

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA

**Estudio de los cambios morfológicos del epitelio
corneal en un modelo animal de ojo seco**

GEMMA JULIO MORÁN

3. RESULTADOS

3.1. Resultados morfológicos y datos morfométricos

En este apartado se presentan los resultados morfológicos y morfométricos obtenidos según los criterios descriptivos anteriormente indicados (ver capítulo 2, Material y Método). Dichos resultados aparecen agrupados en base a los diferentes tiempos de apertura palpebral (TAP) establecidos (control, TAP<1h, TAP1-2h, TAP2-3h, TAP>3h)

3.1.1. Córneas control

El epitelio anterior de las nueve corneas control observadas presentan un estrato escamoso ininterrumpido con muy pocas células exfoliadas (ver tabla 3.1).

| Cornea control | Nº células exfoliadas o en proceso de exfoliación | Imagen |
|----------------|---|---|
| C0i | 1 | C0i1a |
| C01i | 1 | C01i8 |
| C01d | 1 | C01d9 |
| C03i | 6 | C03i4 (2 células)* C03i12 (4 células)* |
| C04d | 1 | C04d12 |

Tabla 3.1 Distribución de las células exfoliadas en las córneas control. *Células en proceso de exfoliación.

Teniendo en cuenta el número de imágenes a 500X observadas (un total de 43) y que en cada una hay, de promedio, 100 células, se ha calculado que la exfoliación en estas córneas es de, aproximadamente, un 0.2%.

Las células exfoliadas se caracterizan por aparecer sobre el resto de células epiteliales, despegadas del tejido en cuestión. En las imágenes de microscopía electrónica de barrido, la ausencia de unión de una célula con sus células adyacentes se puede observar porque los bordes celulares aparecen más claros y con finos sombreados negros, signos inequívocos de desprendimiento

(ver figura 3.1). El aspecto general de las células exfoliadas es granuloso, de tono claro o gris claro con puntos blancos, vértices redondeados y aspecto retraído. Cabe señalar que la textura de la membrana de estas células puede parecer lisa a 500x pero a medida que los aumentos suben, se hace cada vez más granulosa y a 5000x muestra finas arrugas o irregularidades en forma de poros. En general, no presentan microproyecciones.

