

Estudio del endotelio corneal en el queratocono por microscopia confocal

Study of the corneal endothelium confocal microscopy in keratoconus

Dra. María del Carmen Benítez Merino, Dr. Héctor Manú Bogado, Dr. Urbano Rodríguez de Paz, DrC. Juan Raúl Hernández Silva, Dra. Carmen María Padilla González

Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: Describir los hallazgos morfométricos del endotelio corneal por microscopia confocal con CONFOSCAN S-4.

Métodos: Estudio descriptivo transversal de 102 ojos con queratocono en el período de septiembre de 2008 a septiembre 2009. A estos pacientes se les realizó microscopia confocal con CosfoscanS-4 para el estudio del endotelio corneal atendiendo el grado de queratocono. Se analizó el comportamiento de la evolución del queratocono según edad y sexo. Las imágenes fueron analizadas y procesadas mediante un programa informático diseñado específicamente para esto.

Resultados: Fueron semejantes las edades de los pacientes con queratocono grado I y II, (35,2 y 34,7 años), los grado III presentaron una edad promedio mayor (38,4 años), sin diferencias significativas ($p= 0,279$). El sexo femenino predominó en 80,4 % de los pacientes. El 100 % de los queratoconos grado III tuvieron endotelios patológicos. Los valores promedios de la densidad celular en los queratoconos grado III (2585,9 células/mm²) resultó no significativo ($p= 0,339$). El polimegatismo en los queratoconos grado III para un 48,69 % fue significativo ($p= 0,002$). En el pleomorfismo resultó significativo las diferencias observadas entre los tres grados ($p= 0,002$).

Conclusión: Predominó el queratocono grado II para las mujeres y el grado I para los hombres. Los hallazgos morfológicos se manifestaron en la forma y tamaño de las células endoteliales. En córneas con queratocono grado II y III confluyeron células de mediano y gran tamaño con pérdida de su hexagonalidad. La densidad celular se mantuvo dentro del rango de valores normales para cualquier grado de queratocono.

Palabras clave: Queratocono, microscopia confocal, endotelio corneal.

ABSTRACT

Objective: To describe the morphometric findings of the corneal endothelium confocal microscopy with CONFOSCAN S-4

Methods: Descriptive cross-sectional study of 102 eyes with keratoconus performed from September 2008 to September 2009. The study patients had undergone confocal microscopy with CONFOSCAN S-4 in order to study their corneal endothelium according to the keratoconus condition. The evolution of keratoconus was analyzed in terms of age and sex. Tailor-made software made the analysis and processing of images possible.

Results: The ages of patients with keratoconus grades I and II, (35.2 and 34.7 years) were pretty similar whereas the average age of keratoconus grade III patients (38.4 years) was higher, but no significant differences were found ($p= 0.279$). Females prevailed (in our study accounting for 80.4 %). One hundred percent of keratoconus grade III presented with pathological endothelium. The values averages of the cell density in the keratoconus grade III (2585.9 cell/mm²) it was not significant ($p= 0.339$). The polymegathism of 48.69 % in the keratoconus grade III were significant ($p= 0.002$). As for the pleomorphism, the differences were statistically significant among the three grades ($p= 0.002$)

Conclusions: Keratoconus grade II prevailed in women and the grade I in men. From the morphological point of view, the morphological findings lied in the form and size of the endothelial cells. Keratoconus grade II and II showed a combination of medium and large cells and loss of hexagonal shape. The cell density was within the normal range of values for any keratoconus grade.

Key words: Keratoconus, confocal microscopy, corneal endothelium.

INTRODUCCIÓN

El endotelio corneal constituye una monocapa de células cuboides que forman un mosaico hexagonal. Ultraestructuralmente no muestra adhesiones especializadas hacia la membrana de Descemet que la separa del estroma. Si bien existen interdigitaciones intercelulares y algunos desmosomas, no se aprecian espacios intercelulares. Estas invaginaciones son las que facilitan a las células, su despliegue para cubrir la pérdida celular constante.¹⁻⁵

Una característica del endotelio corneal y diferencia del epitelio, es su incapacidad para la renovación celular. Esto origina una pérdida de población celular con la edad, así como una disminución de su grosor al estar obligadas a cubrir toda la superficie corneal posterior. Este envejecimiento puede darse de forma exagerada en distrofias y como consecuencia de enfermedad o cirugía ocular. Las investigaciones del endotelio corneal han sido objeto de interés desde su posibilidad de estudio clínico, que permite el análisis de las estructuras celulares y su densidad. En el adulto joven existen entre 3000 y 3500 células/mm², se estiman como críticas las cifras entre 500 y 700 células/mm². La pérdida endotelial se manifiesta además por el polimegatismo (diversidad de tamaño entre las células), pleomorfismo (diversidad de formas) y aumento de la poligonalidad, asociado a un incremento de la permeabilidad.¹⁻⁵

