

11234

Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva, Asociación para Evitar la Ceguera  
en México, IAP, Hospital "Luis Sánchez Bulnes", Universidad Nacional  
Autónoma de México, México D.F.,

## "Microscopía Confocal de la Córnea"

TESIS

Que para obtener el título de:

OFTALMÓLOGO

Presenta:

Dr. Manuel Ramírez Fernández.

0351435

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

México, D.F.

NOMBRE: RAMÍREZ FERNÁNDEZ  
MANUEL

Febrero 2005

FECHA: 06-KII-05  
FIRMA: [Firma]



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN

**Objetivo:** Analizar las estructuras celulares corneales mediante microscopía confocal en corneas aparentemente sanas. **Método:** Se realizó microscopía confocal (ConfoScan 2.0, Fortune Technologies Srl., Italy) para el análisis morfológico de las diferentes estructuras corneales, *in vivo* de manera no invasiva y en tiempo real a 10 córneas. **Resultados:** Se observó el epitelio superficial, las células basales epiteliales, el plexo nervioso subepitelial, el estroma y el endotelio corneal. **Conclusiones:** Hemos demostrado la utilidad del microscopio confocal para observar y analizar la población celular corneal, lo cual tiene un papel potencial en la valoración de los cambios dinámicos y estructurales de importancia en el diagnóstico y evaluación del paciente.

El microscopio confocal es un sistema mediante el cual se pueden observar tejidos de manera no-invasiva, lo que permite realizar estudios histológicos desde otro punto de vista en organismos vivos y en tiempo real.<sup>1-6</sup>

En 1955, Minsky desarrolló el primer microscopio confocal<sup>7</sup> el cual se basa en el principio de la conjunción de enfoque, en el que tanto la fuente de luz emisora como el objetivo del microscopio son conjugados y enfocados sobre una área pequeña de tejido, así tanto la fuente de luz como el lente del objetivo tienen el mismo punto de enfoque, lo que permite rechazar la luz que se encuentra fuera de foco disminuyéndola tanto en la parte superior como en la inferior del plano en estudio.<sup>4, 5, 7-12</sup> Su utilidad radica en su capacidad para hacer que las imágenes sean nítidas, de un alto contraste y de buena resolución.<sup>13</sup>

El propósito de este estudio es valorar y describir las diferentes estructuras corneales observables mediante microscopía confocal en corneas sanas.

## MATERIAL Y METODO

Se revisó la base de datos del Microscopio Confocal (ConfoScan 2.0, Fortune Technologies Srl., Italy) del Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva del Hospital para Evitar la Ceguera en México, Hospital "Dr. Luis Sánchez Bulnes" y se obtuvieron 10 estudios de corneas sanas de pacientes sin patología corneal ni ocular. Las secuencias de las imágenes de todo el espesor corneal central se digitalizaron (JPEG), se capturaron para su estudio morfológico y localizaron en todo el espesor corneal (Z-Scan). Mediante el programa NAVIS (Nidek Corporation, Japón) que automáticamente calcula la intensidad luminosa de las imágenes para crear una gráfica del espesor total de cada

secuencia (350 imágenes). El examen de microscopía confocal consistió en los siguientes pasos: se administró anestesia tópica con tetracaína al 0.5% (Ponti Ofteno, Laboratorios Sofia Guadalajara, México); previa asépsia de la parte anterior del lente frontal con alcohol al 96%, se colocó una gota de gel oftálmico de ácido poliacrílico al 2% (Viscotears, Cibavision Ltd / SA) en la punta del mismo para cubrir completamente su superficie, técnica conocida como “método DIP” (Distance Immersion Principle/Principio de Inmersión a Distancia); posteriormente, se colocó al paciente delante del microscopio confocal que comenzó a mover el lente frontal hacia adelante hasta que el gel hizo contacto con la superficie corneal alineándolo con la pupila, para proceder a profundizar el foco hasta observar el endotelio corneal y centrar la imagen con éste, de lo contrario la calidad de las imágenes capturadas se verían afectadas. En cuanto la imagen se encontró centrada se realizó el rastreo de todo el espesor corneal, obteniendo una secuencia de imágenes que consta de 2 rastreos consecutivos de la profundidad total del espesor corneal, siendo un rastreo equivalente a la obtención de imágenes de endotelio a epitelio a endotelio, es decir, de lo posterior a lo anterior y de nuevo a lo posterior, para permitir el desplazamiento en el eje “z” del espesor corneal central. Posteriormente se estudiaron las diferentes estructuras ubicadas a diferentes profundidades del espesor corneal.

