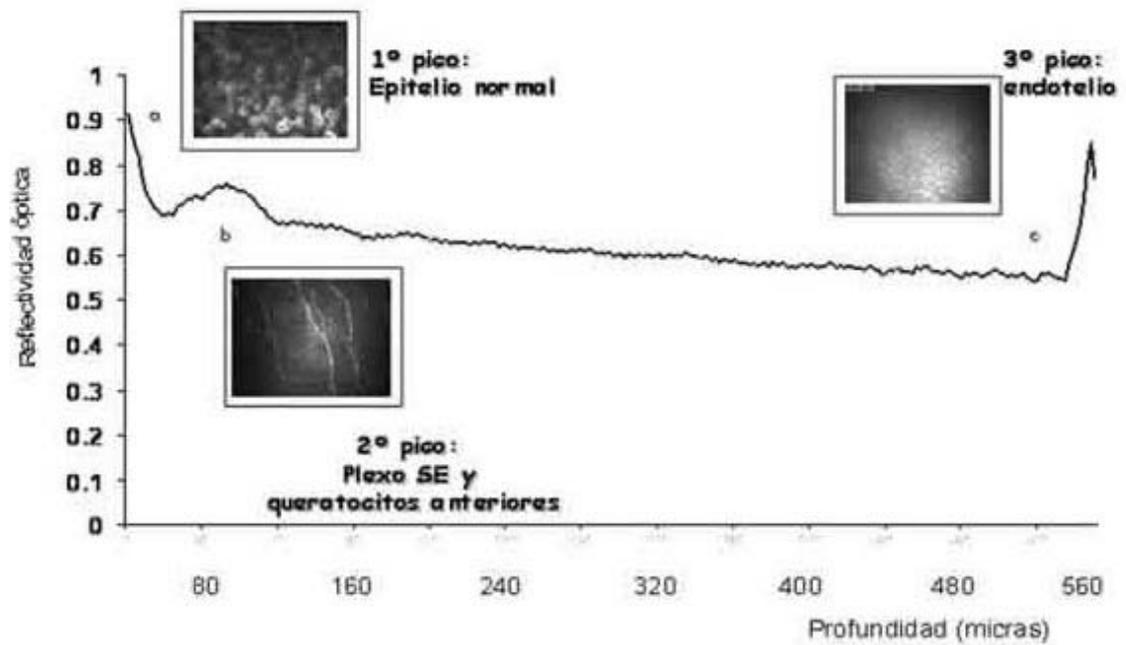


Anexo 2.2: Epitelio basal normal.

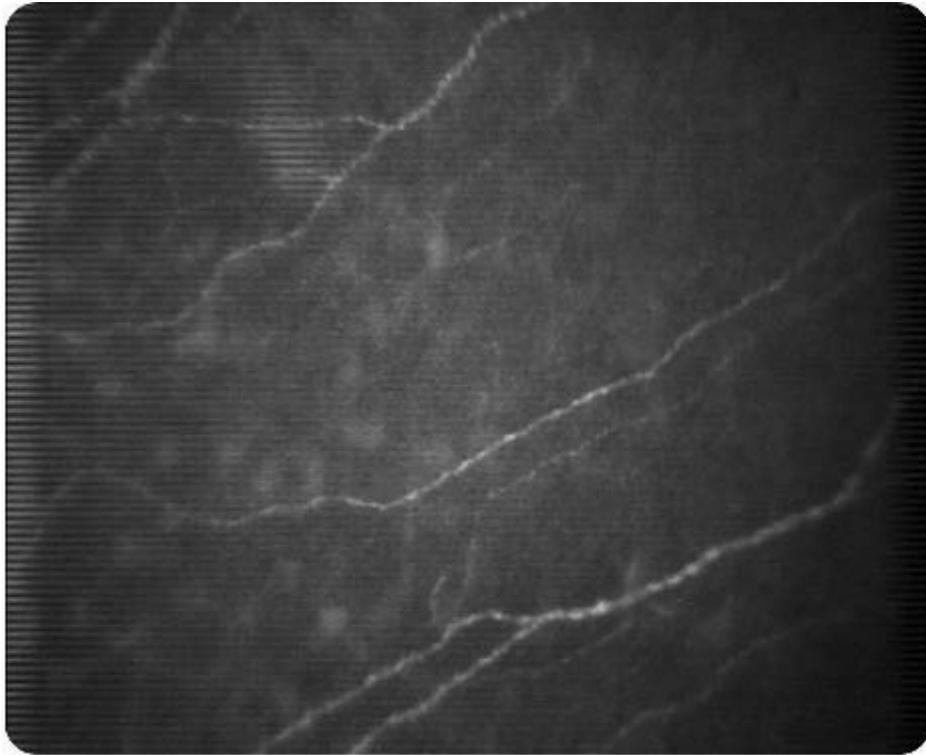


Anexo 2.3. Microscopía Confocal Cuantitativa de Enfoque Completo

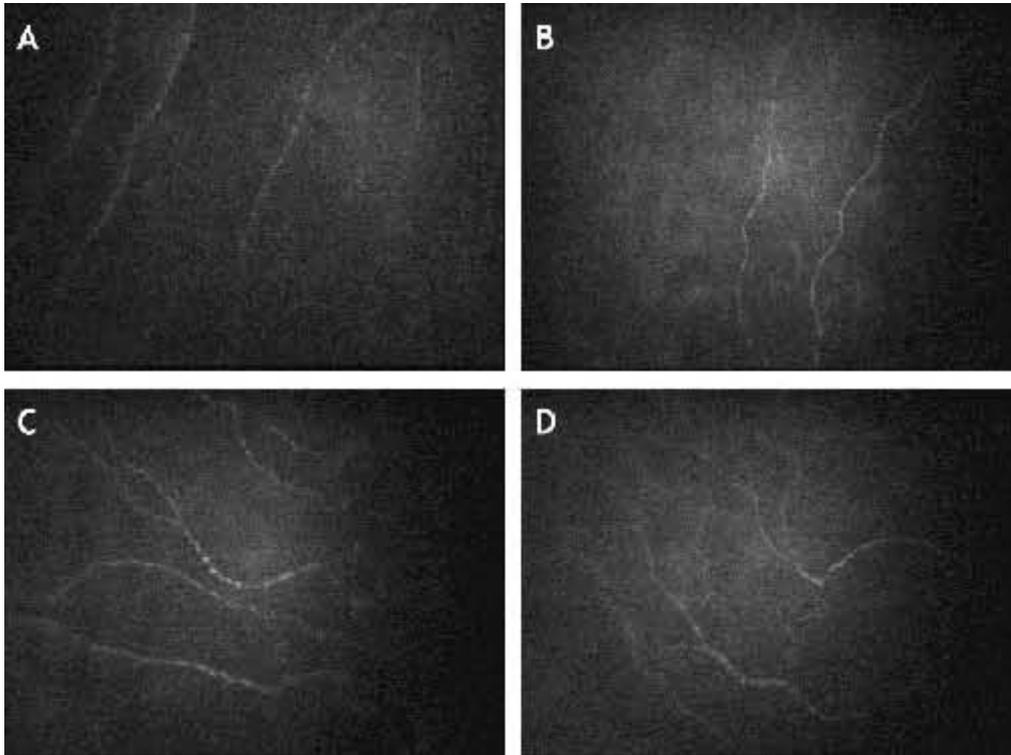
(curva CMTF: Confocal Microscopy Through Focusing).



Anexo 2.4. Plexo nervioso subbasal normal.



Anexo 2.5. Escala de clasificación del grado de tortuosidad del plexo nervioso subbasal, de Oliveira-Soto.



(A): Apariencia normal de los nervios.

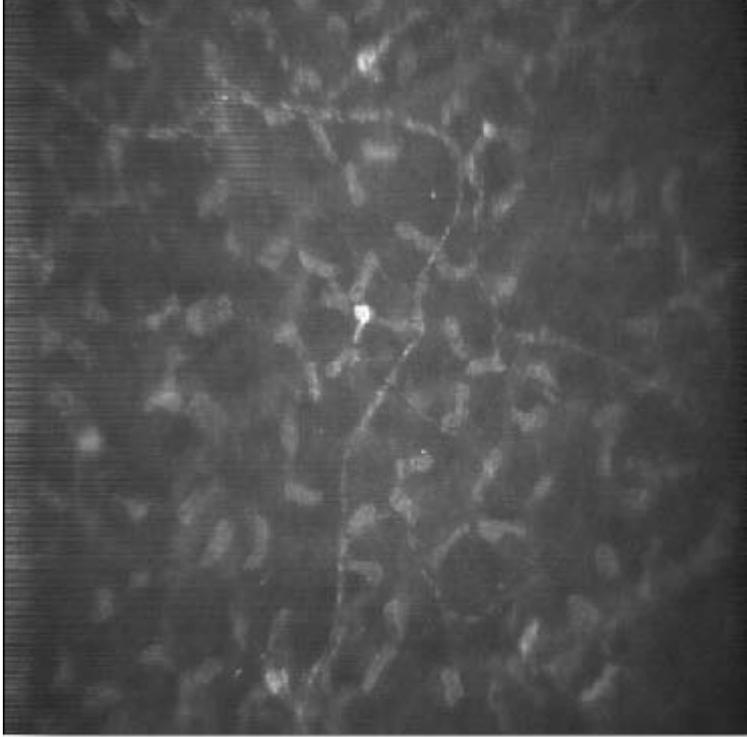
(B): Grado 1: Los nervios aparecen ligeramente tortuosos.

(C): Grado 2: Los nervios aparecen moderadamente tortuosos con frecuentes pero pequeños cambios de amplitud en la dirección de sus fibras.

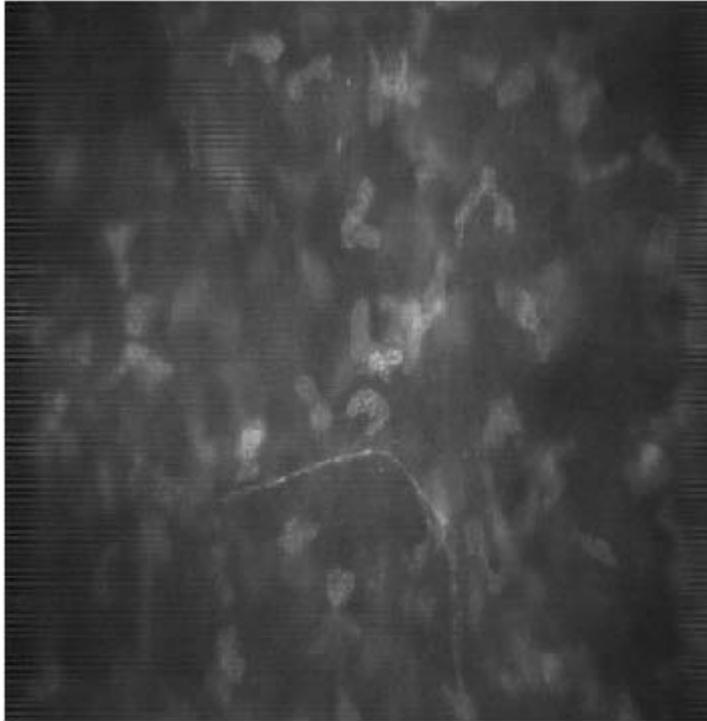
(D): Grado 3: Los nervios aparecen tortuosos en todo su trayecto con cambios frecuentes y severos en la amplitud de sus fibras.

Grado 4. Los nervios aparecen muy tortuosos, con cambios abruptos y frecuentes en la dirección de sus fibras.