Se denomina queratocono en forma genérica a cualquier protrusión corneal ya sea cónica al centro, con elevación en la periferia o globosa total, según los criterios de la academia americana. Según diferentes estudios, el queratocono es una alteración de la córnea, a menudo bilateral, que presenta deformidad y adelgazamiento, progresa lentamente y se desarrolla entre la pubertad y los 30 años.³⁻⁶

El queratocono (QC) tiene una incidencia en la población mundial de 2 casos/ /100 000 hab/año y una prevalencia de 54/100 000 habitantes. La incidencia de QC subclínico es mucho mayor (hasta el 5,5 % de los miopes que demandan cirugía refractiva tienen alteraciones topográficas).⁶⁻⁸

El mecanismo por el cual se produce el queratocono, se explica desde el interior de la córnea donde encontramos un gran número de fibras de colágeno que constituyen la armazón interna de este tejido. Esto le confiere flexibilidad y elasticidad.⁹⁻¹⁴ Las fibras de colágeno conforman una red perfectamente ordenada. Si esta red sufre rupturas en sus enlaces se producen las ectasias corneales entre las cuales, se encuentra el queratocono.¹⁵⁻³⁰

El queratocono se manifiesta con mayor frecuencia en enfermedades que tienen relación directa con una alteración del colágeno, y se asocia a importantes patologías oculares.^{1-4,31} La topografía corneal permite el diagnóstico precoz y diferencial del QC, además de proporcionar la información necesaria para el tratamiento del mismo.^{4,28,31}

El estudio de la córnea se ha facilitado más tras el advenimiento de la microscopia confocal (MC) en la oftalmología en 1955 -introducida por *Marvin Minsky* y patentada más tarde en 1957- ha abierto nuevos horizontes en el estudio, diagnóstico y tratamiento de estos pacientes. Ha llegado a convertirse en una herramienta en extremo útil, por representar un estudio histológico en vivo. Entre sus aplicaciones encontramos: evaluación de la película lagrimal, la bula de filtración posquirugía de glaucoma, diversas enfermedades corneales; también se ha utilizado en el pronóstico y seguimiento de pacientes con cirugía refractiva y de córnea.^{1,18,32,33}

La importancia de la MC radica en que constituye una nueva y poderosa herramienta para examinar las estructuras tisulares y sus funciones. Podemos resumir sus ventajas: proporciona imágenes detalladas de las capas corneales, pueden observarse tejidos intactos, secciones gruesas sin necesidad de hacer cortes histológicos, la evaluación prospectiva y reiterativa en el tiempo. Esto último permite la evolución de los cambios de las características microscópicas clínicas, siguiendo un período con o sin enfermedad corneal. Se obtiene un aumento notable en la resolución, especialmente en muestras con fluorescencia, porque reduce su blanqueado. Permite realizar reconstrucciones tridimensionales más precisas, de mejor calidad y en menor tiempo que por otros métodos; además realiza un estudio no invasivo y a nivel celular.^{34,35}

El queratocono se evalúa en nuestro centro y esto nos motivó a revisar la literatura, buscando su repercusión sobre el endotelio corneal. Varios estudios refieren cambios en la morfología, con coeficiente de variación del tamaño celular aumentados y descenso en el porcentaje de células endoteliales hexagonales sin disminución de la densidad celular. Lo anterior demuestra que la tensión producida sobre la córnea produce una remodelación endotelial en este padecimiento.^{34,35}

Tomando en cuenta lo antes expuesto y sabiendo que el QC es un problema importante para la salud visual, nos motivamos a realizar este trabajo con el objetivo de describir los hallazgos morfométricos del endotelio corneal según el

grado de QC por MC con CONFOSCAN S-4, y el comportamiento de la evolución de este según edad y sexo en nuestro entorno.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, cuyo universo lo conformaron los pacientes portadores de queratocono atendidos en el Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer" en el período entre septiembre de 2008 a septiembre de 2009. A todos se les realizó una microscopia endotelial de no contacto con el CONFOSCAN S-4.