Todas las imágenes fueron valoradas por dos observadores. Se analizaron las características morfológicas y de reflectividad en cada una de las imágenes así como los problemas técnicos relacionados a la toma de estudios así como la captura de imágenes con el microscopio confocal.

## RESULTADOS

Mediante la microscopía confocal de córnea, partiendo de la superficie corneal, se observaron las diferentes estructuras dependiendo de la profundidad del enfoque. El epitelio superficial, las células basales epiteliales, el plexo nervioso subepitelial, el estroma corneal y el endotelio corneal.

Nos permitió observar las células epiteliales superficiales las cuales no guardaron un patrón morfológico constante debido a sus bordes irregulares y no se apreciaron espacios intercelulares; el citoplasma se valoró con sus límites celulares bien definidos y, los núcleos celulares se observaron de forma redonda e hiperreflécticos sobre el citoplasma. Hacia la periferia se encontraron áreas más oscuras debido a la curvatura normal que mantiene la córnea (Fig. 1). Las células basales epiteliales se observaron como imágenes de poca reflectividad, de forma hexagonal sobre un fondo oscuro, sin espacios intercelulares y, de bordes difusos (Fig. 2). Inmediatamente posterior al epitelio corneal se observó el plexo nervioso subepitelial a manera de líneas hiperreflécticas sobre un fondo oscuro guardando una disposición predominantemente vertical o moderadamente oblicua; a este nivel no se observó ningún otro tipo de estructura (Fig. 3). La siguiente estructura observable correspondió al estroma, donde se apreciaron abundantes núcleos de queratocitos con reflectividad alta sobre un fondo oscuro, presentándose en forma de huso en una disposición vertical, horizontal, oblicua e incluso transversal; el citoplasma, los límites celulares y la matriz extracelular no fueron visibles. Aparentemente, hay una mayor densidad de queratocitos en el estroma anterior que en el posterior, también es notable la diferencia en el tamaño de los queratocitos, los cuales se observaron más elongados y grandes en la parte posterior en comparación con los pequeños y compactos

de la anterior (Fig. 4). Otra estructura que se logró observar aunque de forma menos frecuente fueron los nervios estromales, mostrándose como imágenes longitudinales de mayor extensión que los queratocitos y moderadamente más reflectivos que estos. La última estructura corneal observable es el endotelio donde se apreciaron claramente las células endoteliales de morfología hexagonal, de alta reflectividad y con los núcleos celulares no muy bien definidos debido a que su reflectividad es menor a la del citoplasma (Fig. 5).

## DISCUSIÓN

Las imágenes obtenidas en el presente estudio demuestran la capacidad del microscopio confocal para realizar estudios histológicos logrando observar las células corneales *in vivo* de manera no invasiva y en tiempo real.

Los principales problemas técnicos que enfrentamos fueron el movimiento ocular del paciente, la incapacidad del mismo para mantener el ojo abierto durante el estudio debido a la intolerancia a la luz emitida por el microscopio y el movimiento causado por la respiración del paciente.