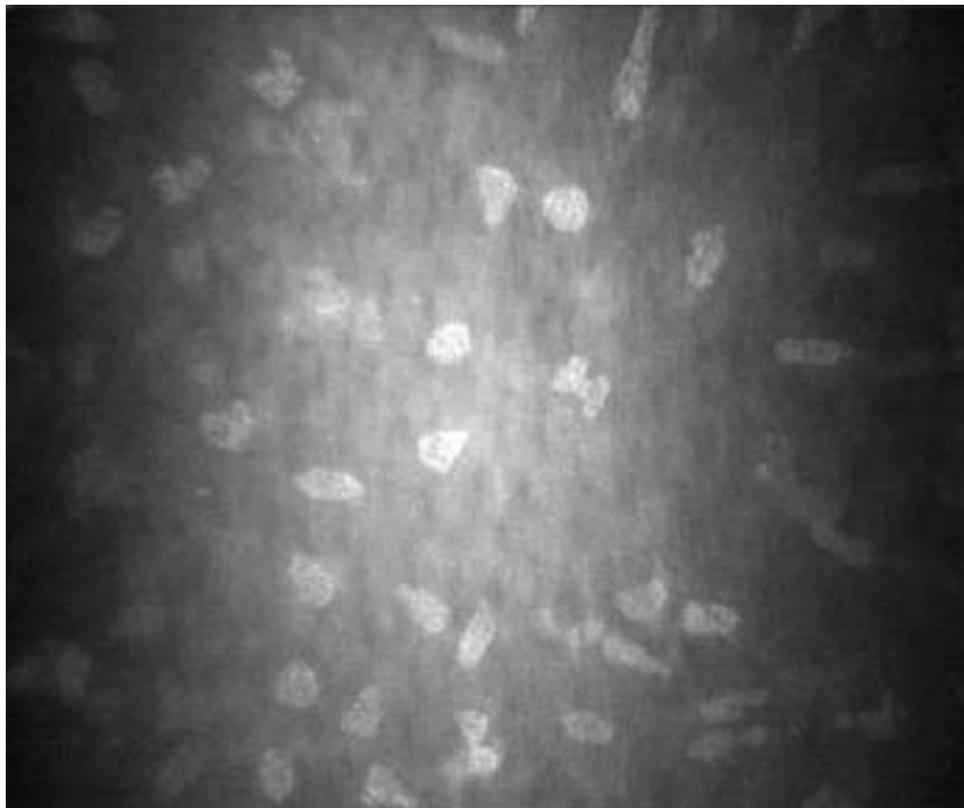
Anexo 2.6: Estroma anterior normal.



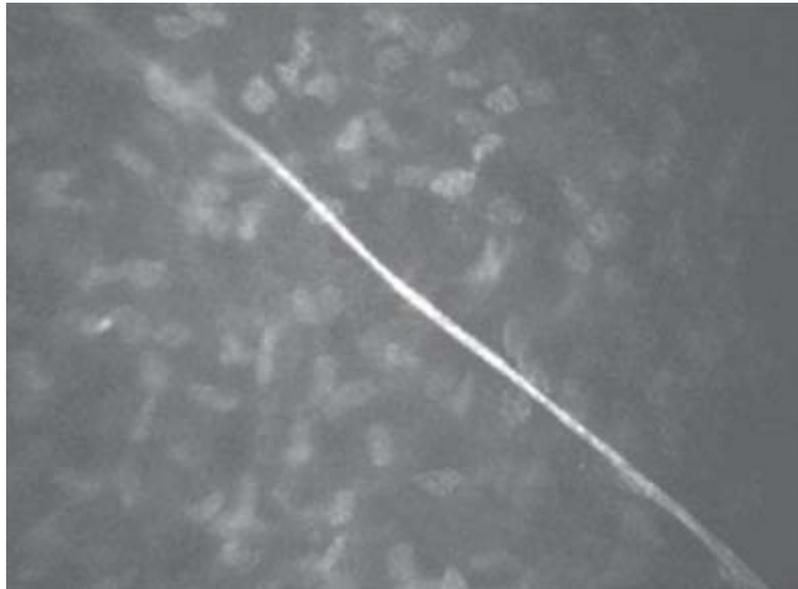
Anexo 2.7. Estroma medio normal.



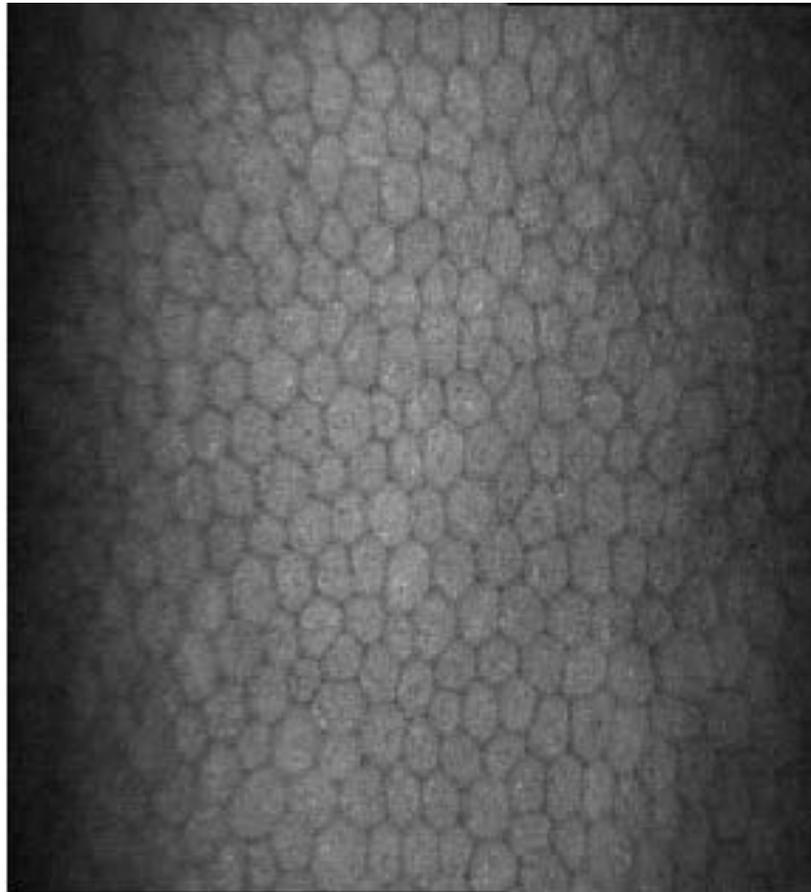
Anexo 2.8. Estroma posterior normal.



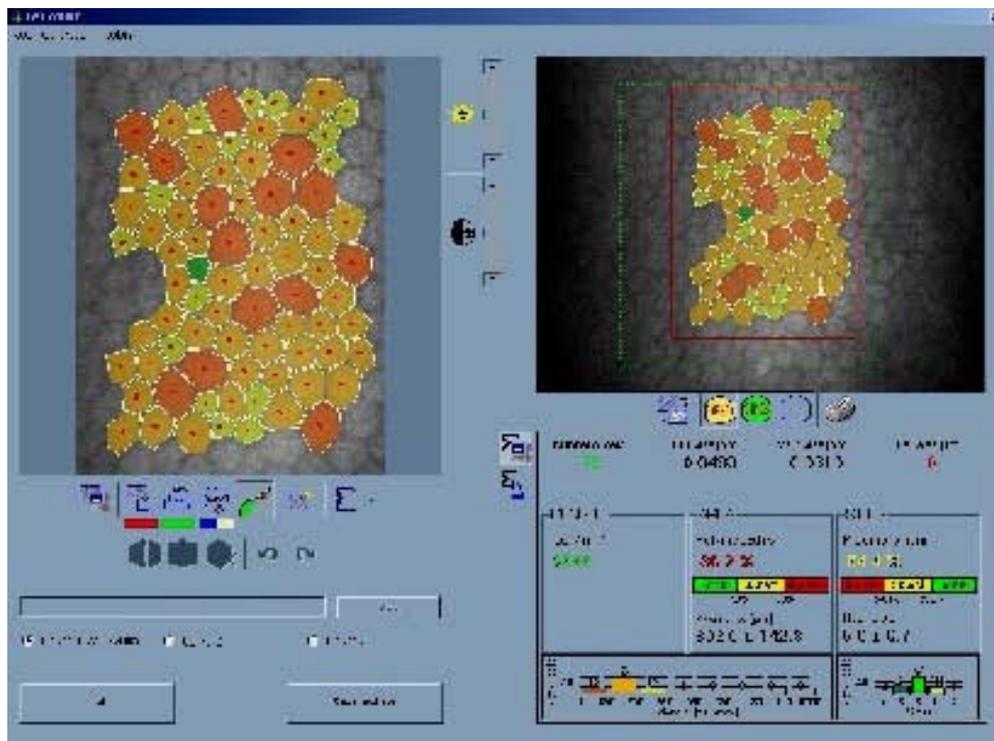
Anexo 2.9. Nervio estromal normal.



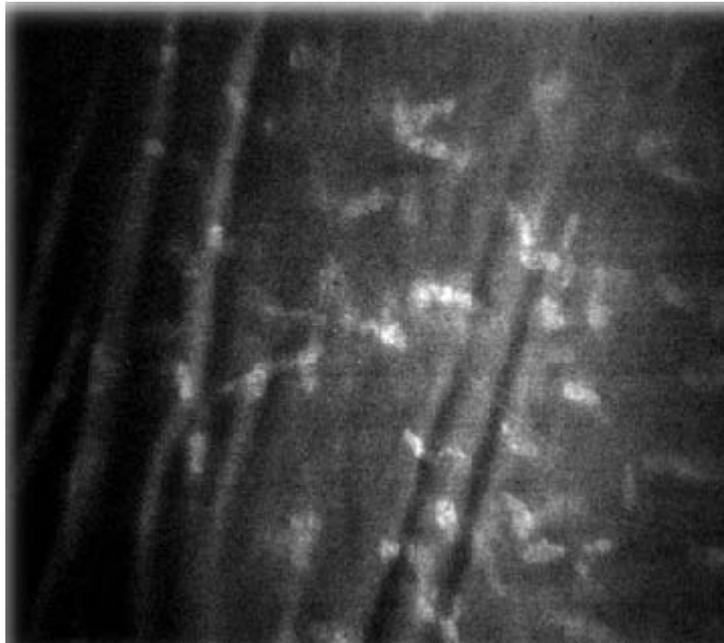
Anexo 2.10. Endotelio corneal normal.



Anexo 2.11. Análisis celular automático del endotelio corneal.



Anexo 2.12. Bandas estromales en el estroma de un paciente con queratocono.

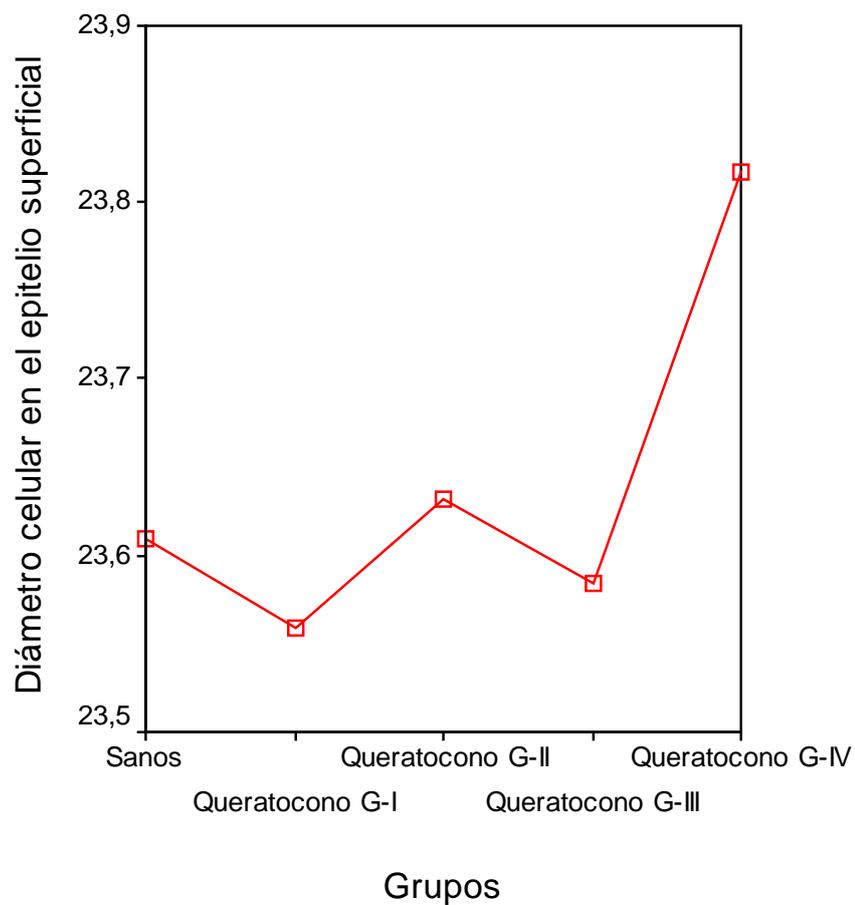


Anexo 2.13. Microscopio confocal confoscan 4.



Anexo 3. Diferencia de medias de las variables morfométricas según grupos.

Anexo 3.1. Diferencia de medias de la densidad celular en el epitelio superficial, según grupos.