Fueron estudiados 102 ojos de pacientes que fueron escogidos de forma consecutiva, de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: pacientes con diagnóstico de queratocono de los cuales se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Se excluyeron aquellos que rechazaron o no cooperaron con el examen (pacientes pediátricos, portadores de patología psiquiátrica o Síndrome de Down), los portadores de malformaciones oculares asociadas al queratocono, los que presentaban cirugía ocular previa (queratoplastia, catarata, queratocono, *pterygium*, y otros) y glaucomatosos.

La recogida de la información se realizó mediante los datos de la historia clínica. Se les realizó: refracción, queratometría, paquimetría, topografía corneal y microscopia confocal (se utilizó la microscopia endotelial de no contacto por el microscopio confocal CONFOSCAN S-4/NIDEK de cuarta generación). Este equipo usa plataforma Linux y software NAVIS que permitió evaluar los resultados.

Las imágenes del endotelio fueron escaneadas y grabadas antes de su análisis. Se evaluaron las que tenían mayor calidad y estaban bien enfocadas. Las variables estudiadas fueron: edad del paciente, sexo, morfología del endotelio corneal, porcentaje de polimegatismo, porcentaje de pleomorfismo y densidad celular del endotelio corneal. Se exploró solamente la densidad de esta capa celular teniendo en cuenta que el software del equipo solo está destinado para el endotelio. El análisis se realizó comparando el resultado del paciente con una base de datos que tiene almacenada para cada edad.

Los resultados se clasificaron como: normal, sospechoso o patológico. Se tuvo en cuenta el análisis del polimegatismo y pleomorfismo de las células endoteliales basado en los siguientes criterios:

Polimegatismo (alteraciones en el tamaño celular):

- Normal: menos de 30 % de las células.
- Sospechoso: entre 30 y 33 %.
- Patológico: más de 33 %.

Pleomorfismo (alteraciones en la morfología):

- Normal: menos de 54 % de las células.
- Sospechoso: entre 54 y 59,6 %.
- Patológico: más de 59,6 %.

Los datos fueron procesados por medio del programa estadístico SPSS versión 11.5. Los resultados se resumen en tablas y gráficos. Para las variables cualitativas se emplearon frecuencias absolutas y relativas y para las variables cuantitativas se determinaron las medias y desviaciones estándar. Para el análisis de los mismos se utilizó la prueba estadística de chi cuadrado y el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para las pruebas estadísticas empleadas se consideró que existía diferencia significativa entre los grupos cuando la probabilidad fuera menor del 0,05 asociada a las diferentes pruebas.

RESULTADOS

De acuerdo con el total de pacientes analizados la edad media fue de 35,98 años, con un intervalo entre 34,0 a 37,9 años de edad. Resultaron muy pequeñas las diferencias entre pacientes con queratocono grado I y II, (35,2 y 34,7 años respectivamente). Los pacientes con queratocono grado III presentaron una edad promedio algo mayor, 38,4 años. Sin embargo no se encontró diferencias significativas entre ninguno de los grupos ($p= 0,279$ asociada a ANOVA de una vía).

El sexo femenino fue el más representado en nuestro estudio con 82 para el 80,4 % del total de ojos, predominó el grado II de queratocono con 32 ojos (39 %). Para el sexo masculino prevalecieron los pacientes con queratocono grado I (55 %). Las diferencias observadas en los grados de queratocono en ambos sexos resultaron no significativas estadísticamente ($p= 0,094$ asociada a X^2).

De los 102 ojos, 89 (86,2 %) presentaron alteraciones en su morfología endotelial y clasificaron: 8 (7,8 %) dentro de los sospechosos, 81 (79,5 %) como patológicos, Solamente 13 ojos (12,7 %) no tuvieron alteración de la morfología endotelial ($p= 0,001$ asociada a X^2). Para los tres grados de queratocono el mayor porcentaje de los ojos tenían endotelios patológicos, pero fue significativo el 100 % de endotelios patológicos en los grado III. Los casos con endotelio normal pertenecían a queratoconos grado I y II (Fig. 1).

El valor de la densidad celular promedio fue de 2 677,3 células/mm² con un intervalo para la media de 2 598,1 a 2 756,5 células/mm². A pesar de observarse una disminución en los valores promedios de la densidad celular en los pacientes con queratocono grado III (2 585,9 células/mm²), esta variación resultó no significativa ($p= 0,339$ asociada a ANOVA de una vía).