En la estructura más superficial que corresponde al epitelio corneal, la capa de células aladas localizadas a la mitad de la profundidad del epitelio corneal, no son perceptibles fácilmente debido a la intensidad de luz reflejada. En contraste, las células basales epiteliales se observan fácilmente y se ha descrito que están en estrecho contacto con la capa de Bowman mediante una membrana basal.<sup>14</sup> Se sabe que entre las células basales se encuentran nervios no mielinizados con axones únicos o múltiples.<sup>14, 15</sup>

de la anterior (Fig. 4). Otra estructura que se logró observar aunque de forma menos frecuente fueron los nervios estromales, mostrándose como imágenes longitudinales de mayor extensión que los queratocitos y moderadamente más reflectivos que estos. La última estructura corneal observable es el endotelio donde se apreciaron claramente las células endoteliales de morfología hexagonal, de alta reflectividad y con los núcleos celulares no muy bien definidos debido a que su reflectividad es menor a la del citoplasma (Fig. 5).

## DISCUSIÓN

Las imágenes obtenidas en el presente estudio demuestran la capacidad del microscopio confocal para realizar estudios histológicos logrando observar las células corneales *in vivo* de manera no invasiva y en tiempo real.

Los principales problemas técnicos que enfrentamos fueron el movimiento ocular del paciente, la incapacidad del mismo para mantener el ojo abierto durante el estudio debido a la intolerancia a la luz emitida por el microscopio y el movimiento causado por la respiración del paciente.

En la estructura más superficial que corresponde al epitelio corneal, la capa de células aladas localizadas a la mitad de la profundidad del epitelio corneal, no son perceptibles fácilmente debido a la intensidad de luz reflejada. En contraste, las células basales epiteliales se observan fácilmente y se ha descrito que están en estrecho contacto con la capa de Bowman mediante una membrana basal.<sup>14</sup> Se sabe que entre las células basales se encuentran nervios no mielinizados con axones únicos o múltiples.<sup>14, 15</sup>

Aunque se describen linfocitos y macrófagos ocasionales en la capa de células basales y de células aladas mediante microscopía de luz o microscopía electrónica, no se observó ninguna otra estructura con el microscopio confocal. Inmediatamente posterior al epitelio se logró observar el plexo nervioso subepitelial con una disposición predominantemente vertical o moderadamente oblicua. Reportes previos sugieren que dicho plexo nervioso se encuentra en la capa de Bowman, atravesando ésta para terminar en la capa subepitelial.<sup>15-18</sup> Más profundo al plexo nervioso subepitelial se observó el estroma corneal, en donde los queratocitos son las estructuras celulares más abundantes. En condiciones normales sólo es posible observar los núcleos de éstos mediante microscopía confocal.<sup>2, 14, 16, 19, 20</sup> Otros reportes sugieren que los queratocitos ocupan el 5 % del volumen estromal.<sup>14, 21</sup> En 1967, Otori encontró que ocupaban del 2 al 3 % del estroma corneal en conejos<sup>14</sup> y un año más tarde Maurice y Riley confirmaron en el hombre un 2.4 %.<sup>14</sup> Observamos abundantes núcleos de queratocitos, descritos por Auran como objetos hiperreflécticos de forma irregular distintos de los nervios estromales.<sup>22</sup> Los núcleos de los queratocitos se presentaron en forma de huso en una disposición vertical, horizontal, oblicua e incluso transversal.<sup>14</sup> Observamos que pareciera haber una mayor densidad de queratocitos en el estroma anterior que en el posterior. Esto se ha comprobado por varios autores con diferentes métodos. Moller-Pederson,<sup>23-25</sup> midió el contenido de DNA de los nucleos de los queratocitos, el cual se relaciona al peso tisular en seco (DNA estromal/contenido en masa (DNAs) con una unidad (U) definida como 1µg de DNA por miligramo de peso tisular en seco. Los datos del DNAs fueron convertidos a queratocitos por milimetro cúbico usando el volumen estromal/radio volumen de 3.1mm<sup>3</sup>/mg de peso tisular en seco y asumiendo que el estroma contiene sólo