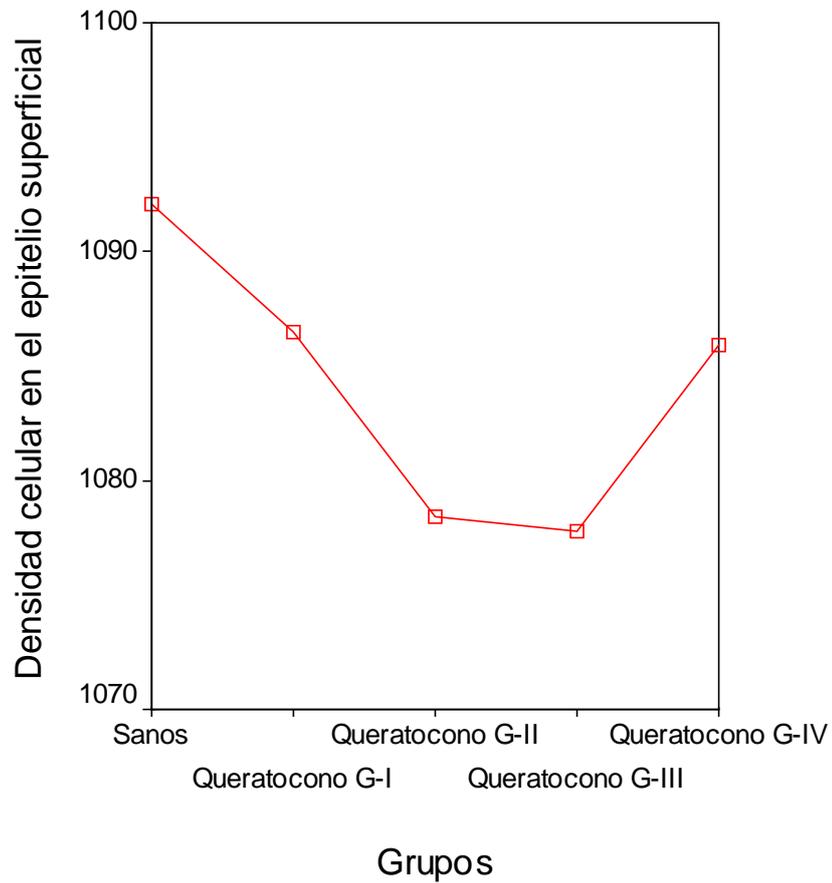


$p^* = 0,978.$

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 1.

Anexo 3.2. Diferencia de medias del diámetro celular en el epitelio superficial, según grupos.

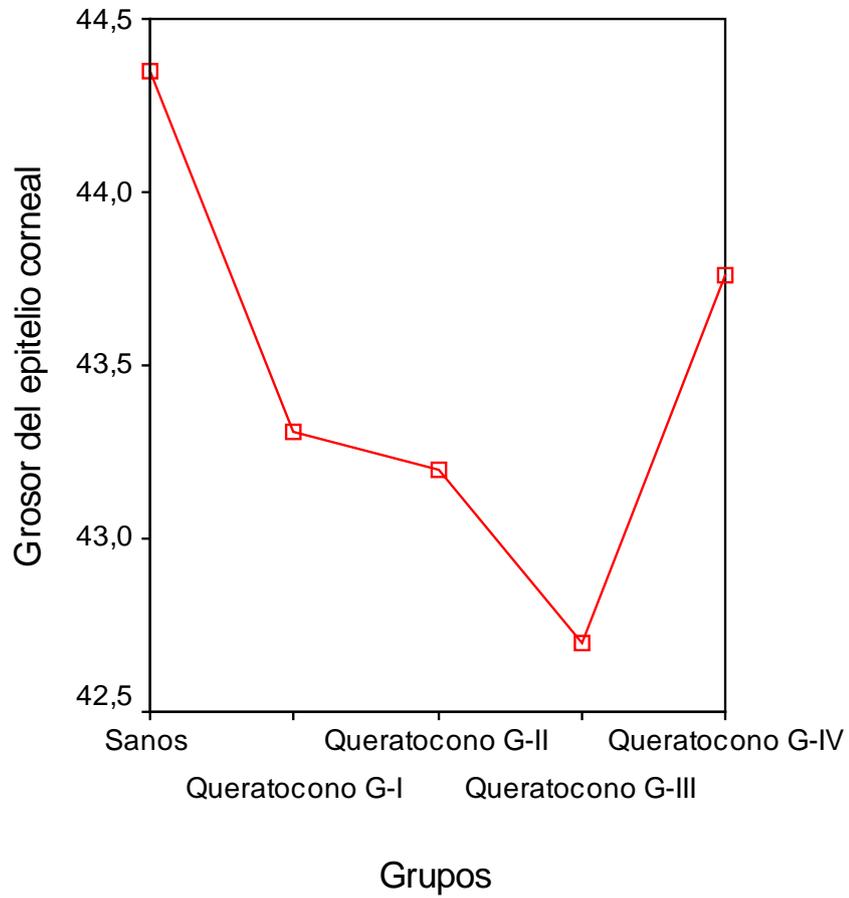


$p^* = 0,883.$

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 1.

Anexo 3.3. Diferencia de medias del grosor del epitelio corneal, según grupos.

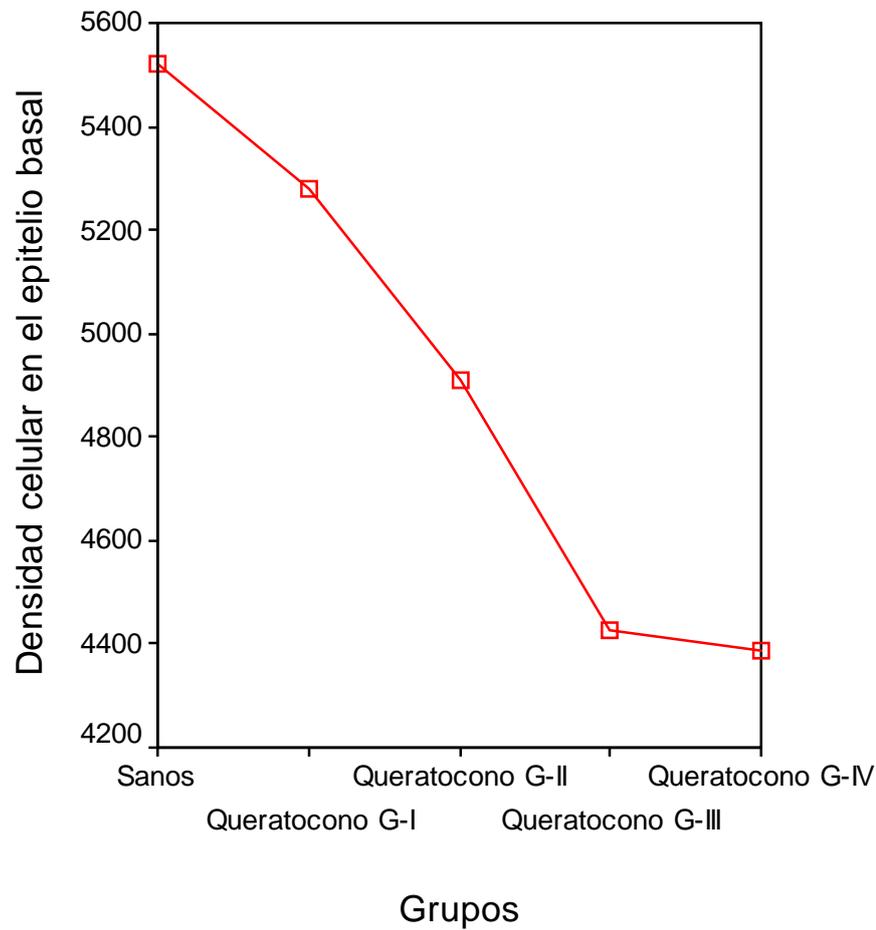


$p^* = 0,768$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 1.

Anexo 3.4. Diferencia de medias de la densidad celular en el epitelio basal, según grupos.

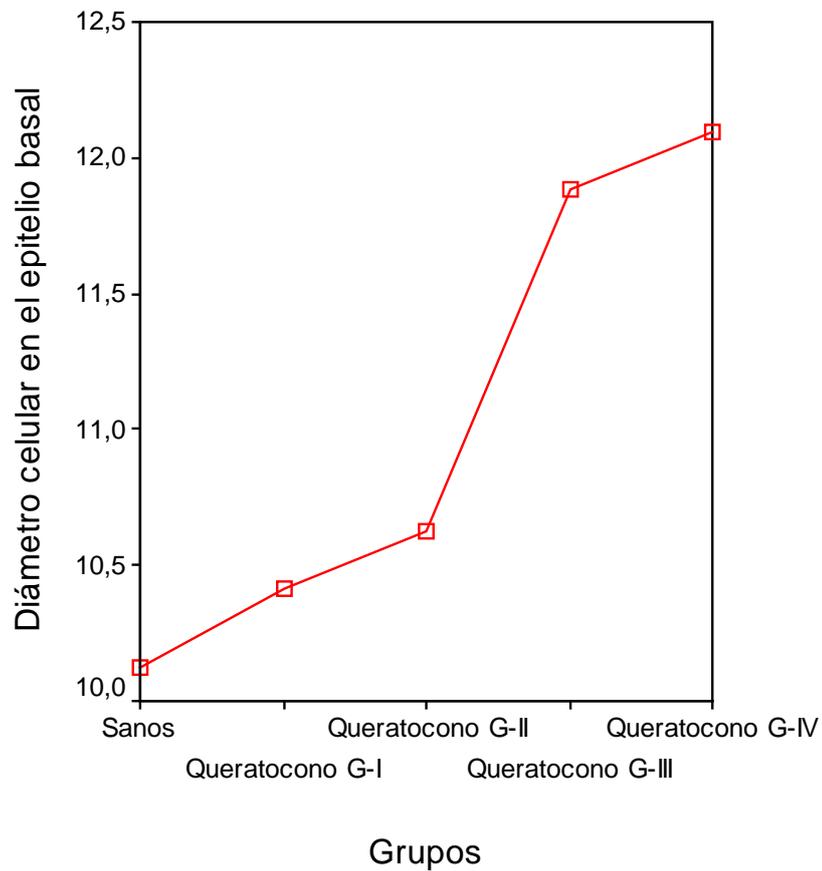


p* < 0,01.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 1.

Anexo 3.5. Diferencia de medias del diámetro celular en el epitelio basal, según grupos.

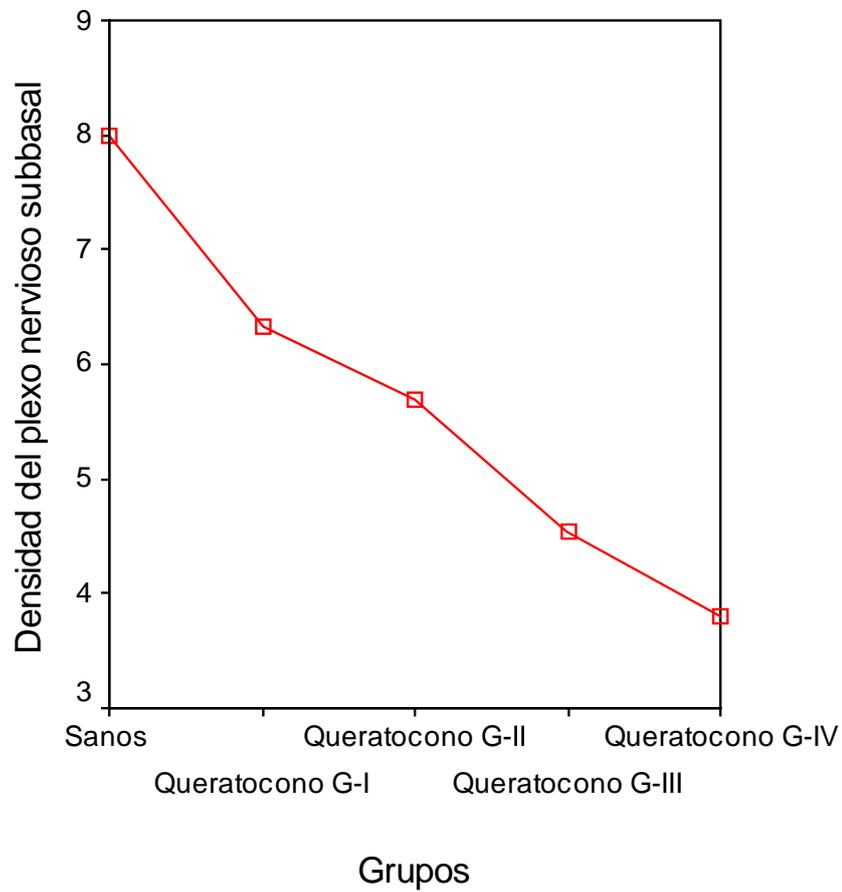


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 1.

Anexo 3.6. Diferencia de medias de la densidad del plexo nervioso subbasal, según grupos.