Pudo observarse un promedio general de 42,5 % de polimegatismo que osciló entre 39 y 40 % en el queratocono grado I y II respectivamente. En los queratoconos grado III hasta un 48,69 % y se consideró estadísticamente significativo las diferencias observadas. ($p= 0,002$ asociada a ANOVA de una vía).

En los valores de pleomorfismo se observó un promedio general de 48,6 % que se incrementó desde 42,4 % en el grado I, hasta el 52,8 % para los grado III, Se consideró al igual que el polimegatismo, estadísticamente significativo las diferencias observadas entre los tres grupos ($p= 0,002$ asociada a ANOVA de una vía) (Fig. 2).

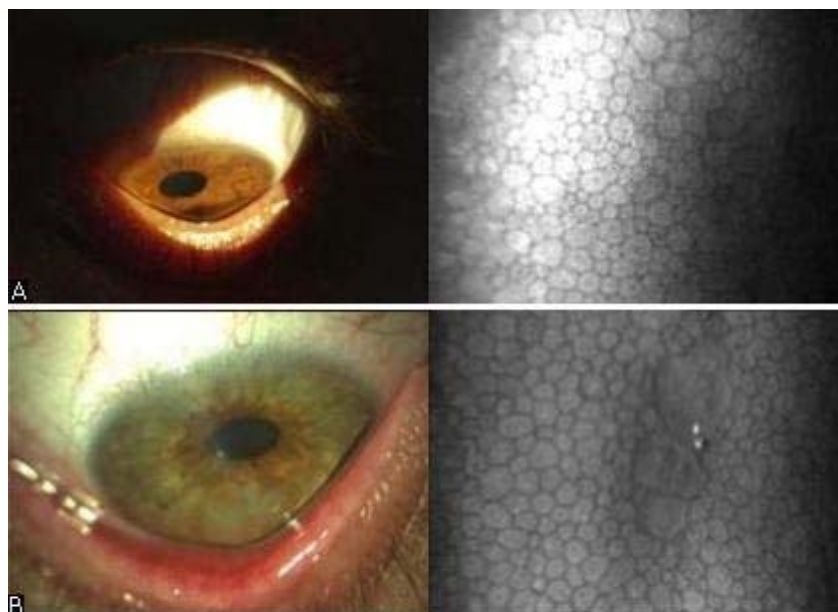


Fig. 1. Correspondencia clínica y celular en el queratocono. A: queratocono grado III con endotelio patológico (marcado pleomorfismo y polimegatismo). B: queratocono grado III con endotelio patológico y engrosamiento celular (pleomorfismo y polimegatismo).

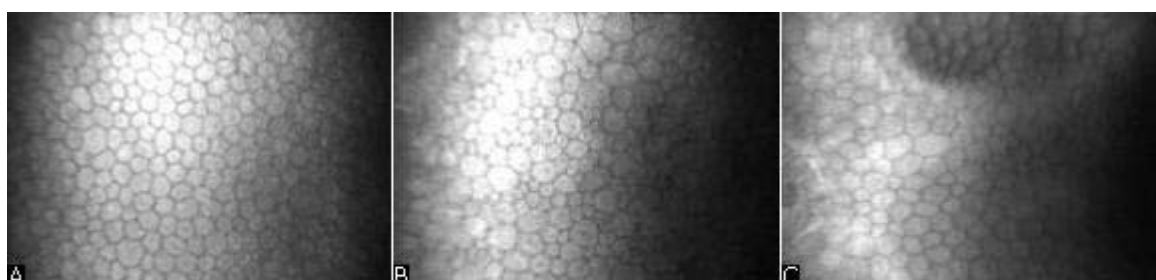


Fig. 2. Imágenes de microscopia confocal que evidencia diferencias de pleomorfismo y polimegatismo entre los grados de queratoconos. A: queratocono grado I, B: queratocono grado III, C: queratocono grado III con plegamiento endotelial.

DISCUSIÓN

La visualización del endotelio corneal es posible desde que *Vogt* en 1920 describiese la biomicroscopia especular.³⁶ Se trata de un aparato que es capaz de visualizar la luz reflejada desde una interfase óptica. Desde finales de la década de los años 60 (S XX) cuando *Maurice* introdujo el microscopio especular, que evalúa la cantidad y calidad de las células que conforman el endotelio corneal, se han desarrollado numerosas variantes con el fin de perfeccionar el estudio del endotelio.¹⁴ En un inicio la microscopia especular se realizaba con dispositivos que contactaban con la córnea, más recientemente se han diseñado equipos que no precisan del contacto corneal. Los modernos métodos de análisis de imagen asistidos por ordenador, permiten un estudio morfológico y morfométrico del endotelio más completo. Se añade al clásico criterio de densidad celular otros como el polimegatismo y el

pleomorfismo, que contribuyen a una mejor comprensión de las variaciones que acontecen a nivel del endotelio tanto fisiológico como patológico.^{14,15}