queratocitos diploides con un contenido de DNA como el de los fibroblastos en el humano: 8.5 pg por célula y encontró una densidad menor de 30% en la región subendotelial comparado con el estroma subepitelial. Asimismo, Petroll et.al<sup>12</sup> realizó una cuantificación directa utilizando un programa de computación el cual captura y graba la posición de cada uno de los núcleos lo que hace posible realizar un conteo manual preciso. Encontró una disminución en la densidad de los queratocitos de forma gradual de lo anterior a lo posterior con un ligero aumento antes de la membrana de Descemet. Patel<sup>26</sup> hizo el conteo de manera automática con un programa que procesa las imágenes contrastando los núcleos mediante una escala de grises y calculando la superficie de pixeles por mm<sup>3</sup> de cada sección. Sus hallazgos son los mismos que los de Petroll et.al. Se ha demostrado que existe una organización en tres dimensiones de los queratocitos<sup>27</sup> y de subpoblaciones con diferencias morfológicas en el estroma anterior y posterior, aunque su origen permanece desconocido.<sup>12</sup> Una probable explicación para la existencia de estas subpoblaciones es la existencia de diferencias en la concentración de oxígeno y en la actividad metabólica.<sup>19</sup> Las diferencias morfológicas y de tamaño entre los queratocitos del estroma anterior y los del estroma posterior fueron observadas en el presente estudio. En algunos reportes se ha descrito a los queratocitos anteriores de forma elíptica y a los posteriores de forma más elongada,<sup>12, 19</sup> en otros se hace énfasis en las diferencias de tamaño siendo los anteriores más pequeños que los posteriores.<sup>19</sup> Anteriormente se pensaba que eran células sin actividad pero se ha demostrado histológicamente que los queratocitos son células activas.<sup>21, 28, 29</sup> Los queratocitos anteriores presentan mayor reflectividad, se cree que éste fenómeno responde al hecho de que presentan una mayor densidad de mitocondrias, por lo tanto, un mayor metabolismo,

ya que éstas disminuyen progresivamente de lo anterior a lo posterior.<sup>19, 28</sup> La diferencia en la densidad de las mitocondrias se ha relacionado con la distancia a la que se encuentran de la superficie y con respecto al espesor corneal.<sup>19, 28, 30</sup> El significado de esta diferencia no está claro, pero se sugiere que existen diferencias en cuanto al tipo de queratocitos del estroma corneal,<sup>27, 28</sup> lo que nos hace suponer que de existir diferencias entre estos, cada uno producirá sustancias distintas. Estudios bioquímicos han demostrado diferencias en la cantidad y tipo de proteoglicanos en el estroma anterior y el posterior,<sup>28</sup> diferencias de queratan sulfato siendo mayor en el estroma posterior.<sup>19, 28</sup> mientras que la distribución de condroitin sulfato es mayor en el anterior.<sup>19</sup> Por otro lado, se ha demostrado una pérdida de queratocitos relacionada con la edad.<sup>24</sup>

En el estroma corneal también son observados nervios estromales los cuales se aprecian gruesos y bien delimitados, en ocasiones se detectaron bifurcaciones de estos. Existen estudios que presentan un seguimiento de su curso y de sus ramificaciones hacia el plexo nervioso subepitelial,<sup>15, 17, 31</sup> en donde el nervio se dirige a la parte anterior y, al llegar a la interfase entre el estroma y la capa de Bowman se forma una red nerviosa ya mencionada como el plexo nervioso subepitelial.<sup>15, 17, 22, 30, 32, 33</sup>

El endotelio es una monocapa de células cuboideas que forman un mosaico hexagonal con los bordes celulares bien definidos.<sup>16, 34, 35</sup> En estudios histológicos se describen interdigitaciones intercelulares así como algunos desmosomas.<sup>34, 35</sup> Una característica del endotelio corneal a diferencia del epitelio es su falta de capacidad para la renovación celular, lo que origina una pérdida de la población celular relacionada con la edad. La densidad celular endotelial entre adultos y jóvenes es diferente, se han descrito cambios en la morfología que va de un patrón hexagonal a uno más polimórfico con células más

grandes conforme aumenta la edad.<sup>24</sup> Existen reportes que señalan que no hay diferencias en los hallazgos endoteliales comparando el ojo derecho y el izquierdo, ni cambios relacionados con el género.<sup>36</sup>