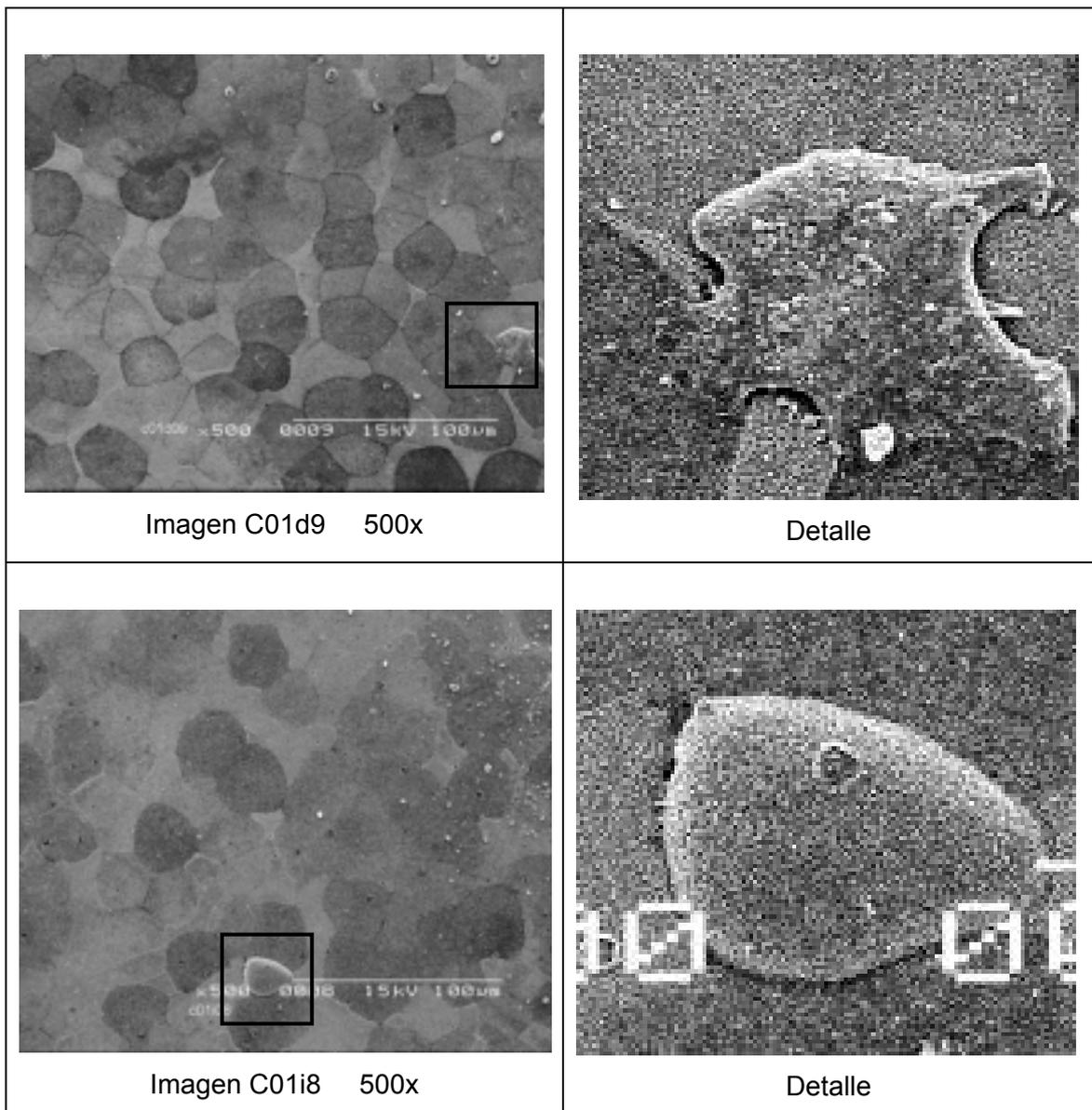


Figura 3.1. Células exfoliadas en las córneas control.

En los epitelios control estudiados existen, también, células en proceso de exfoliación (ver figura 3.2). Estas células han perdido sólo parte de sus

uniones y presentan ciertas diferencias respecto a las totalmente descamadas, descritas anteriormente. Las células en proceso de descamación son más oscuras, de textura no tan granulosa, más poligonales, con los bordes parcialmente doblados y algunas de ellas muestran un núcleo manifiesto.

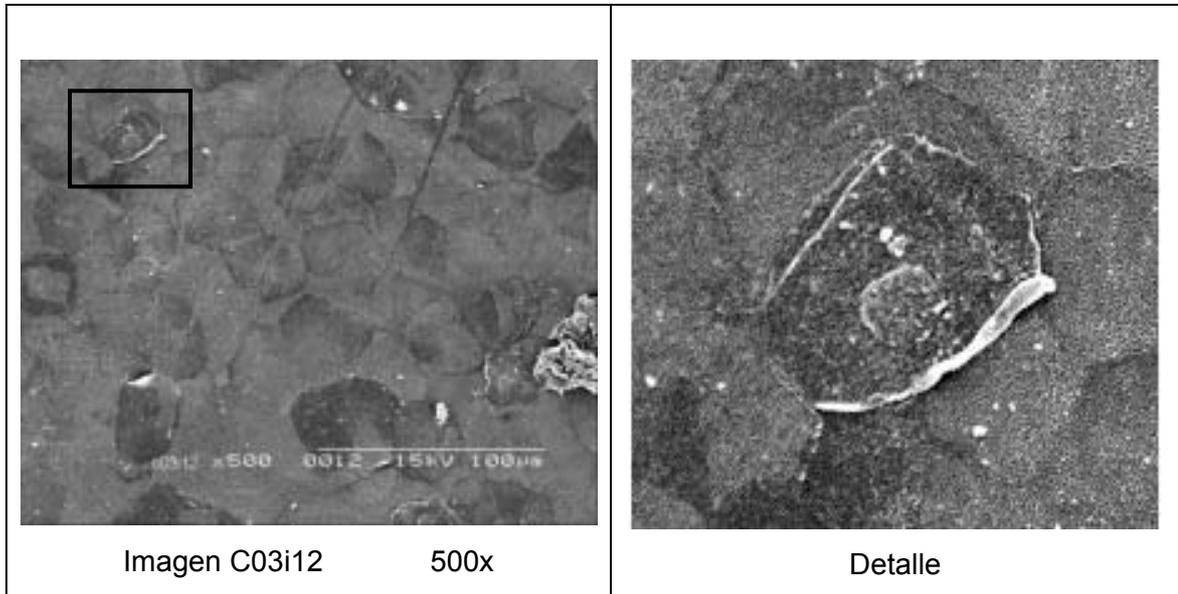


Figura 3.2. Zona de la córnea C03i con células en proceso de exfoliación.