El queratocono clásicamente empieza en la pubertad y progresa hasta la tercera o cuarta década de la vida, donde se detiene. Puede sin embargo comenzar más tarde, progresar o detenerse a cualquier edad.^{3,4,29-31} Esto coincide con la investigación realizada por *Martínez de la Casa* y otros en diciembre de 2004 en donde se seleccionaron 295 ojos de pacientes entre 16 y 40 años y se encontró la enfermedad entre diversos grupos étnicos y con un inicio mayor en la pubertad.²⁸ *Byström* y otros en un estudio realizado en 2007 en 35 pacientes entre 18 a 35 años observaron que la edad de comienzo de la enfermedad desempeña un papel importante en la evolución del grado del queratocono y el daño del endotelio corneal.¹⁹

La edad de los pacientes estudiados osciló entre los 34 y 37 años sin ser estadísticamente significativa la diferencia para el promedio de edad en los diferentes grados de queratocono. El hecho de observar un discreto incremento de la edad promedio en los casos de queratocono grado III puede estar asociado a la posibilidad de un mayor tiempo de evolución y un diagnóstico tardío. En nuestro estudio sólo seleccionamos los pacientes vírgenes de tratamiento en el momento del diagnóstico y en el estadio en que se encontraban.

Según *Levinger* y otros, los cambios morfológicos que aparecen en las células endoteliales en el queratocono son muy similares a los que ocurren secundarios al proceso normal de envejecimiento y están relacionados precisamente con el polimegatismo y el pleomorfismo.¹⁴ Esto refuerza lo encontrado porque los pacientes incluidos tenían edades que oscilaban entre los 30 y 40 años, por lo que los cambios morfológicos encontrados son producidos por la enfermedad y no tienen relación alguna con el proceso de envejecimiento.

El queratocono ocurre en todos los grupos étnicos y con igual porcentaje entre hombres y mujeres.¹ *Luz* y otros en el 2006 incluyeron a 47 pacientes de los cuales 33 pertenecían al sexo femenino y observaron una alta frecuencia en el grado I y II.⁴⁷ Coincidimos con el alto porcentaje de mujeres con queratocono grado I y II, muchas procedentes de la consulta de cirugía refractiva para la corrección quirúrgica de su defecto. Esto pudiera estar relacionado con la supremacía del sexo femenino y su mayor demanda en busca de un resultado estético al solicitar cirugía láser para no usar la corrección óptica.^{17,28}

Kin y otros en un estudio del 2008, en el que incluyeron 35 pacientes, demostraron que la enfermedad era más frecuente en las mujeres. Por otra parte esto podría coincidir con el hecho de que los cambios hormonales constituyen uno de los factores (genéticos, bioquímicos, asociados a patologías oculares y sistémicas) que justifican la presencia del queratocono y que se relaciona con la mujer. El queratocono también progresa durante el embarazo.^{28,31}

Al correlacionar los hallazgos encontrados en los diferentes estadios de la enfermedad, apuntan hacia la existencia de una afectación multicapas que repercute directamente sobre el endotelio. Los daños son producidos por la desestructuración del estroma, dado por una activación de los queratocitos, que en su progresión, destruyen la Descemet por un mecanismo de apoptosis con la pérdida de células endoteliales. Estas disminuyen su número y aparecen cambios en su tamaño y forma; lo que coincide con lo postulado por *Erie* y otros.¹¹

A la vez *Bochert* y otros fundamentaron que el queratocono ejerce un daño irreversible en todas sus capas, particularmente en el endotelio, coincidiendo con lo

encontrado en nuestra investigación.²⁶ Igualmente *Binder* y otros en su estudio sobre el queratocono y la córnea ectásica posterior al LASIK corroboraron los hallazgos descritos hasta el momento por varios investigadores, donde el endotelio corneal es una de las capas comprometidas.¹⁷

El aspecto morfológico de las células del endotelio corneal normal se caracteriza por un mosaico de células equivalente a una densidad celular de 3012 cel/mm², un coeficiente de variación (desviación típica/media) de 0,26 y un 71 % de células hexagonales.^{31,32} La densidad celular disminuye 0,6 % anualmente, el coeficiente de variación aumenta y el porcentaje de células hexagonales disminuye. El estudio de *Martínez de la Casa* y otros, en 295 ojos confirmó que la densidad celular y la hexagonalidad disminuyen con la edad, mientras que el área celular media y el coeficiente de variación aumentan.^{28,29}