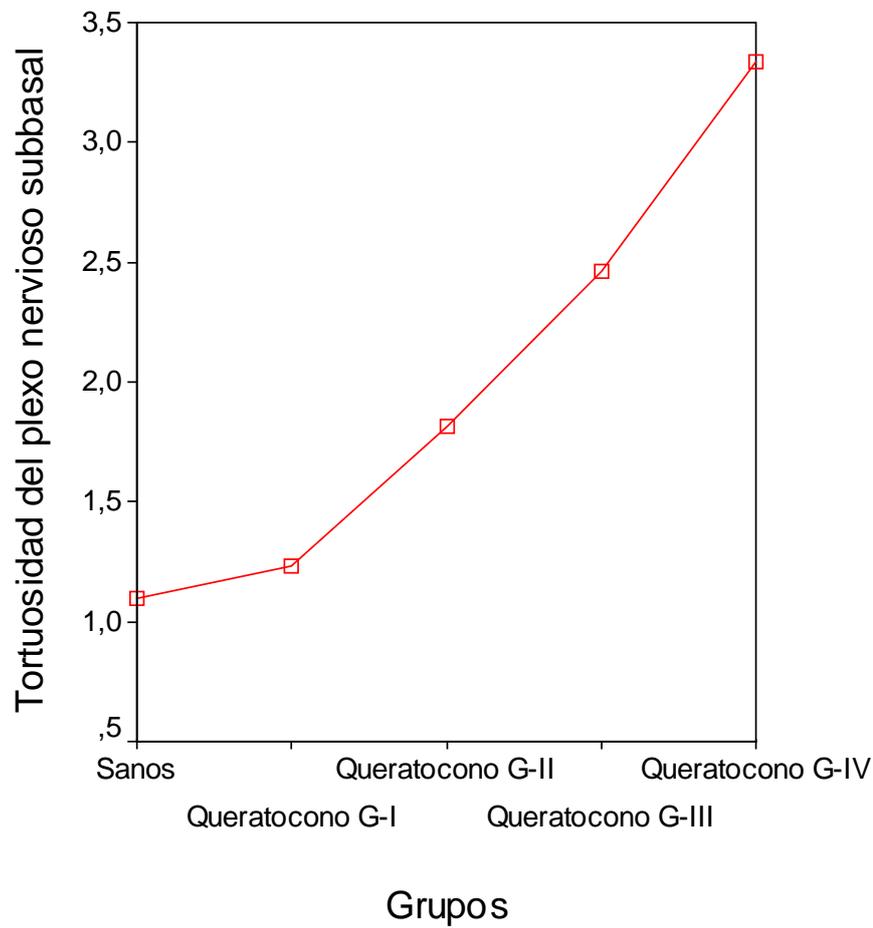


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 2.

Anexo 3.7. Diferencia de medias del coeficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal, según grupos.

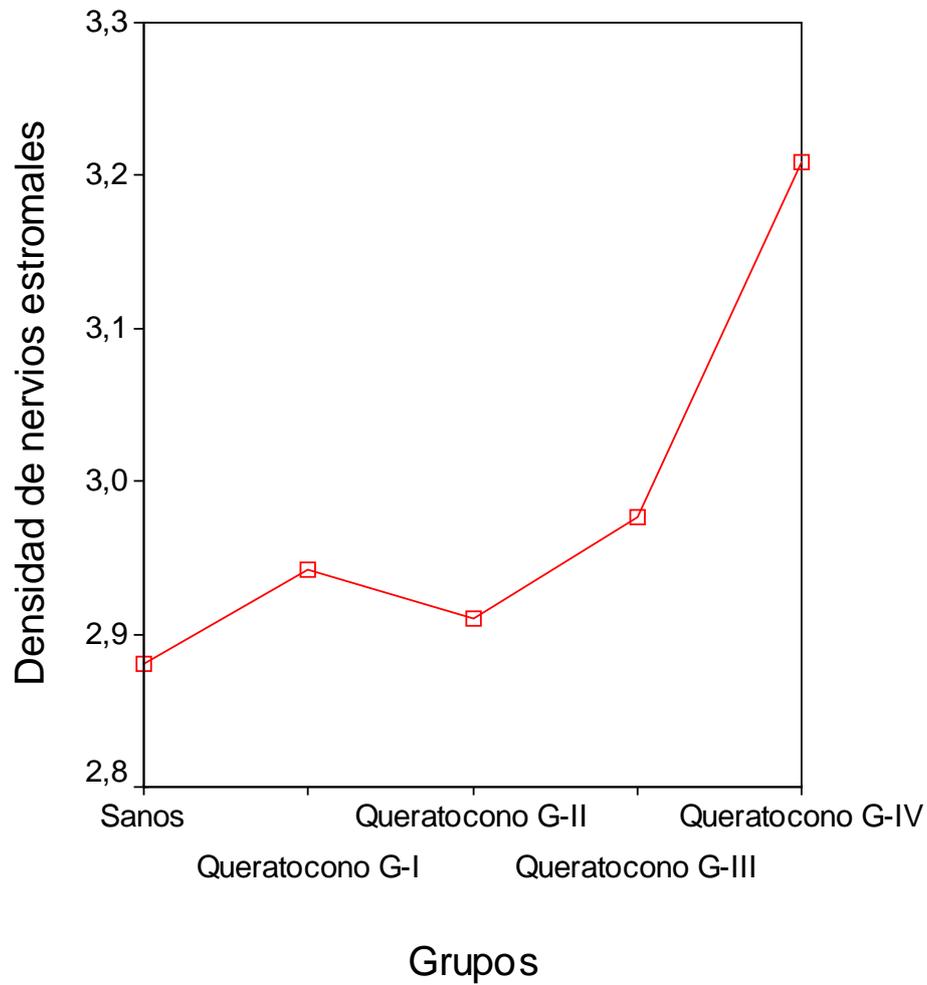


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 2.

Anexo 3.8. Diferencia de medias de la densidad de nervios estromales, según grupos.

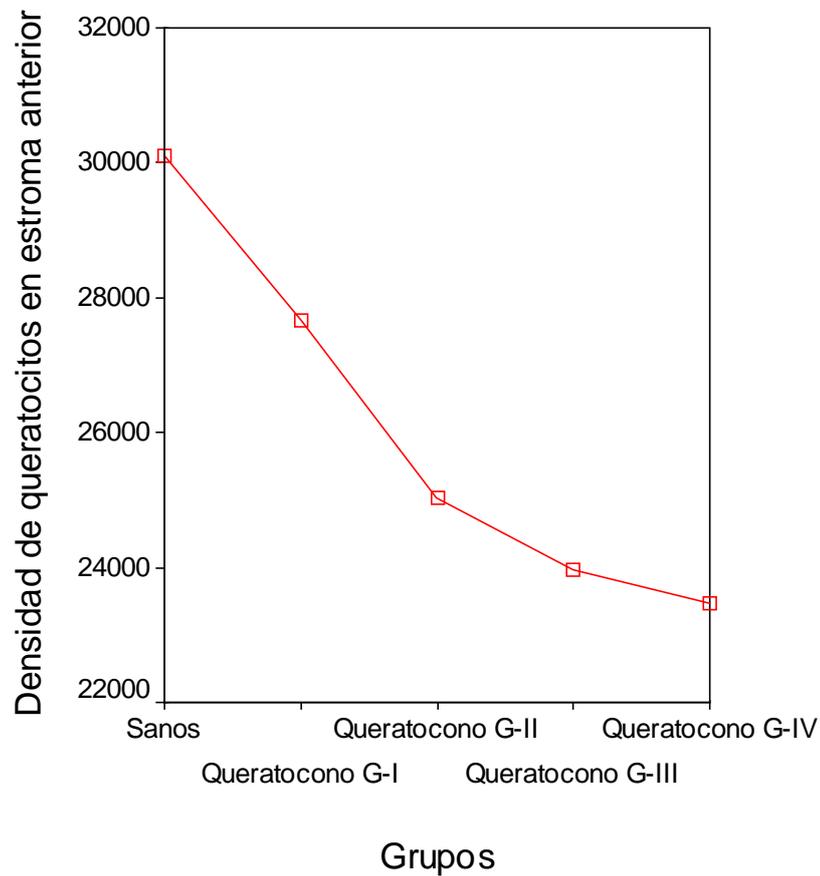


$p^* = 0,942.$

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 2.

Anexo 3.9. Diferencia de medias de la densidad de queratocitos en el estroma anterior, según grupos.

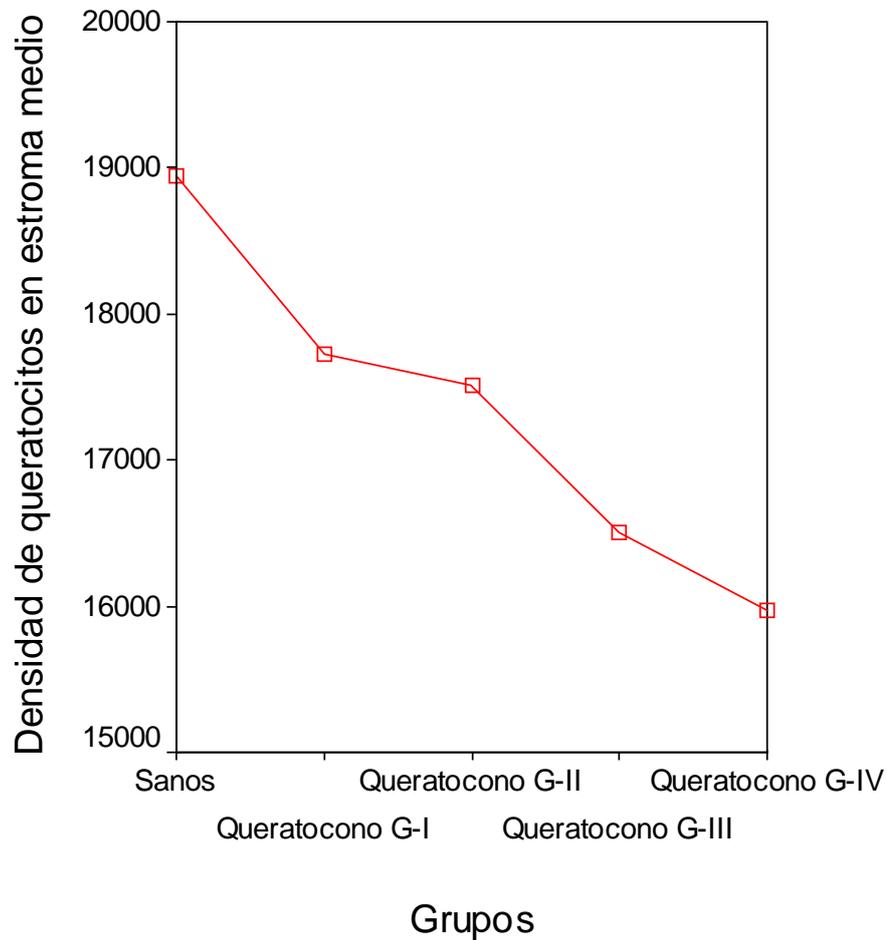


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 3.

Anexo 3.10. Diferencia de medias de la densidad de queratocitos en el estroma medio, según grupos.

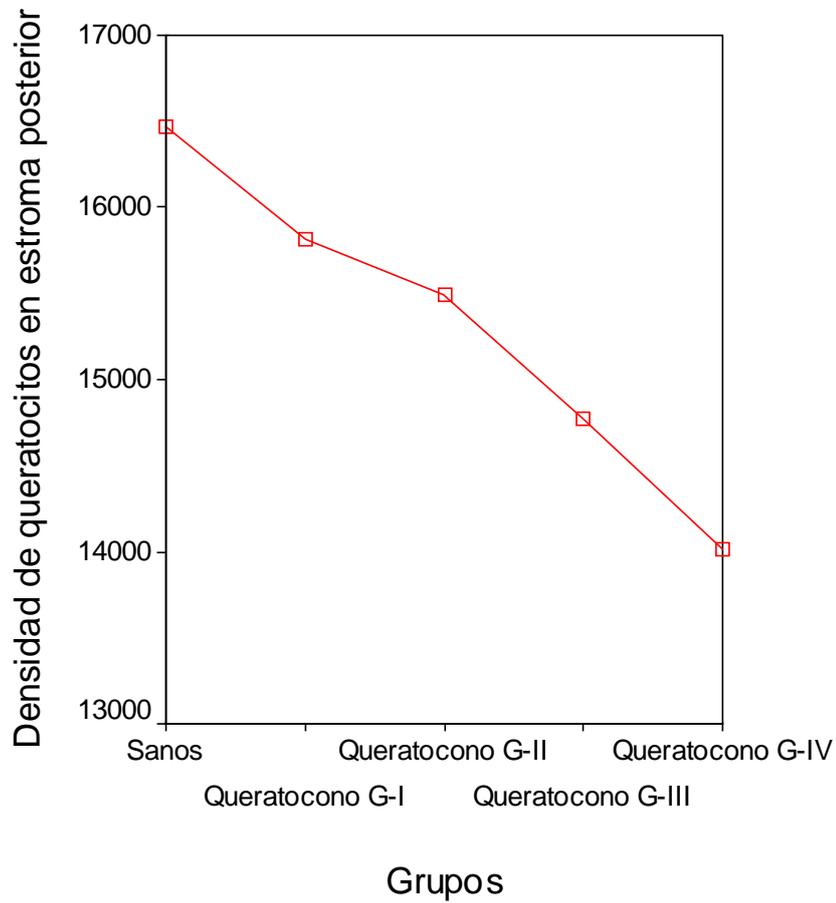


p* < 0,01.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 3.