Hemos demostrado la utilidad del microscopio confocal de rastreo por hendidura para observar y analizar la población celular corneal, lo cual facilita la valoración de los cambios dinámicos y estructurales de importancia en el diagnóstico y evaluación del paciente. Reportes previos confirman el valor diagnóstico del microscopio confocal<sup>2, 37-43</sup> aunque su uso clínico aún se encuentra en evolución. La mayor parte de estos estudios sólo se han dedicado al estudio de queratitis infecciosas o procesos de cicatrización corneal. El microscopio confocal nos permite realizar un seguimiento de la evolución del paciente evaluando los procesos de cicatrización o regeneración neural posterior a procedimientos quirúrgicos como es el caso de la queratectomía refractiva<sup>44-47</sup> o trasplante corneal.<sup>48, 49</sup>

## REFERENCIAS

1. Jester, J.V., et al., In vivo, real-time confocal imaging. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 1991. **18**(1): p. 50-60.
2. Cavanagh, H.D., et al., Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology*, 1993. **100**(10): p. 1444-54.
3. Andrews, P.M., et al., Tandem Scanning Confocal Microscopy (TSCM) of Normal and IsquemicLiving Kidneys. *The American Journal of Anatomy*, 1991. **191**: p. 95-102.
4. Petroll, W.M., H.D. Cavanagh and J.V. Jester, Three-dimensional imaging of corneal cells using in vivo confocal microscopy. *Journal of Microscopy*, 1993. **170**(Pt 3): p. 213-9.
5. Rigby, P.J. and R.G. Goldie, Confocal microscopy in biomedical research. *croat med j*, 1999. **40**(3): p. 346-52.
6. Petroll, W.M., J.V. Jester and H.D. Cavanagh, In vivo confocal imaging: general principles and applications. *Scanning*, 1994. **16**(3): p. 131-49.
7. Minsky, M., Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning Journal*, 1988. **10**: p. 128-138.
8. Petroll, W.M., J.V. Jester and H.D. Cavanagh, In vivo confocal imaging. *International Review of Experimental Pathology*, 1996. **36**: p. 93-129.
9. Sheppard CJR, Axial resolution of confocal fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 1989. **154**: p. 237-241.
10. Wilson T and S. C., *Theory and practice of scanning optical microscopy*. 1984.

11. Wilson T, Confocal light microscopy. *Annals of NY Academy of science*, 1986. 483: p. 416-427.
12. Petroll, W.M., et al., Quantitative assessment of anteroposterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. *Cornea*, 1995. 14(1): p. 3-9.
13. Dailey, M., et al., Concepts in imaging and microscopy. Exploring biological structure and function with confocal microscopy. *Biol Bull*, 1999. 197(2): p. 115-22.
14. Hogan, M.J., J.E. Weddel and Alvarado Jorge A, *Histology of the Human Eye*, in *Histology of the Human Eye*, W.B.S. Company, Editor. 1971, W.B. Saunders Company: Philadelphia, Pa. p. 55-111.
15. Muller, L.J., L. Pels and G.F. Vrensen, Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1996. 37(4): p. 476-88.
16. Mustonen, R.K., et al., Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea*, 1998. 17(5): p. 485-92.
17. Muller, L.J., et al., Architecture of human corneal nerves. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1997. 38(5): p. 985-94.
18. Auran, J.D., et al., In vivo scanning slit confocal microscopy of *Acanthamoeba* keratitis. A case report. *Cornea*, 1994. 13(2): p. 183-5.
19. Hahnel, C., et al., The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*, 2000. 19(2): p. 185-93.