Las células del endotelio corneal funcionan para mantener la hidratación corneal formando una barrera frente al paso de agua y solutos hacia el estroma y bombeando solutos junto con agua (pasivamente) fuera del mismo. Este mecanismo de bombeo-barrera puede medirse según criterios clínicos.^{3,13}

En el queratocono específicamente la densidad celular del endotelio puede o no presentar evidentes alteraciones, esto depende del grado del queratocono. Sin embargo, notificamos algunas anomalías que incluyen estructuras oscuras intracelulares, pleomorfismo y alargamiento de las células cuyo eje longitudinal enfoca el cono. Los parámetros de densidad celular no tuvieron variación significativa entre los diferentes grados de queratocono, aunque hubo un ligero descenso en el grado III. Esto justifica que en la evolución del queratocono, la densidad celular endotelial es la menos afectada y coincide con otros estudios.^{32,33} *Weed* y otros en 43 ojos de pacientes con queratocono pone en evidencia que esta enfermedad no afecta la densidad celular endotelial.³³

Las células endoteliales aumentan su tamaño para poder suplir la disminución en su número. Este incremento se justifica porque el citosol de las células endoteliales está sostenido por un citoesqueleto constituido por tres redes organizadas de proteínas filamentosas compuestas por microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Estos facilitan además de soporte celular y posibilidad de movimiento intracelular, la plasticidad y adaptabilidad de la célula cuando tiene que ocupar lugares que previamente estaban tapizados por otras células que han desaparecido. El citoesqueleto permite esta ocupación mediante la distribución de fuerzas de tensión a través del citoplasma.^{32,33}

Una alteración que se produce en el endotelio corneal de ojos con queratocono es el desarrollo de las anomalías morfométricas (polimegatismo y pleomorfismo). Estas fueron observadas por vez primera en 1981, son visibles en fotografías endoteliales o en imágenes de video tomadas con el microscopio especular y se cuantifican midiendo las células individualmente en dichas imágenes.¹³

El polimegatismo es el aumento en la diversidad de tamaños de las células, medido por la elevación del coeficiente de variación (desviación típica/media) de la superficie celular. La palabra deriva de los radicales griegos *poli* (muchos) y *megethos* (tamaño). El pleomorfismo es el aumento de la diversidad en las formas de las células, medida por la disminución del porcentaje de células hexagonales (la siguiente disminución de la hexagonalidad de las células endoteliales).¹³

Tavakoli y otros compararon 75 pacientes con queratocono con 62 voluntarios sanos. El estudio confirmó que en los pacientes portadores de queratocono existían importantes alteraciones de la morfología celular endotelial.³⁴ *Uçakhan* y otros

utilizando la microscopia confocal en 48 ojos con queratocono, 44 tenían queratocono avanzado, evidenciaron que cuantitativamente y cualitativamente los cambios estructurales fueron observados en todas las capas de la córnea. Los cambios morfológicos más evidentes en el queratocono severo. Además manifiestan que esta prueba al no ser invasiva es muy útil para el estudio y seguimiento del queratocono y un mejor entendimiento de su fisiopatología.³⁵ El polimegatismo y el pleomorfismo fueron las alteraciones endoteliales que predominaron en los estudios revisados, al igual que en nuestra investigación.