Anexo 3.11. Diferencia de medias de la densidad de queratocitos en el estroma posterior, según grupos.

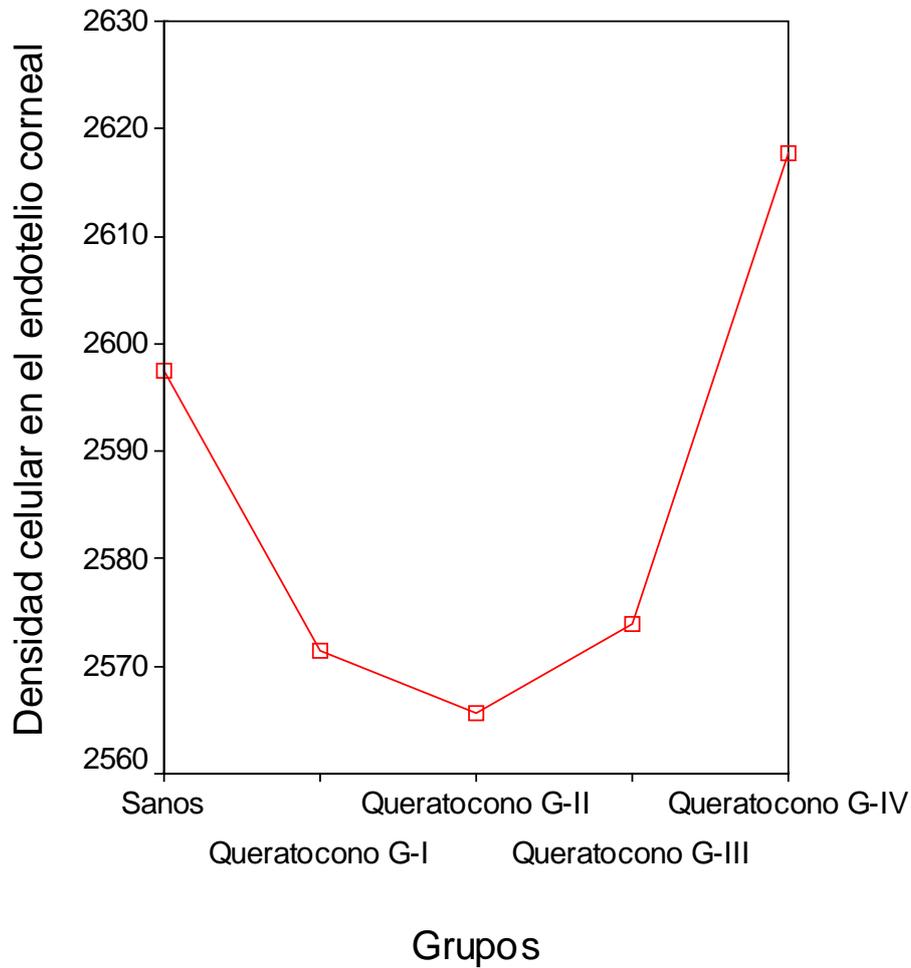


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 3.

Anexo 3.12. Diferencia de medias de la densidad celular en el endotelio corneal, según grupos.

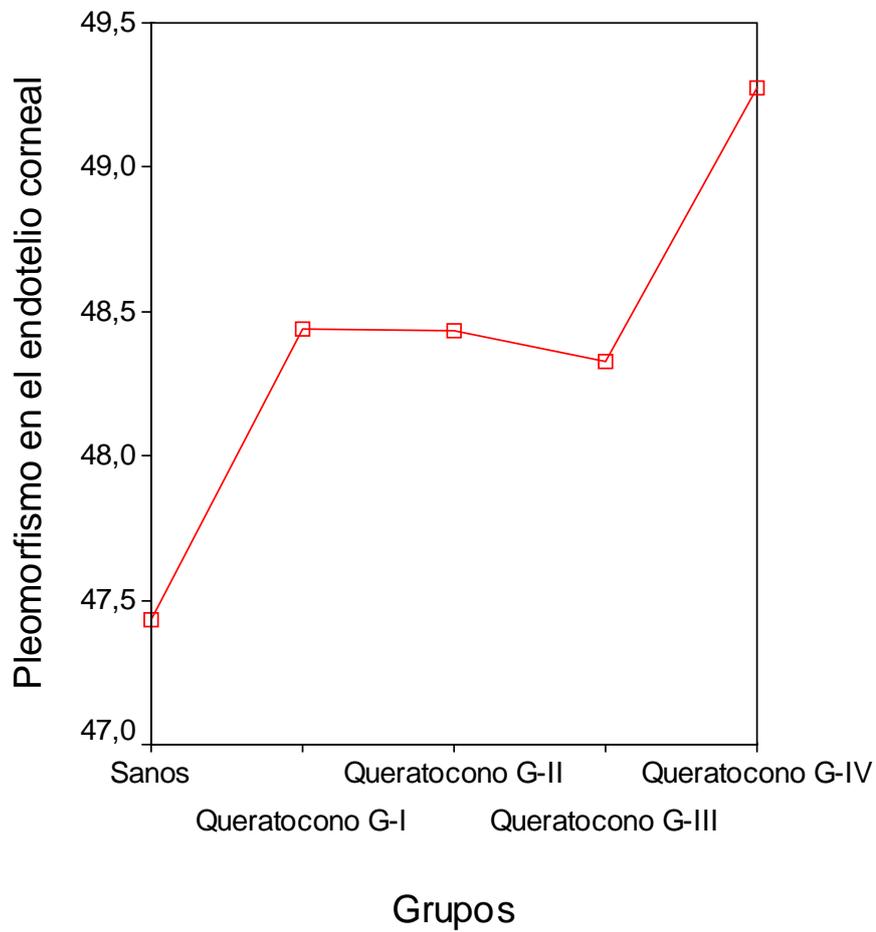


$p^* = 0,915$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 6.

Anexo 3.13. Diferencia de medias del pleomorfismo endotelial, según grupos.

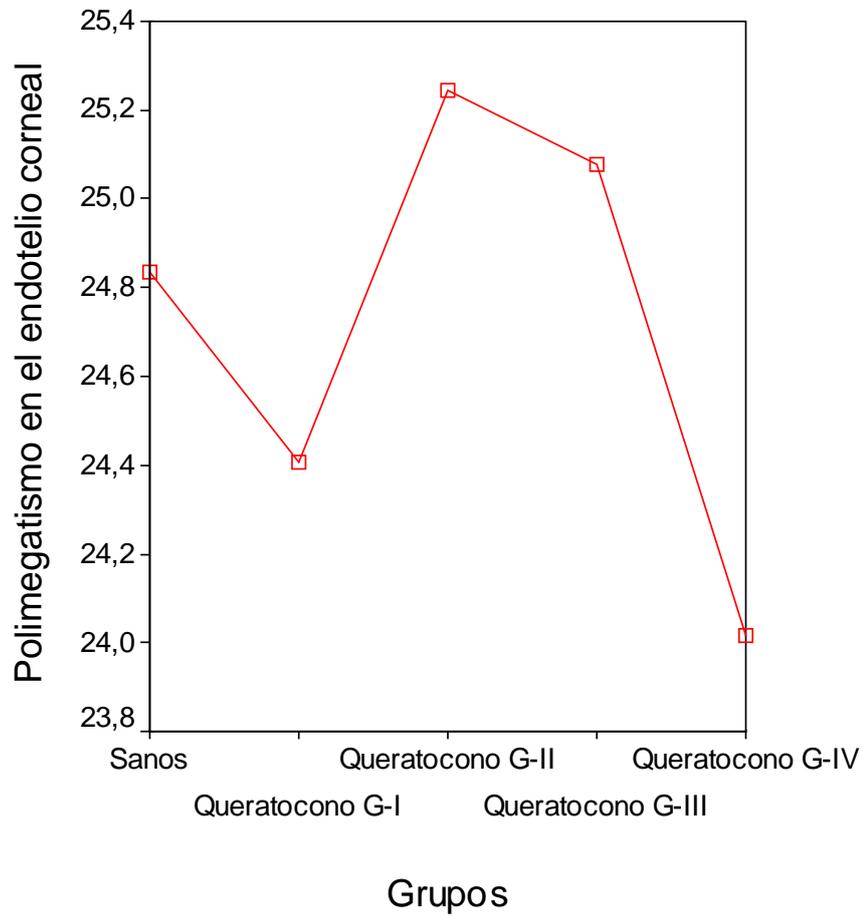


$p^* = 0,968$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 6.

Anexo 3.14. Diferencia de medias del polimegatismo endotelial, según grupos.

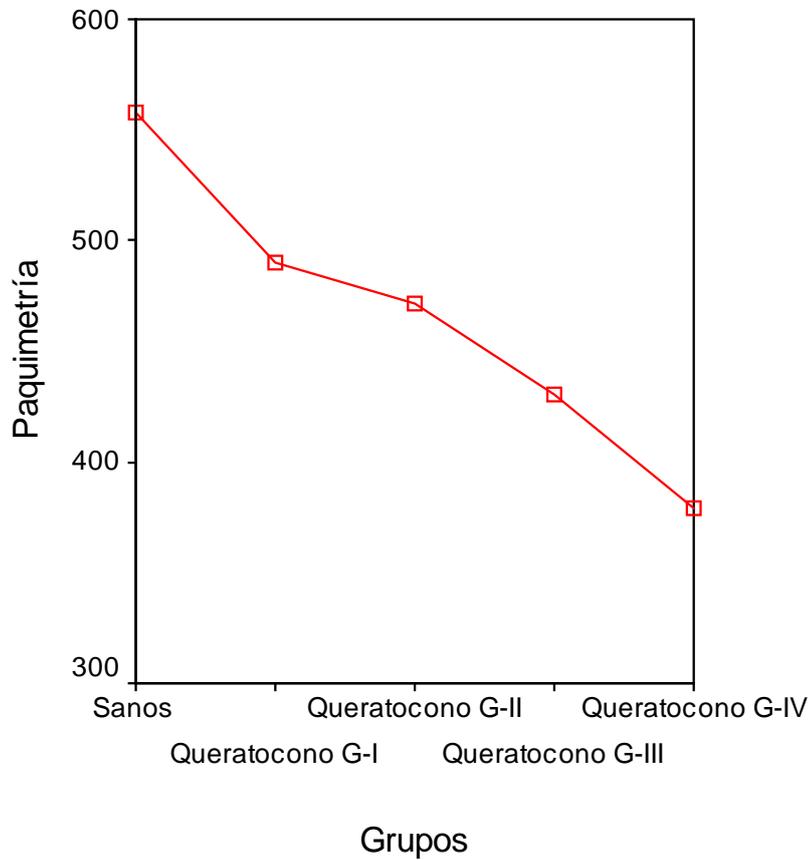


$p^* = 0,972$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 6.

Anexo 3.15. Diferencia de medias de la paquimetría, según grupos.



$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Tabla 7.