20. Petroll, W.M., H.D. Cavanagh and J.V. Jester, *Confocal Microscopy*, . p. 335-350.
21. Jester, J.V., et al., Corneal keratocytes: in situ and in vitro organization of cytoskeletal contractile proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994. **35**(2): p. 730-43.
22. Auran, J.D., et al., Scanning slit confocal microscopic observation of cell morphology and movement within the normal human anterior cornea. *Ophthalmology*, 1995. **102**(1): p. 33-41.
23. Moller-Pedersen, T. and N. Ehlers, A three-dimensional study of the human corneal keratocyte density. *Current Eye Research*, 1995. **14**(6): p. 459-64.
24. Moller-Pedersen, T., A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. *Cornea*, 1997. **16**(3): p. 333-8.
25. Moller Pedersen, T., et al., Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy: a 1- year confocal microscopic study. *Ophthalmology*, 2000. **107**(7): p. 1235-45.
26. Patel, S.V., et al., Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. **40**(2): p. 320-6.
27. Poole, C.A., N.H. Brookes and G.M. Clover, Keratocyte networks visualised in the living cornea using vital dyes. *Journal of Cell Science*, 1993. **106 ( Pt 2)**: p. 685-91.
28. Muller, L.J., L. Pels and G.F. Vrensen, Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1995. **36**(13): p. 2557-67.

29. Snyder, M.C., J.P. Bergmanson and M.J. Doughty, Keratocytes: no more the quiet cells. *Journal of the American Optometric Association*, 1998. **69**(3): p. 180-7.
30. Klyce, S. and R. Beurman, *The Cornea: Structure and Function of the Cornea*. New York: Churchill - Living-stone, 1988: p. 3-54.
31. Richter, A., et al., In vivo imaging of corneal innervation in the human using confocal microscopy. *Ophthalmologie*, 1997. **94**(2): p. 141-6.
32. Duke-Elder, S. and K. Wybar, *The anatomy of the Visual System. System of Ophthalmology*, 1961. **2**: p. 92-131.
33. Tervo, T., et al., Histochemical evidence of limited reinnervation of human corneal grafts. *Acta Ophthalmol*, 1985. **63**: p. 207-14.
34. Waring, G.O., B.M. Bourne and H.F. Edelhauser, The corneal endothelium normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*, 1982. **89**: p. 531-590.
35. Sherrard, E.S. and Y.L. Ng, The other side of the corneal endothelium. *Cornea*, 1990. **9**(1): p. 48-54.
36. Gierek-Lapinska, A., et al., The examination of healthy human corneas with confocal microscope. *Klinika Oczna*, 1998. **100**(5): p. 275-80.
37. Cavanagh, H.D. and J.P. McCulley, In vivo confocal microscopy and *Acanthamoeba keratitis* *Am J Ophthalmol*, 1996. **121**(2): p. 207-8.
38. Chew, S.J., et al., Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy. *Clao J*, 1992. **18**(3): p. 197-201.
39. Kaufman, S.C., et al., Confocal microscopy of corneal penetration by tarantula hairs. *Scanning*, 1994. **16**(5): p. 312-5.

40. Kaufman, S.C., R.W. Beuerman and D. Goldberg, A new form of primary, localized, corneal amyloidosis: a case report with confocal microscopy. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol*, 1995. **18**(1-4): p. 1-4.
41. Sutphin, J.E., et al., Evaluation of infectious crystalline keratitis with confocal microscopy in a case series. *Cornea*, 1997. **16**(1): p. 21-6.
42. Winchester, K., W.D. Mathers and J.E. Sutphin, Diagnosis of *Aspergillus* keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea*, 1997. **16**(1): p. 27-31.
43. Winchester, K., et al., Diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis in vivo with confocal microscopy *Cornea*, 1995. **14**(1): p. 10-7.
44. Slowik, C., et al., Assessment of corneal alterations following laser in situ keratomileusis by confocal slit scanning microscopy. *German Journal of Ophthalmology*, 1996. **5**(6): p. 526-31.
45. Heinz, P., et al., In vivo observation of corneal nerve regeneration after photorefractive keratectomy with a confocal videomicroscope. *German Journal of Ophthalmology*, 1996. **5**(6): p. 373-7.
46. Kauffmann, T., et al., Corneal reinnervation after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis: an in vivo study with a confocal videomicroscope. *German Journal of Ophthalmology*, 1996. **5**(6): p. 508-12.
47. Linna, T. and T. Tervo, Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy. *Current Eye Research*, 1997. **16**(7): p. 640-9.