Su aspecto no es la única diferencia a resaltar. Cuando se presentan células en proceso de descamación no lo hacen de manera aislada, como es el caso de las totalmente exfoliadas, sino que aparecen formando grupos celulares (ver tabla 3.1 en página 93).

En cuanto al aspecto general del mosaico epitelial, las córneas control muestran, en ocasiones, unos contornos celulares bien delimitados y un elevado contraste entre los tonos de gris intercelulares. Este marcado contraste se refleja en la presencia de alguna célula clara, tres o cuatro tonos diferentes de células intermedias y algunas células oscuras. (Ver figura 3.3) Además, en estos casos las células presentan, individualmente, una superficie con un tono bastante uniforme, dando a la zona apical del epitelio un aspecto más liso y brillante.

Por el contrario, en otras imágenes, las células escamosas tienen contornos celulares de más difícil observación y los tonos de gris entre células son

relativamente parecidos. Sin embargo, en este último tipo de imágenes a 500x, el tono individual de cada célula es menos uniforme. Este hecho hace que el epitelio tenga una textura más granulosa.

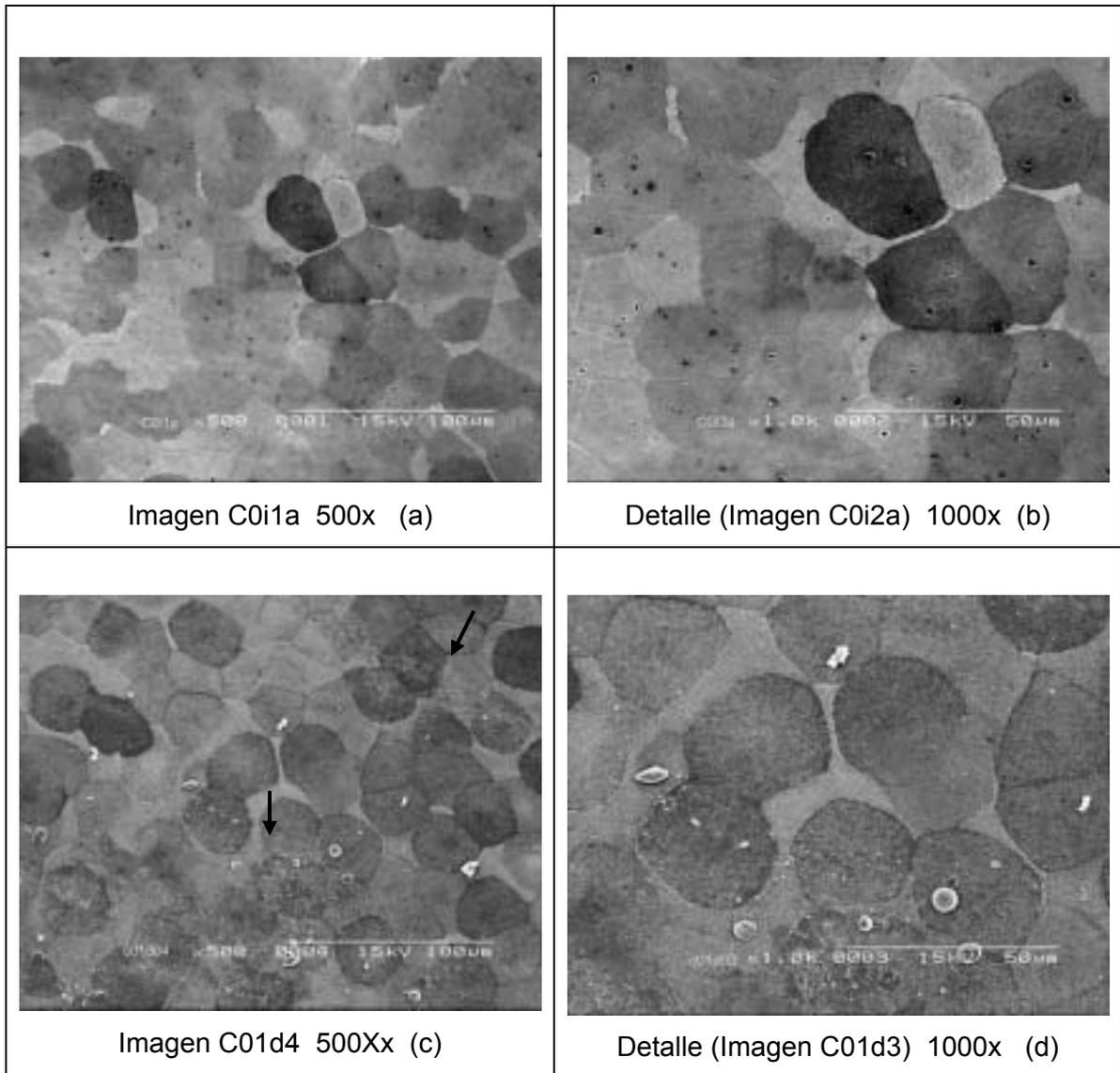


Figura 3.3. Diferentes zonas del mosaico epitelial. En la primera fila (a) y (b) imagen de un mosaico contrastado. En la segunda (c) y (d), mosaico de tonos más uniformes. Obsérvese la película blanca que cubre parcialmente las imágenes de la fila inferior (flechas).