Anexo 4. Comparaciones múltiples de las variables morfológicas corneales entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Anexo 4.1. Diferencia de medias de las variables del epitelio superficial entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Variable	Grupos	Diferencia de medias	IC de 95%	p^a
Densidad celular del epitelio superficial (células/mm ²)	Sanos – Grado I	5,62	58,74 – 69,97	0,999
	Sanos – Grado II	13,70	56,33 – 83,73	0,985
	Sanos – Grado III	14,29	87,46 – 116,04	0,996
	Sanos – Grado IV	6,18	98,91 – 111,27	1,000
Diámetro celular del epitelio superficial (µm)	Sanos – Grado I	- 0,050	0,413 – 0,513	0,998
	Sanos – Grado II	-0,022	0,526 – 0,482	1,000
	Sanos – Grado III	-0,025	0,707 – 0,757	1,000
	Sanos – Grado IV	-0,207	0,963 – 0,549	0,947

a: Prueba de Scheffé

Anexo 4.2. Diferencia de medias de las variables del grosor epitelial entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Variable	Grupos	Diferencia de medias	IC de 95%	p^a
Grosor del epitelio corneal (µm)	Sanos – Grado I	1,036	2,174 – 4,247	0,908
	Sanos – Grado II	1,148	2,346 – 4,641	0,902
	Sanos – Grado III	1,647	3,429 – 6,724	0,906
	Sanos – Grado IV	0,589	4,653 – 5,832	0,998

a: Prueba de Scheffé

Anexo 4.3. Diferencia de medias de las variables del epitelio basal entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Variable	Grupos	Diferencia de medias	IC de 95%	p^a
Densidad celular del epitelio basal (células/mm ²)	Sanos – Grado I	243,20	123,39 – 609,79	0,374
	Sanos – Grado II	613,79	214,86 – 1012,73	< 0,01
	Sanos – Grado III	1094,94	515,30 – 1674,57	< 0,01
	Sanos – Grado IV	1132,87	534,23 – 1731,52	< 0,01
Diámetro celular del epitelio basal (µm)	Sanos – Grado I	-0,288	0,782 – 0,206	0,511
	Sanos – Grado II	-0,500	1,038 – 0,037	0,083
	Sanos – Grado III	-1,761	2,542 – 0,980	< 0,01
	Sanos – Grado IV	-1,068	2,775 – 1,162	< 0,01

a: Prueba de Scheffé

Anexo 4.4. Diferencia de medias de las variables de los nervios corneales entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Variable	Grupos	Diferencia de medias	IC de 95 %	p^a
Densidad del plexo nervioso subbasal (mm/mm ²)	Sanos – Grado I	1,671	0,940 – 2,402	< 0,01
	Sanos – Grado II	2,311	1,515 – 3,106	< 0,01
	Sanos – Grado III	3,446	2,290 – 4,602	< 0,01
	Sanos – Grado IV	4,200	3,006 – 5,395	< 0,01
Coeficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal	Sanos – Grado I	0,13	0,53 – 0,26	0,888
	Sanos – Grado II	0,72	1,15 – 0,29	< 0,01
	Sanos – Grado III	1,37	1,99 – 0,74	< 0,01
	Sanos – Grado IV	2,24	2,88 – 1,59	< 0,01
Densidad del plexo estromal (mm/mm ²)	Sanos – Grado I	0,062	0,789 – 0,666	0,999
	Sanos – Grado II	0,030	0,822 – 0,762	1,000
	Sanos – Grado III	0,096	1,247 – 1,055	0,999
	Sanos – Grado IV	0,328	1,516 – 0,861	0,946

a: Prueba de Scheffé.

Anexo 4.5. Diferencia de medias de las variables del estroma corneal entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Variable	Grupos	Diferencia de medias	IC de 95 %	p^a
Densidad de queratocitos en el estroma anterior (mm/mm ³)	Sanos – Grado I	2445,47	1007,30 – 3883,63	< 0,01
	Sanos – Grado II	5069,69	3504,66 – 6634,72	< 0,01
	Sanos – Grado III	6135,18	3861,25 – 8409,11	< 0,01
	Sanos – Grado IV	6637,63	4289,12 – 8986,14	< 0,01
Densidad de queratocitos en estroma medio (mm/mm ³)	Sanos – Grado I	1218,55	468,07 – 1969,02	< 0,01
	Sanos – Grado II	1425,94	609,25 – 2242,62	< 0,01
	Sanos – Grado III	2437,13	1250,52 – 3623,75	< 0,01
	Sanos – Grado IV	2965,37	1739,84 – 4190,89	< 0,01
Densidad de queratocitos en estroma posterior (mm/mm ³)	Sanos – Grado I	653,17	283,59 – 1589,93	0,322
	Sanos – Grado II	972,16	47,23 – 1991,55	0,070
	Sanos – Grado III	1694,53	213,39 – 3175,67	< 0,05
	Sanos – Grado IV	2455,18	925,46 – 3984,89	< 0,01

a: Prueba de Scheffé.

Anexo 4.6. Diferencia de medias de las variables del endotelio corneal entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Variable	Grupos	Diferencia de medias	IC de 95 %	p^a
Densidad celular endotelial (células/mm ²)	Sanos – G I	26,00	105,51 – 179,08	0,984
	Sanos – Grado II	31,76	111,35 – 174,87	0,975
	Sanos – Grado III	23,49	184,45 – 231,42	0,998
	Sanos – Grado IV	20,31	235,06 – 194,45	0,999
Pleomorfismo (%)	Sanos – Grado I	1,007	6,801 – 4,787	0,990
	Sanos – Grado II	0,999	7,304 – 5,306	0,993
	Sanos – Grado III	0,893	10,054 – 8,267	0,999
Polimegatismo (%)	Sanos – Grado I	0,428	3,734 – 4,590	0,999
	Sanos – Grado II	0,411	4,940 – 4,118	0,999
	Sanos – Grado III	0,243	6,823 – 6,337	1,000
	Sanos – Grado IV	0,817	5,979 – 7,613	0,998

a: Prueba de Scheffé.

Anexo 4.7. Diferencia de medias de la paquimetría entre los sujetos sanos y los pacientes con queratocono, según sus grados de gravedad.

Variable	Grupos	Diferencia de medias	IC de 95 %	p^a
Paquimetría (μm)	Sanos – Grado I	67,84	52,25 – 83,43	< 0,01
	Sanos – Grado II	86,23	69,27 – 103,20	< 0,01
	Sanos – Grado III	126,94	102,29 – 151,58	< 0,01
	Sanos – Grado IV	178,38	152,92 – 203,83	< 0,01

a: Prueba de Scheffé.

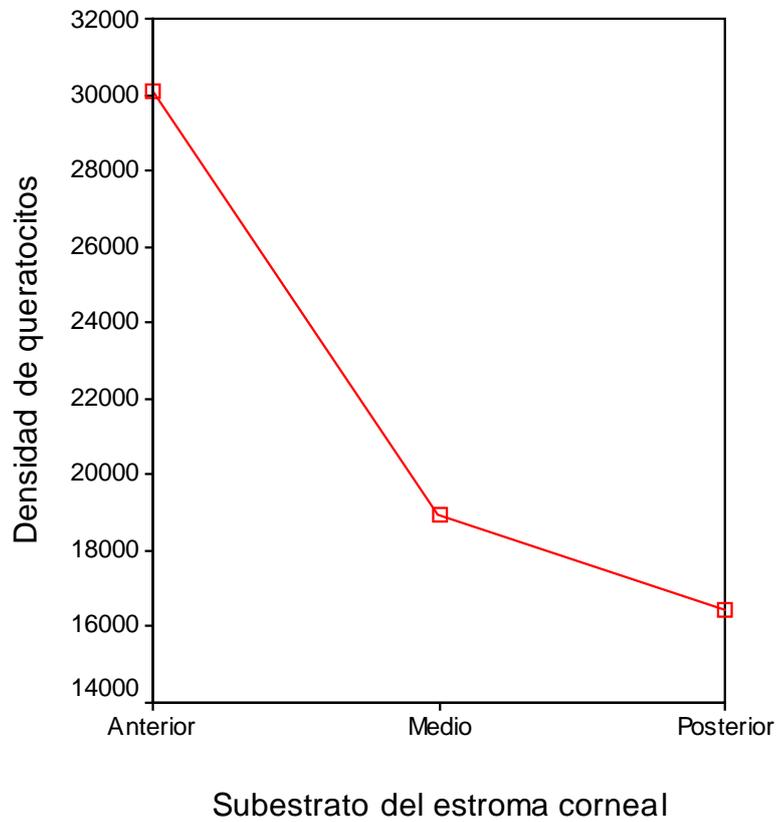
Anexo 5. Diferencia de medias de la densidad de queratocitos entre subregiones del estroma corneal.

Anexo 5.1 Diferencia de medias de la densidad de queratocitos entre subregiones estromales, según grupos.

Grupos	Estroma anterior	Estroma medio	Estroma posterior	p^a
Sanos n = 68 (Media ± DS)	30113,22 ± 2010,090	18941,20 ± 1333,296	16466,84 ± 1447,291	< 0,01
Queratocono Grado -I n = 148 (Media ± DS)	27667,75 ± 2668,251	17722,65 ± 1116,445	15813,67 ± 1528,496	< 0,01
Queratocono Grado -II n = 115 (Media ± DS)	25043,53 ± 2683,085	17515,26 ± 1096,377	15494,68 ± 1666,026	< 0,01
Queratocono Grado -III n = 73 (Media ± DS)	23978,04 ± 2031,363	16504,07 ± 1268,275	14772,31 ± 1190,917	< 0,01
Queratocono Grado -IV n = 16 (Media ± DS)	23475,58 ± 1051,632	15975,83 ± 1546,512	14011,67 ± 1782,628	< 0,01

a: ANOVA de clasificación simple.

Anexo 5.2. Densidad de queratocitos en pacientes sanos, según subestrato del estroma corneal.

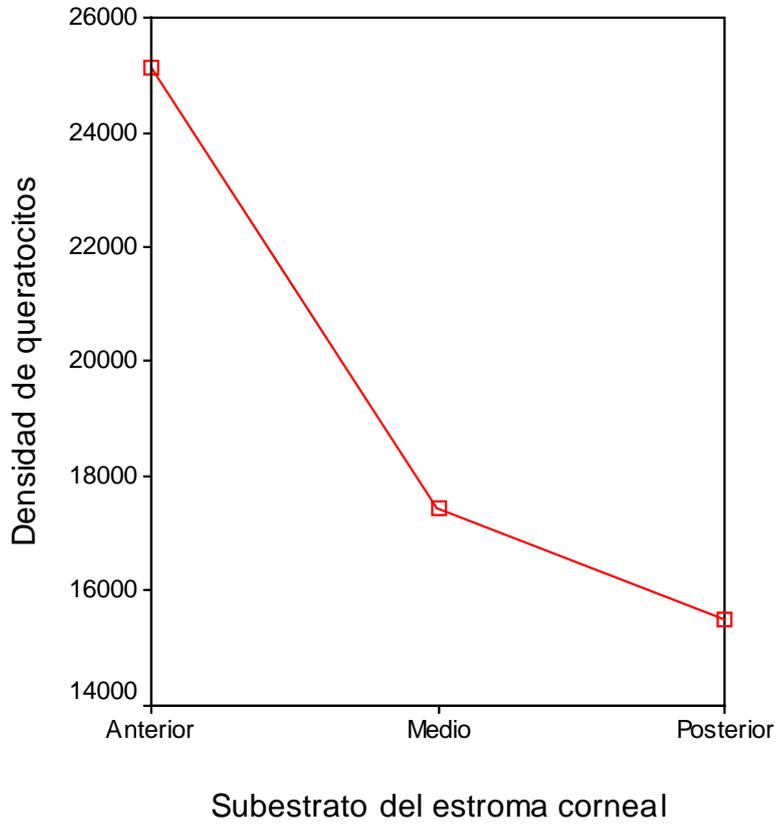


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Anexo 5.1.

Anexo 5.3. Densidad de queratocitos en pacientes con queratocono grado I según sustrato del estroma corneal.

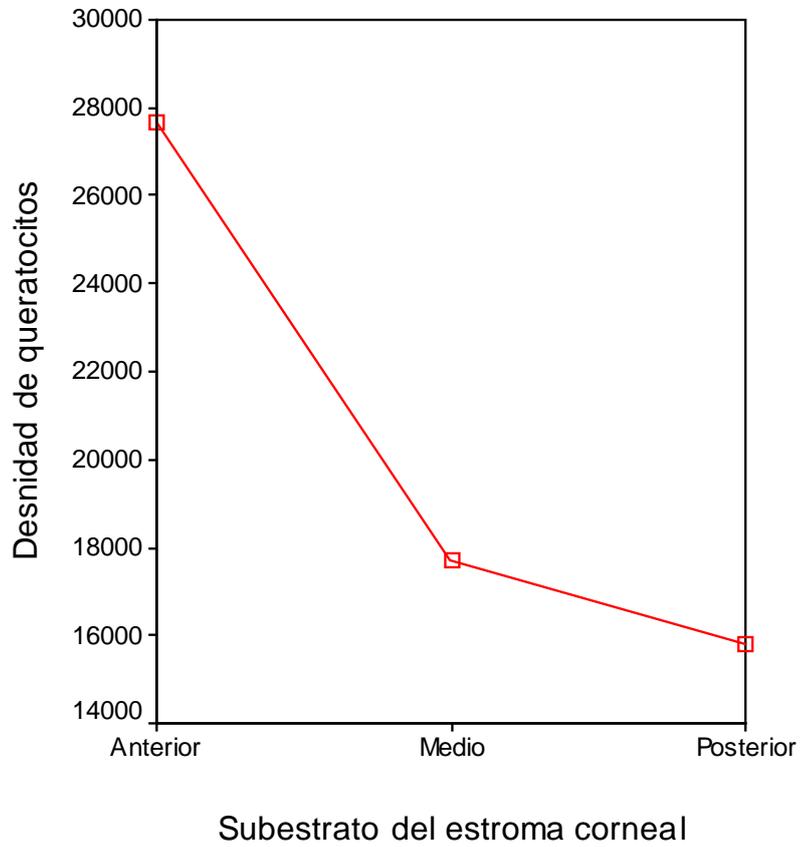


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Anexo 5.1.