Concluimos que la edad promedio de los pacientes estudiados no mostró diferencias significativas para los diferentes grados de queratocono. La mayor parte de los pacientes con queratocono pertenecían al sexo femenino y predominó el queratocono grado II. Desde el punto de vista morfológico los hallazgos se manifestaron en la forma y tamaño de las células endoteliales, se encontró células de mediano y gran tamaño con pérdida de su hexagonalidad en córneas con queratocono grado II y III. La densidad celular se mantuvo dentro del rango de valores normales para cualquier grado de queratocono.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*. 2002;89(6):531-90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7122038>
2. Soto E. Microscopia Confocal. México: Instituto de Ciencias. Universidad de Puebla; 1993:35-9. [citado 14 ago 2009] Disponible en: <http://alfa.facyt.uc.edu.ve/~eeorozco/pdfs/Lecturas/confocal.pdf>
3. Sheppard CJR, Shotton DM. Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microscopy Handbook*. New York: BIOS Scientific Publishers Ltd; 1997.
4. Kaufman SC, Musch DC, Belin MW, Cohen EJ, Meisler DM, Reinhart WJ, et al. Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2004;111(2):396-406. Disponible en: [http://www.ophsource.org/periodicals/opththa/article/S0161-6420\(03\)01637-3/abstract](http://www.ophsource.org/periodicals/opththa/article/S0161-6420(03)01637-3/abstract)
5. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Nau CB, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in keratoconus. A confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol*. 2002; 134(5):689-95. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429244>
6. Carlson KH, Bourne WM, McLaren JW, Brubaker RF. Variations in human corneal endothelial cell morphology and permeability to fluorescein with age. *Exp Eye Res*. 1988;47(1):27-41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3409985>
7. Baudouin C, Bourcier T, Dupas B, Labbé A, Sonigo B. Principes Techniques de la microscopie confocale. *Les Cahiers d'ophtalmologie*. 2007;110 [citado 12 feb 2009] Disponible en: http://www.contacto.fr/IMG/pdf/110-05-07-R_Pagot.pdf
8. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(3). Disponible en: <http://www.iovs.org/content/38/3/779.full.pdf+html>

9. Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo Confocal Microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. Clin Experiment Ophthalmol. 2007 [citado 27 ene 2009];35(1). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17300580>
10. Maeda N, Klyce SD, Smolek MK, Thompson HW. Automated keratoconus screening with corneal topography analysis. Invest Ophthalmology and Visual Science. 1994[citado 2 sep 2009];35(6). Disponible en: <http://www.iovs.org/content/35/6/2749.full.pdf+html>
11. Kuta GL. Refractive Surgery. San Francisco: American Academy of Ophthalmology; 2008.
12. Capote A, Jareño M, Gómez Z, Fernández K. Queratocono y otras ectasias corneales. En: Rio Torres M. Oftalmología. Criterios y Tendencias Actuales. La Habana: Ciencias Médicas; 2009. p. 59-77.
13. Castillo A, Benítez M, Gómez Z, Rodríguez S. microscopia Confocal. En: Rio Torres M. Oftalmología. Criterios y Tendencias Actuales. La Habana: Ciencias Médicas; 2009. p. 89-107.
14. Velarde Rodríguez JI. Queratocono subclínico en paciente portador de lentes de contacto, candidato a cirugía refractiva: 20 meses de seguimiento topográfico. Rev Esp Contactología. 2000[citado 12 jun 2009];10. Disponible en: <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloId=131801&donde=castellano&zfr=0>
15. Sánchez-Waisen F. Oftalmológica. C.H. Artículos de Oftalmología Torrecárdenas. Ectasias corneales. España: Almería; 2008. [citado 31 oct 2008] Disponible en: http://www.google.com/cu/url?sa=t&source=web&cd=1&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2Foftall-articulos.hazblog.com%2F&rct=j&q=Art%3%ADculosdeOftalmolog%3%ADaTorrec%3%A1rdenas.Ectasiascorneales&ei=2eqeTp6KI4rC0AHYq6SUCQ&usq=AFOjCNH6C_zoEiOfkcydTMstVaG0i-4Bmw&cad=rja
16. Somodi S, Hahnel C, Slowik C, Richter A, Weiss DG, Guthoff R. Confocal in vivo microcopy and confocal laser-scanning fluorescence microscopy in keratoconus. Ger J Ophthalmol. 1996;5(6). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9479549>
17. Klein SR, Epstein RJ, Randleman RD, Stulting RD. Corneal ectasia after laser in situ keratomileusis in patients without apparent preoperative risk factors. Cornea. 2006;25(4). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670474>
18. Caporossi A, Baiocchi S, Mazzotta C, Traversi C, Caporossi T. Parasurgical therapy for keratoconus by roboflavin-ultraviolet type A rays induced cross-linking of corneal collagen: Preliminary refractive results in an Italian study. J Cataract Refract Surg. 2006;32(5). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0886335006001416>
19. Byström B, Virtanen I, Rousselle P, Miyazaki K, Lindén C, Pedrosa Domellöf F. Laminins in normal, keratoconus, bullous keratopathy and scarred human corneas. Histochem Cell Biol. 2007[citado 4 may 2009];127(6). Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/65h2622135216736>

20. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Tran A, Carballo M, Saghizadeh M, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(3). Disponible en: <http://www.iovs.org/content/46/3/823.full.pdf+html>
21. Simo Mannion L, Tromans C, O'Donnell C. An evaluation of corneal nerve morphology and function in moderate keratoconus. *Contact Lens and Anterior Eye.* 2005;28(4). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367048405000834>
22. Rohrbach JM, Szurman P, El-Wardani M, Grüb M. About the frequency of excessive epithelial basement membrane thickening in keratoconus. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2006;223(11):889-93. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17131248>
23. Morishige N, Wahlert AJ, Kenney MC, Brown DJ, Kawamoto K, Chikama T, et al. Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(3). Disponible en: <http://www.iovs.org/content/48/3/1087.full.pdf+html>
24. Matthews FJ, 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(6):1125-34.
25. Luz A, Ursulio M, Castañeda D, Ambrósio RJ. Corneal thickness progression from the thinnest point to the limbus: study based on a normal and a keratoconus population to create reference values. *Arq Bras Oftalmol.* 2006;69(4):579-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119735>
26. Bühren J, Kühne C, Kohnen T. Defining subclinical keratoconus using corneal first-surface higher-order aberrations. *Am J Ophthalmol.* 2007;143(3):381-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002939406013808>
27. Jain AK, Sukhija J. Rose-K contact lens for keratoconus Indian. *J Ophthalmol.* 2007;55(2). Disponible en: <http://ijo.in/article.asp?issn=0301-4738;year=2007;volume=55;issue=2;page=121;epage=125;aulast=Jain>
28. Martínez de la Casa JM, Vico Ruiz E, Iradier Urrutia MT. Estudio del endotelio corneal en pacientes sin patología ocular. *Microcirugía Ocular.* 2004[citado 15 mar 2009];4. Disponible en: <http://www.oftalmo.com/secoir/secoir2004/rev04-4/04d-07.htm>
29. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee ChNJ. 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(7). Disponible en: <http://www.iovs.org/content/49/7/2964.full>
30. Unal M, Yücel I, Akar Y, Akkoyunlu G, Ustünel I. Recurrence of keratoconus in two corneal grafts after penetrating keratoplasty. *Cornea.* 2007;26(3):362-4. Disponible en: http://journals.lww.com/corneajrnl/Abstract/2007/04000/Recurrence_of_Keratoconus_in_Two_Corneal_Grafts.21.aspx

31. Ezra DG, Mehta JS, Allan BD. Late corneal hydrops after penetrating keratoplasty for keratoconus. *Cornea*. 2007;26(5):639-40. Disponible en: http://journals.lww.com/corneajrnl/Abstract/2007/06000/Late_Corneal_Hydrops_After_Penetrating.28.aspx
32. Abad JC, Rubinfeld RS, Del Valle M, Belin MW, Kurstin JM. Vertical D: a novel topographic pattern in some keratoconus suspects. *Ophthalmology*. 2007;114(5):1020-6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016164200601459X>
33. Weed KH, MacEwen CJ, Cox A, McGhee CN. Analysis of corneal microstructure in keratoconus utilising in vivo confocal microscopy. Ophthalmology Department, Ninewells Hospital and Medical School, Dundee, Scotland, UK: Butterworth-Heinemann; 2007.
34. Tavakoli M, Hossain P, Malik RA. Clinical applications of corneal confocal microscopy. *Cin Ophthalmol*. 2008.[citado 30 mar 2009];2(2): Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2693976/pdf/co-2-435.pdf>
35. Uçakhan OO, Kanpolat A, Yılmaz N, Ozkan M. In vivo confocal Microscopy findings in keratoconus. *Ophthalmology*. 2006;32(4):183-91. Disponible en: http://journals.lww.com/claojournal/Abstract/2006/07000/In_Vivo_Confocal_Microscopy_Findings_in.6.aspx
36. Vogt A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels: ein Beitrag zur Methodik der Spaltlampenmikroskopie. *Albrecht von Graefes Klin Exp Ophthalmol*. 1920; 101: 123-144. En: Martínez de la Casa JM, Matilda Rodero M, Iradier Urrutia MT, García Sánchez J. *Boletín de la Soc Oftalmol de Madrid* 2004;44. Disponible en: <http://www.oftalmo.com/som/revista-2004/m2004-14.htm>

Recibido: 23 de mayo de 2011.

Aprobado: 3 de julio de 2011.

Dra. *María del Carmen Benítez Merino*. Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". Ave. 76 No. 3104 entre 31 y 41 Marianao. La Habana, Cuba. Correo electrónico: mariac.benitez@infomed.sld.cu