A veces, se observa una fina película semitransparente que cubre el área, total o parcialmente, ocasionando una imagen más difusa del epitelio en cuestión (Ver de nuevo figura 3.3 y figura 3.4)

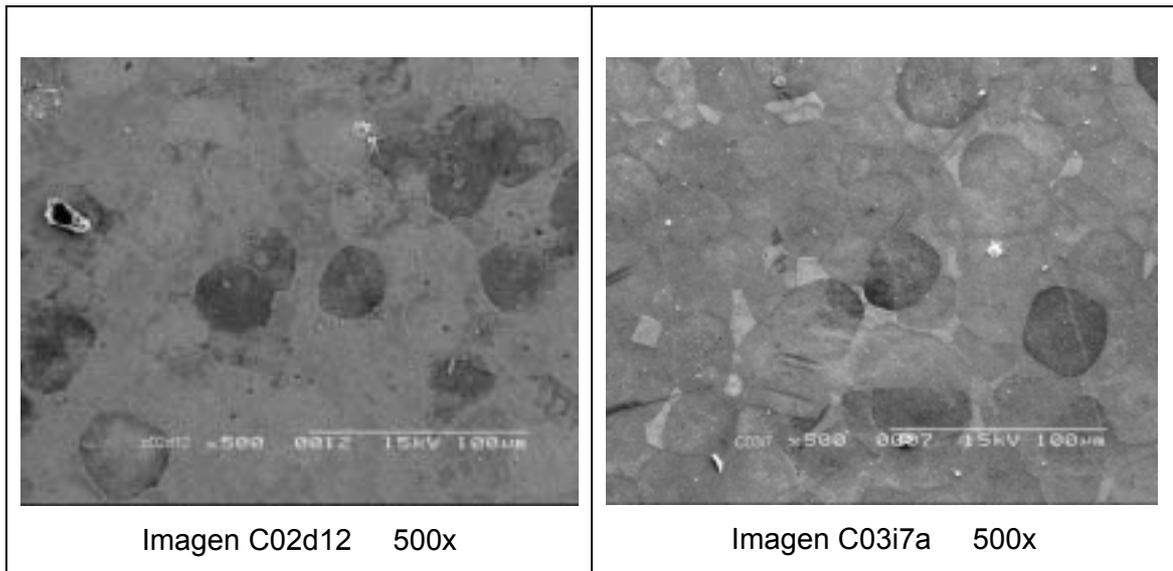


Figura 3.4. Imágenes a 500X con una película blanca recubriendo casi totalmente el campo de visión. Obsérvese la diferente densidad de la película.

Las diferencias de nitidez y contraste de las imágenes a 500x, anteriormente citadas, no aparecen al observar las células escamosas a 5000x. Con estos altos aumentos, las células superficiales aparecen siempre bien definidas y con tonos celulares claramente diferentes. (Ver figura 3.5 y siguientes) Las células oscuras a 500x parecen presentar una menor densidad de microproyecciones a 5000x que las células claras. (Ver, de nuevo, figura 3.5 y siguientes.) En definitiva, según estas imágenes, el tono celular a 500x podría ser más claro cuando mayor es la densidad de las microproyecciones.

Por otro lado, existen algunas zonas que muestran ciertas peculiaridades que las separan del patrón general descrito. Por ejemplo, este sería el caso de la zona a la que corresponden las imágenes de la figura 3.6. En ellas aparece una especie de mancha negra que cubre parte del epitelio. Dicha mancha posee una uniformidad y dimensiones que hacen descartar la posibilidad de que se trate de una célula o células descamadas.