48. Mohay, J., T.O. Wood and B.J. McLaughlin, Long-term evaluation of corneal endothelial cell transplantation. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1997. **95**: p. 131-48; discussion 149-51.
49. Aboalchamat, B., et al., Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Experimental Eye Research*, 1999. **69**(5): p. 547-53.

## FIGURAS



Figura 1. Epitelio corneal superficial, nótese los bordes celulares bien definidos y la hiperreflectividad de los núcleos (340  $\mu\text{m}$  x 255  $\mu\text{m}$ ).

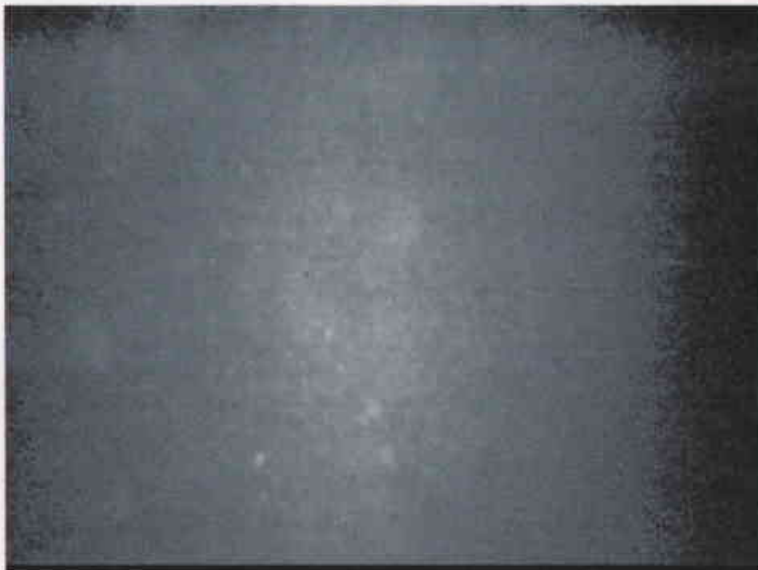


Figura 2. Células basales epiteliales, nótese que son muy tenues y con bordes poco definidos (340  $\mu\text{m}$  x 255  $\mu\text{m}$ ).

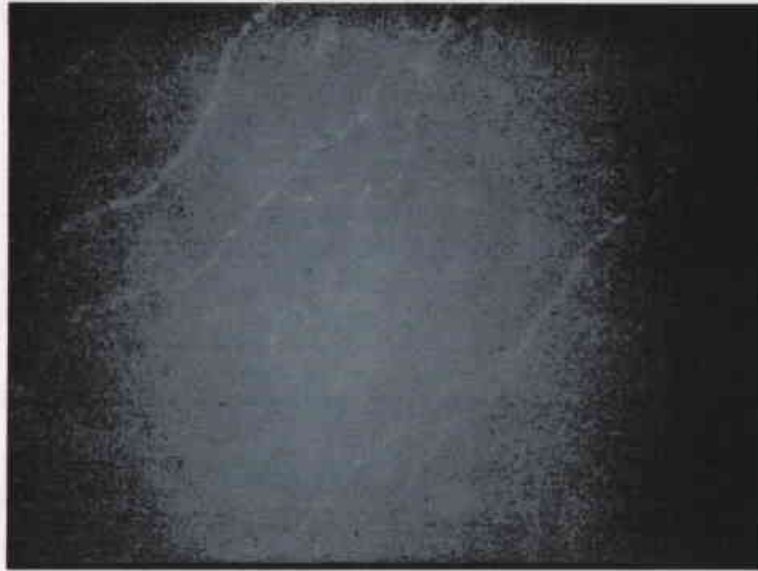


Figura 3. Plexo nervioso subepitelial, nótese la disposición oblicua y la hiperreflectividad que presentan (340  $\mu\text{m}$  x 255  $\mu\text{m}$ ).