Anexo 5.4. Densidad de queratocitos en pacientes con queratocono grado II según sustrato del estroma corneal.

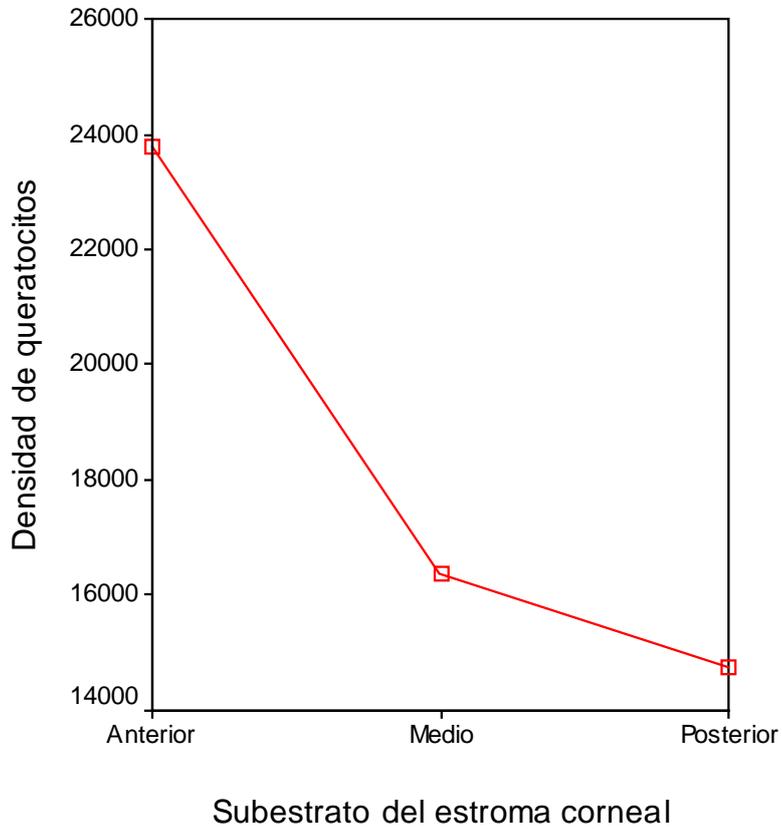


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Anexo 5.1.

Anexo 5.5. Densidad de queratocitos en pacientes con queratocono grado III según sustrato del estroma corneal.

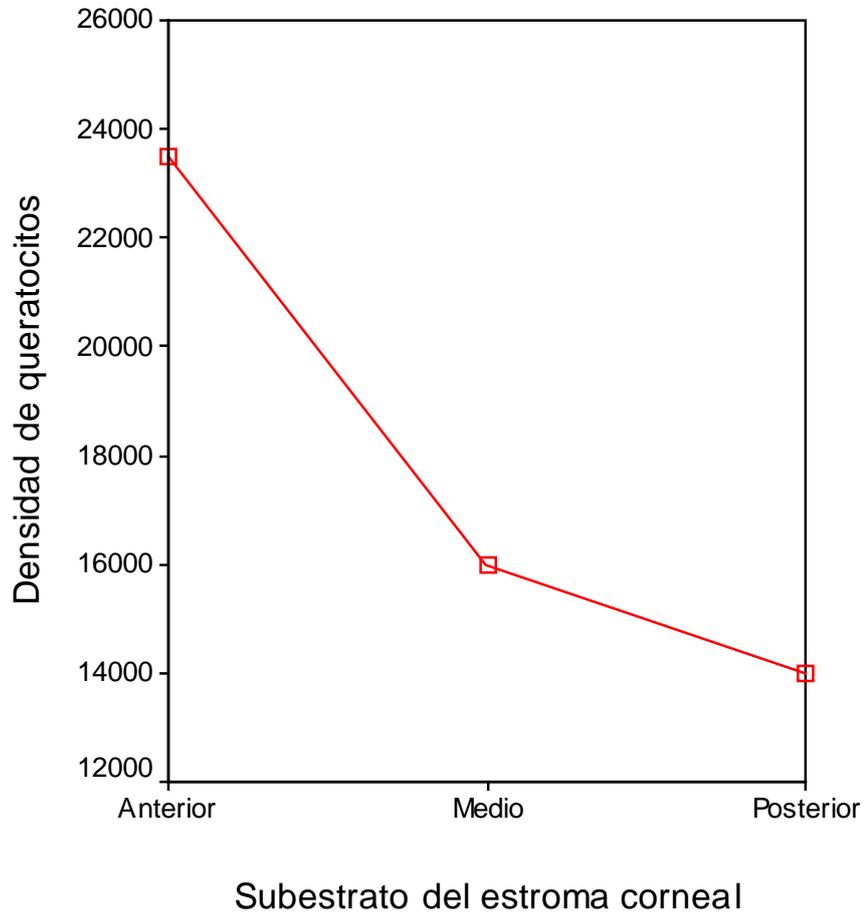


$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Anexo 5.1.

Anexo 5.6. Densidad de queratocitos en pacientes con queratocono grado IV según subestrato del estroma corneal.



$p^* < 0,01$.

*Asociado a ANOVA de clasificación simple.

Fuente: Anexo 5.1.

Anexo 6. Evolución de las variables morfométricas.

Anexo 6.1. Evolución de las variables relacionadas con el epitelio superficial, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial DS n= 352	Seis meses (Media ± DS) n= 340	Un año (Media ± DS) n=331	1,5 años (Media ± DS) n=298	Dos años (Media ± DS) n=265	p*
Densidad celular en el epitelio superficial (células/mm ²)	Grado I	1086,48 ± 103,222	1092,75 ± 110,537	1075,60 ± 108,762	1078,69 ± 98,705	1086,88 ± 99,446	0,900
	Grado II	1078,39 ± 118,618	1051,03 ± 100,394	1076,34 ± 104,390	1069,34 ± 98,336	1058,74 ± 96,163	0,765
	Grado III	1088,77 ± 103,965	1051,55 ± 71,820	1071,82 ± 88,223	1085,45 ± 89,589	1036,36 ± 86,658	0,600
	Grado IV	1085,92 ± 105,326	1074,17 ± 117,098	1071,25 ± 109,421	1067,75 ± 122,912	1081,50 ± 123,920	0,121
Diámetro celular en el epitelio superficial (µm)	Grado I	23,560 ± 0,7663	23,556 ± 0,7666	23,592 ± 0,7884	23,587 ± 0,7716	23,579 ± 0,7492	0,996
	Grado II	23,632 ± 0,7584	23,582 ± 0,7605	23,697 ± 0,7213	23,666 ± 0,7335	23,621 ± 0,7375	0,914
	Grado III	23,600 ± 0,6902	23,717 ± 0,7907	23,625 ± 0,8259	23,700 ± 0,7160	23,592 ± 0,7416	0,912
	Grado IV	23,817 ± 0,6952	23,758 ± 0,6612	23,658 ± 0,5744	23,625 ± 0,8465	23,642 ± 0,6571	0,977

*: Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.2. Evolución de las variables relacionadas con el epitelio basal, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial \pm DS n= 352	Seis meses (Media \pm DS) n= 340	Un año (Media \pm DS) n=331	1,5 años (Media \pm DS) n=298	Dos años (Media \pm DS) n=265	p*
Densidad celular en el epitelio basal (células/mm ²)	Grado I	5279,17 \pm 697,841	5041,13 \pm 558,756	5083,37 \pm 538,161	4997,48 \pm 542,436	4990,25 \pm 513,491	0,707
	Grado II	4908,58 \pm 567,143	4845,53 \pm 604,018	4820,55 \pm 534,397	4829,39 \pm 425,391	4816,68 \pm 449,069	0,828
	Grado III	4797,79 \pm 483,638	4775,45 \pm 353,709	4635,73 \pm 339,529	4641,73 \pm 387,459	4621,91 \pm 392,929	0,732
	Grado IV	4389,50 \pm 288,399	4302,50 \pm 263,666	4294,50 \pm 236,841	4275,08 \pm 349,076	4272,17 \pm 422,754	0,855
Diámetro celular en el epitelio basal (μ m)	Grado I	10,412 \pm 0,6961	10,592 \pm 0,8031	10,677 \pm 0,8380	10,706 \pm 0,9873	10,698 \pm 1,0806	0,376
	Grado II	10,624 \pm 0,8442	11,066 \pm 0,7324	11,213 \pm 0,8543	11,258 \pm 0,8901	11,258 \pm 0,9893	0,099
	Grado III	11,845 \pm 1,1440	11,745 \pm 1,1166	12,091 \pm 0,9669	12,436 \pm 0,9233	12,364 \pm 0,6281	0,095
	Grado IV	12,092 \pm 1,1927	12,108 \pm 1,2753	12,192 \pm 1,1859	12,058 \pm 1,2923	12,083 \pm 1,1551	0,910

*: Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.3 Evolución del grosor del epitelio corneal, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial ± DS n= 352	Seis meses (Media ± DS) n= 340	Un año (Media ± DS) n=331	1,5 años (Media ± DS) n=298	Dos años (Media ± DS) n=265	p*
Grosor epitelial (µm)	Grado I	43,312 ± 5,8039	43,110 ± 6,001	43,135 ± 6,0060	43,033 ± 6,1827	43,210 ± 6,1143	0,580
	Grado II	43,200 ± 5,3124	42,690 ± 5,969	43,139 ± 5,9632	42,866 ± 5,8836	42,797 ± 5,7002	0,188
	Grado III	42,855 ± 5,5875	43,050 ± 5,136	43,400 ± 4,9411	43,336 ± 5,0329	43,409 ± 5,0730	0,943
	Grado IV	43,758 ± 5,2716	41,680 ± 5,161	43,642 ± 5,6739	40,258 ± 4,8496	43,333 ± 4,4549	0,501

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.4. Evolución de las variables relacionadas con el plexo nervioso subbasal corneal, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial \pm DS n= 352	Seis meses (Media \pm DS) n= 340	Un año (Media \pm DS) n=331	1,5 años (Media \pm DS) n=298	Dos años (Media \pm DS) n=265	p*
Densidad del plexo nervioso subbasal (mm/mm²)	Grado I	6,321 \pm 1,2684	6,217 \pm 1,2469	6,002 \pm 1,3012	5,842 \pm 1,2710	5,840 \pm 1,3070	0,110
	Grado II	5,682 \pm 1,0915	5,468 \pm 1,1914	5,176 \pm 1,3314	5,482 \pm 1,3837	5,116 \pm 1,6045	0,081
	Grado III	4,763 \pm 0,7747	5,055 \pm 0,6802	4,836 \pm 1,3793	5,082 \pm 0,8830	4,827 \pm 1,6359	0,741
	Grado IV	3,792 \pm 0,7489	3,775 \pm 0,6196	3,992 \pm 0,8174	3,975 \pm 0,9127	3,667 \pm 0,6110	0,181
Coefficiente de tortuosidad del plexo nervioso subbasal	Grado I	1,23 \pm 0,469	1,23 \pm 0,480	1,25 \pm 0,536	1,26 \pm 0,579	1,29 \pm 0,603	0,154
	Grado II	1,82 \pm 0,896	1,84 \pm 0,916	1,87 \pm 0,906	1,92 \pm 0,969	1,95 \pm 0,985	0,421
	Grado III	2,18 \pm 0,982	2,18 \pm 0,982	2,27 \pm 1,009	2,36 \pm 0,924	2,55 \pm 0,934	0,441
	Grado IV	3,33 \pm 0,778	3,42 \pm 0,669	3,42 \pm 0,793	3,50 \pm 0,674	3,50 \pm 0,674	0,436

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.5. Evolución de la densidad del plexo nervioso estromal, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial ± DS n= 352	Seis meses (Media ± DS) n= 340	Un año (Media ± DS) n=331	1,5 años (Media ± DS) n=298	Dos años (Media ± DS) n=265	p*
Densidad del plexo nervioso estromal (mm/mm ²)	Grado I	2,942 ± 1,3245	3,131 ± 0,8844	2,925 ± 1,1107	3,206 ± 0,8888	2,854 ± 1,2403	0,396
	Grado II	2,911 ± 1,0577	3,013 ± 1,0070	2,937 ± 0,9982	3,055 ± 1,0847	3,392 ± 1,4108	0,216
	Grado III	3,218 ± 1,3811	3,164 ± 1,2564	3,355 ± 1,2111	3,591 ± 1,3011	3,300 ± 1,0227	0,206
	Grado IV	3,208 ± 0,9405	3,425 ± 0,5259	2,933 ± 0,9355	3,025 ± 0,7990	3,250 ± 1,2303	0,569