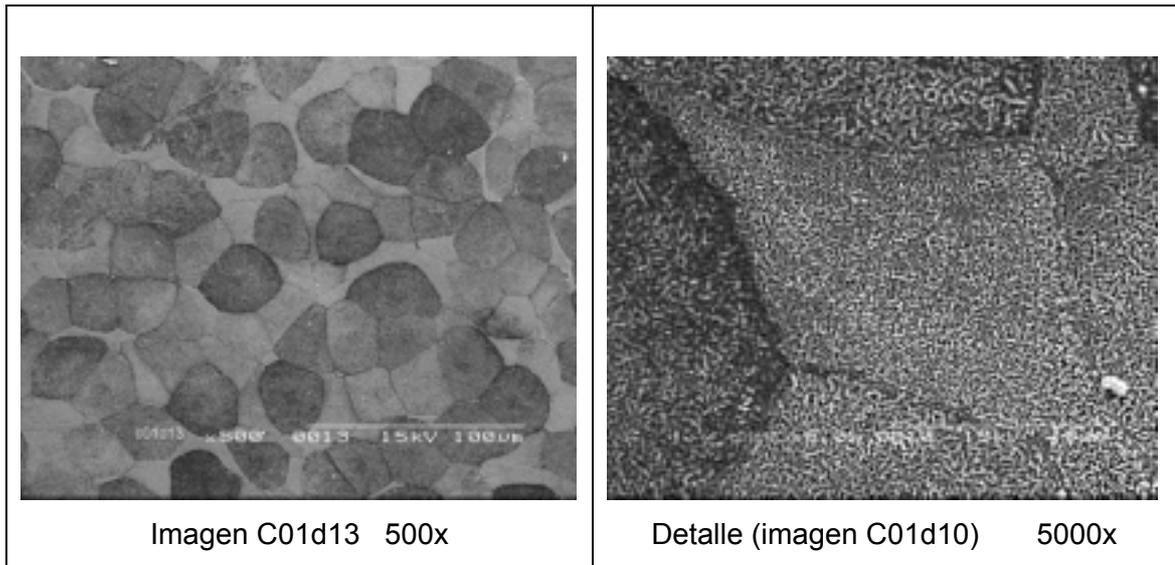


Figura 3.5. Mosaico de células epiteliales a 500 y 5000x.

Observando a más aumentos (5000x) la mancha negra parece situarse por encima del epitelio, cubriendo un grupo de células cuya densidad de microproyecciones se presenta normal. Esta hebra oscura de material poroso, que podría tratarse de restos de mucina, impide la caracterización de las microproyecciones, por lo que las imágenes se han desestimado.

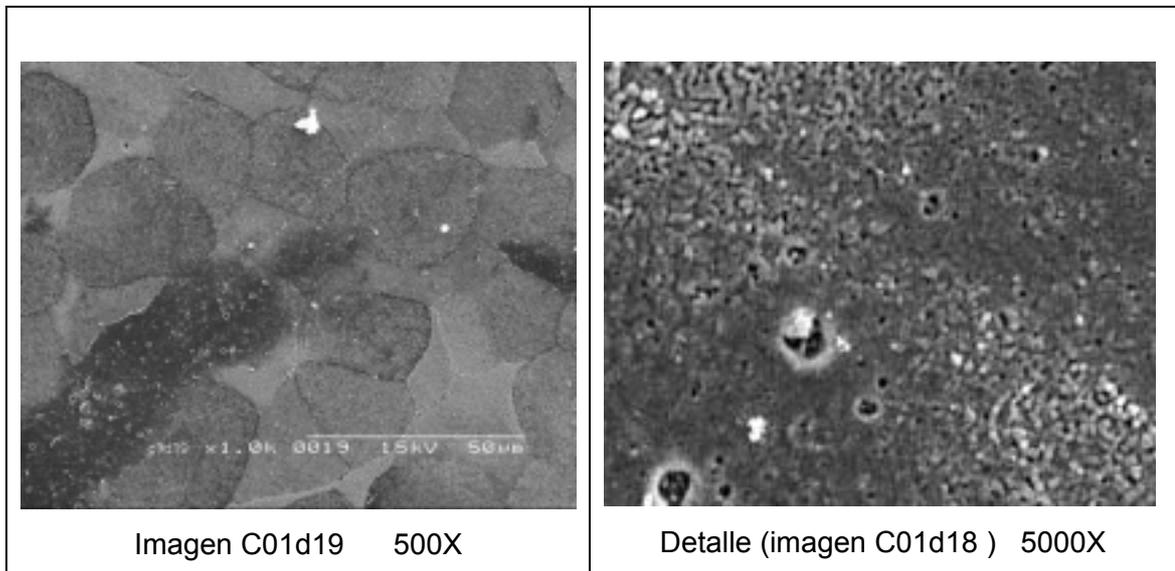


Figura 3.6. Posibles restos de mucina cubriendo una zona del epitelio corneal.