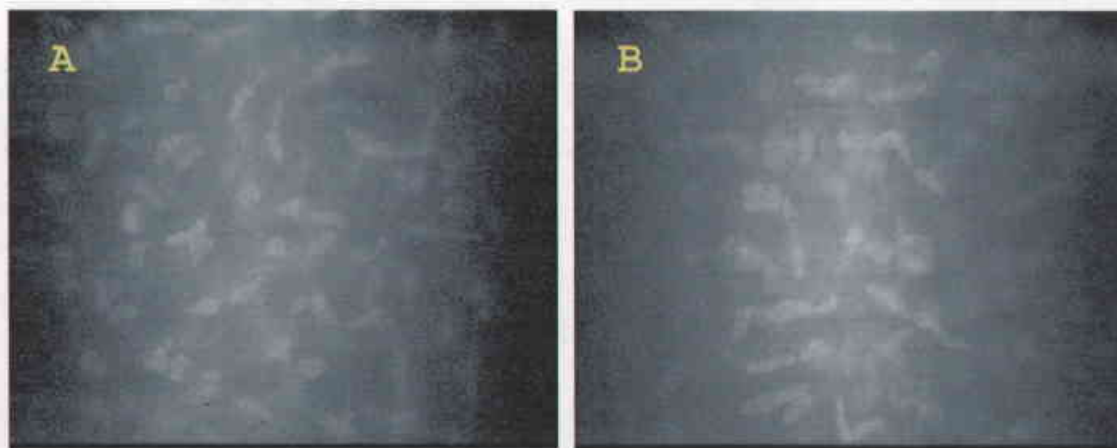
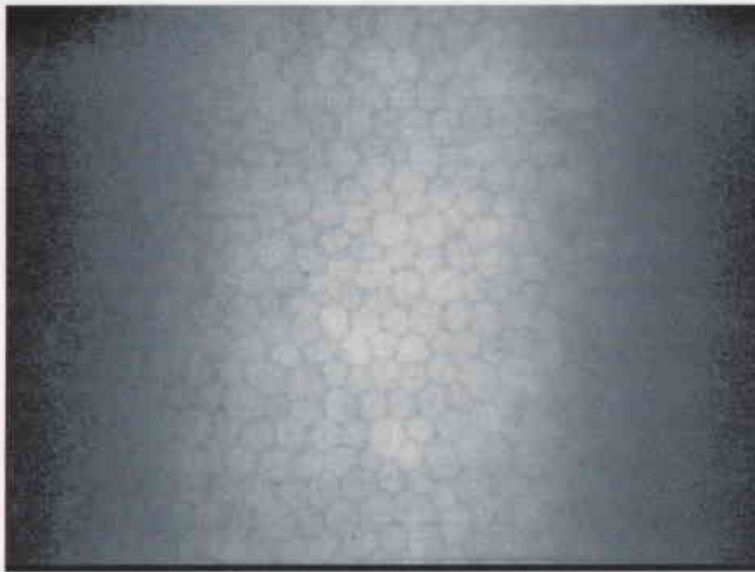


Figura 4. Estroma corneal, las células estromales (queratocitos) son más pequeñas y se encuentran en mayor cantidad en el estroma anterior (A) (340  $\mu\text{m}$  x 255  $\mu\text{m}$ ) que en estroma posterior (B) (340  $\mu\text{m}$  x 255  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 5. Endotelio corneal, se denota el ya descrito patrón en mosaico hexagonal de la células endoteliales (340  $\mu\text{m}$  x 255  $\mu\text{m}$ ).**