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.6. Evolución de la densidad de queratocitos en el estroma anterior, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial \pm DS n= 352	Seis meses (Media \pm DS) n= 340	Un año (Media \pm DS) n=331	1,5 años (Media \pm DS) n=298	Dos años (Media \pm DS) n=265	p*
Densidad de queratocitos en estroma anterior (células/mm ³)	Grado I	27667,75 \pm 2668,251	27184,63 \pm 2800,233	27971,13 \pm 2503,553	27650,92 \pm 2557,439	27504,69 \pm 3784,890	0,723
	Grado II	25043,53 \pm 2683,085	24511,29 \pm 2421,256	24301,74 \pm 2114,935	24340,76 \pm 2483,230	24121,11 \pm 2464,083	0,303
	Grado III	23474,22 \pm 1750,676	23124,00 \pm 1657,617	22664,55 \pm 1622,101	22509,82 \pm 2205,341	22666,91 \pm 1745,881	0,312
	Grado IV	23475,58 \pm 1051,632	23290,17 \pm 1145,565	22891,67 \pm 1250,724	22173,42 \pm 1008,387	22071,00 \pm 1088,388	< 0,05

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.7. Evolución de la densidad de queratocitos en el estroma medio, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial \pm DS n= 352	Seis meses (Media \pm DS) n= 340	Un año (Media \pm DS) n=331	1,5 años (Media \pm DS) n=298	Dos años (Media \pm DS) n=265	p*
Densidad de queratocitos en estroma medio (células/mm ³)	Grado I	17722,65 \pm 1116,445	17812,65 \pm 1099,042	17696,38 \pm 929,890	17704,77 \pm 1013,162	17610,2 \pm 920,900	0,448
	Grado II	17515,26 \pm 1096,377	17694,63 \pm 887,776	17480,08 \pm 837,569	17550,66 \pm 958,525	17535,0 \pm 757,284	0,099
	Grado III	16463,80 \pm 1382,358	17908,73 \pm 743,516	17538,18 \pm 930,585	17224,09 \pm 707,219	17157,5 \pm 942,311	0,124
	Grado IV	15975,83 \pm 1546,512	15761,50 \pm 1227,149	15625,92 \pm 1225,894	15592,67 \pm 1229,553	15584,6 \pm 1328,96	0,701

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.8. Evolución de la densidad de queratocitos en el estroma posterior, según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial ± DS n= 352	Seis meses (Media ± DS) n= 340	Un año (Media ± DS) n=331	1,5 años (Media ± DS) n=298	Dos años (Media ± DS) n=265	p*
Densidad de queratocitos en estroma posterior (células/mm ³)	Grado I	15813,67 ± 1528,496	16022,17 ± 1340,257	16063,00 ± 1284,252	15954,33 ± 1353,618	15946,63 ± 1176,062	0,628
	Grado II	15494,68 ± 1666,026	15872,55 ± 976,657	15936,39 ± 1024,363	15950,39 ± 1060,581	15894,00 ± 854,062	0,547
	Grado III	14696,55 ± 1202,426	15430,09 ± 954,624	15140,45 ± 936,548	14889,27 ± 982,903	14954,18 ± 916,128	0,401
	Grado IV	14011,67 ± 1782,628	13932,42 ± 1609,711	13788,17 ± 1545,062	13612,75 ± 1449,518	1356,58 ± 1416,335	0,636

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.9. Evolución de las variables relacionadas con el endotelio corneal , según gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial \pm DS n= 352	Seis meses (Media \pm DS) n= 340	Un año (Media \pm DS) n=331	1,5 años (Media \pm DS) n=298	Dos años (Media \pm DS) n=265	p*
Densidad de células del endotelio corneal (células/mm ²)	Grado I	2571,44 \pm 203,79	2568,92 \pm 289,45	2578,50 \pm 290,56	2550,13 \pm 254,95	2549,96 \pm 271,33	0,088
	Grado II	2565,68 \pm 235,31	2587,89 \pm 289,24	2576,16 \pm 328,00	2564,00 \pm 315,83	2554,39 \pm 323,34	0,535
	Grado III	2564,77 \pm 133,81	2558,09 \pm 162,47	2532,82 \pm 162,67	2544,36 \pm 133,46	2541,73 \pm 135,76	0,957
	Grado IV	2576,08 \pm 194,55	2576,25 \pm 176,14	2592,33 \pm 183,41	2598,50 \pm 175,12	2604,92 \pm 170,41	0,234
Pleomorfismo (%)	Grado I	48,442 \pm 9,39	48,802 \pm 11,31	49,219 \pm 10,58	49,071 \pm 10,28	49,090 \pm 9,9	0,672
	Grado II	48,434 \pm 9,075	50,966 \pm 8,619	49,708 \pm 8,540	48,826 \pm 9,376	48,855 \pm 9,015	0,510
	Grado III	46,979 \pm 9,30	47,891 \pm 9,49	49,064 \pm 11,08	48,964 \pm 8,12	48,964 \pm 9,38	0,279
	Grado IV	49,275 \pm 6,241	49,017 \pm 9,101	46,950 \pm 7,652	51,050 \pm 8,256	49,958 \pm 11,29	0,870
Polimegatismo (%)	Grado I	24,106 \pm 6,19	23,923 \pm 6,58	24,167 \pm 6,64	23,983 \pm 7,63	24,300 \pm 6,09	0,323
	Grado II	25,245 \pm 7,65	26,024 \pm 7,83	27,774 \pm 7,29	27,766 \pm 7,63	27,184 \pm 8,03	0,512
	Grado III	25,573 \pm 6,86	27,818 \pm 6,00	26,836 \pm 5,81	27,791 \pm 5,16	26,874 \pm 6,02	0,668
	Grado IV	24,017 \pm 8,32	24,183 \pm 7,68	24,075 \pm 7,52	23,317 \pm 6,02	23,442 \pm 7,69	0,488

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.10. Evolución de la paquimetría, según la gravedad del queratocono.

Variable	Gravedad del queratocono	Valor inicial ± DS n= 352	Seis meses (Media ± DS) n= 340	Un año (Media ± DS) n=331	1,5 años (Media ± DS) n=298	Dos años (Media ± DS) n=265	p*
Paquimetría (μ)	Grado I	489,79 ± 20,154	488,62 ± 18,668	487, 15 ± 18,851	487,15 ± 18,837	486,87 ± 19,149	<0,01
	Grado II	471,39 ± 16,885	469,55 ± 17,103	469,08 ± 16,240	468,00 ± 16,119	467,68 ± 16,094	<0,01
	Grado III	435,55 ± 20,275	427,91 ± 17,207	426,64 ± 17,397	422,00 ± 20,386	416,00 ± 29,288	<0,01
	Grado IV	370,92 ± 54,298	343,25 ± 62,164	322,25 ± 59,069	309,83 ± 53,652	300,58 ± 52,928	<0,01

*Asociado a ANOVA de medidas repetidas.

Anexo 6.11. Diferencia de medias de la densidad de queratocitos en el estroma anterior entre la consulta inicial y las subsiguientes, en pacientes con Grado IV de gravedad del queratocono.

Intervalo de tiempo	Diferencia de medias	IC de 95 %	P*
Consulta inicial – 6 meses	185,410	77,145 – 723,688	0,221
Consulta inicial –1 año	583,917	122,029 – 1289,862	0,146
Consulta inicial – 1,5 años	1302,167	420,918 – 2183,416	<0,01
Consulta inicial –2 años	1404,583	429,828 – 2379,339	<0,01

* Prueba de Bonferroni.

Anexo 6.12. Diferencia de medias de la paquimetría entre la consulta inicial y las subsiguientes, en pacientes con grado I de gravedad del queratocono.

Intervalo de tiempo	Diferencia de medias	IC de 95 %	p*
Consulta inicial – 6 meses	1,173	-0,189 – 2,535	0,146
Consulta inicial –1 año	2,635	1,029 – 4,240	<0,01
Consulta inicial – 1,5 años	2,635	0,741 – 4,528	<0,01
Consulta inicial –2 años	2,923	0,930 – 4,916	<0,01

* Prueba de Bonferroni.

Anexo 6.13. Diferencia de medias de la paquimetría entre la consulta inicial y las subsiguientes, en pacientes con grado II de gravedad del queratocono.

Intervalo de tiempo	Diferencia de medias	IC de 95 %	p*
Consulta inicial – 6 meses	1,842	0,686 – 2,999	<0,01
Consulta inicial –1 año	2,316	0,847 – 3,784	<0,01
Consulta inicial – 1,5 años	3,395	0,984 – 5,806	<0,01
Consulta inicial –2 años	3,711	0,554 – 6,867	<0,01

* Prueba de Bonferroni.

Anexo 6.14. Diferencia de medias de la paquimetría entre la consulta inicial y las subsiguientes, en pacientes con grado III de gravedad del queratocono.

Intervalo de tiempo	Diferencia de medias	IC de 95 %	p*
Consulta inicial – seis meses	7,636	6,337 – 21, 610	<0,01
Consulta inicial – un año	8,909	6,891 – 24,709	<0,01
Consulta inicial – 1,5 años	13,545	9,465 – 36,556	<0,01
Consulta inicial – dos años	19,545	13,854 – 52,945	<0,01

* Prueba de Bonferroni.

Anexo 6.15. Diferencia de medias de la paquimetría entre la consulta inicial y las subsiguientes, en pacientes con grado IV de gravedad del queratocono.

Intervalo de tiempo	Diferencia de medias	IC de 95 %	p*
Consulta inicial – 6 meses	27,667	34,769 – 90,102	<0,01
Consulta inicial –1 año	48,667	11,350 – 108,683	<0,01
Consulta inicial – 1,5 años	61,083	22,840 – 109,327	<0,01
Consulta inicial –2 años	70,333	26,335 – 104,332	<0,01

*Prueba de Bonferroni.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

Artículos publicados

Como primer autor:

- 1- Microscopía confocal en las distrofias corneales. Revista Archivos de Oftalmología de Buenos Aires; 2011.
- 2- Características microscópicas in vivo del plexo nervioso subbasal corneal en pacientes con queratocono. Revista Cubana de Oftalmología; 2013.

Como coautor:

- 3- Densidad celular corneal en pacientes sanos, estudio in vivo por microscopía confocal. Revista Electrónica Zoilo Marinello Vidaurreta; 2012.
- 4- Morfometría corneal in vivo versus magnitud de la ametropía en pacientes operados con láser de excimeros por la técnica LASIK. Revista Vision Pan-America; 2012.
- 5- Microscopía confocal en cirugía refractiva corneal: ¿útil o imprescindible? Revista Cubana de Oftalmología; 2013.

Participación en eventos científicos

1. Convención Calixto García 2011 (La Habana, enero de 2011)

Ponencia:

- Microscopía confocal en las distrofias corneales.

2. XVIII Jornada provincial de Oftalmología “V Aniversario de la Misión Milagro”(Pinar del Río, abril de 2011).

Ponencias:

- Características microscópicas in vivo de la córnea en pacientes con Queratocono.
- Alteraciones topoaberrométricas de la superficie corneal anterior en pacientes con Queratocono.
- Evaluación de la superficie ocular mediante Microscopía confocal.

3. Jornada Científica de Oftalmología (Hospital “Hermanos Ameijeiras”, La Habana, junio de 2011).

Ponencias:

- Características microscópicas in vivo de la córnea en pacientes con Queratocono.

- Alteraciones topoaberrométricas en pacientes con Queratocono.

4. Jornada Científica XXIII Aniversario del Centro de Microcirugía

Ocular (Pinar del Río, abril de 2011)

Ponencia:

- Características microscópicas *in vivo* de la córnea en pacientes con Queratocono.

5. Jornada Científica XXIV Aniversario del Centro de Microcirugía

**Ocular, V Taller Nacional de catarata (ICO “Ramón Pando Ferrer”,
La Habana, abril de 2012).**

Ponencias:

- Asociación de Queratocono con otras distrofias oculares, a propósito de tres casos.
- Morfometría corneal a nivel celular en el Queratocono.

6. XVII Jornada científico profesoral y de profesionales de la salud, III

Convención de salud.

Ponencia:

- Características microscópicas *in vivo* de la córnea en pacientes con Queratocono.

7. Convención Calixto García 2012 (La Habana, 2012).

Ponencias:

- Características microscópicas *in vivo* del epitelio corneal en pacientes con Queratocono.
- Características microscópicas *in vivo* del estroma corneal en pacientes con Queratocono.
- Características microscópicas *in vivo* del endotelio corneal en pacientes con Queratocono.
- Distrofia epitelial corneal y Queratocono, a propósito de un caso.