Por último, en cuatro de las cinco zonas de la córnea 3i se observa lo que parece ser la superposición de varias capas celulares. (Ver figura 3.7) Este aspecto del epitelio, por su carácter uniforme en toda la zona, no parece haber sido causado por la manipulación. Si se observa con detalle, algunas de las células han perdido parte de sus uniones y presentan ciertas características de retraimiento, como es: aristas curvadas hacia el interior celular y vértices exageradamente marcados hacia el exterior.

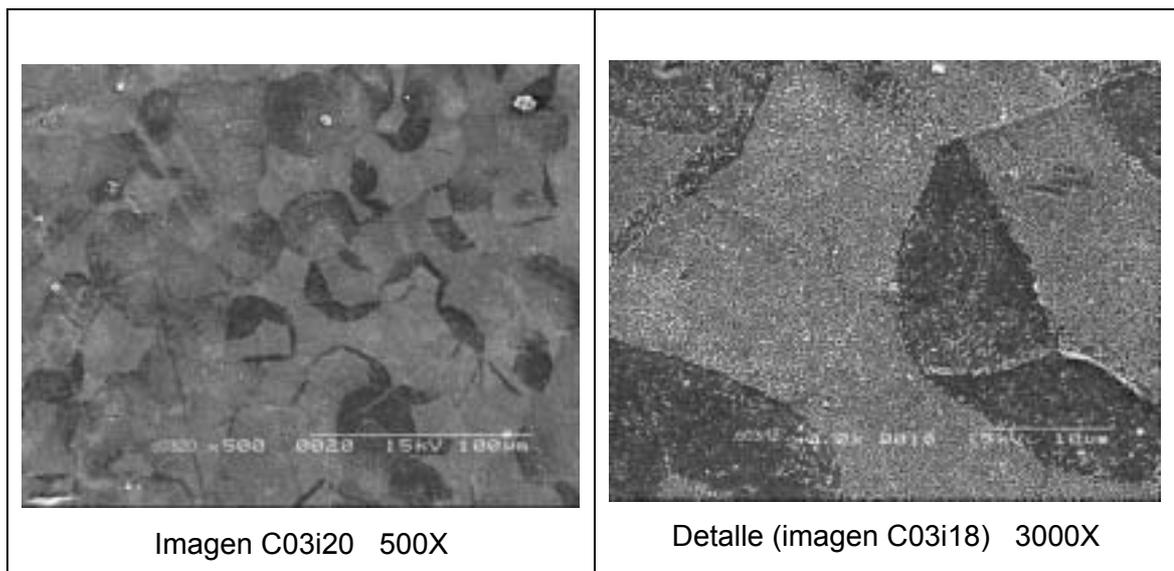


Figura 3.7. Epitelio control en proceso de descamación.

La casi total ausencia de bordes celulares levantados (más claros que el resto de la superficie celular) parece indicar que se trata de zonas en proceso de descamación incipiente

Por lo que respecta a las células incluidas en el análisis morfométrico, todas poseen una membrana celular lisa e intacta y núcleos no manifiestos.

Los tonos celulares de dichas células son, en su inmensa mayoría intermedios (94.87%). Sólo se ha observado un 4,72% de células oscuras y un 0.42% de claras.

Las uniones entre células poseen, mayoritariamente, la categoría 1 (70,38%) ó 0.8 (27,89%), mientras que una pequeña proporción (1,71%) presentan

uniones que se han catalogado como 0.5. Cabe añadir que no se han observado uniones de la categoría más baja (0,2 ó 0).

En cuanto al tamaño de las células, existe bastante dispersión aunque se puede observar cierta tendencia hacia los tamaños pequeños (42,06% de células pequeñas, 34,33% de células medianas y 23,60% de células grandes).

Otro parámetro analizado es la forma de las células. Contrariamente al tamaño, y como ya han descrito otros autores (Rigal 1993) (Doughty 1990b) se observan, principalmente, células de aspecto poligonal (72,53%) frente a un 18,84% de células intermedias y un pequeño porcentaje (8,58%) de células circulares.

Los cráteres epiteliales o *holes* aparecen, sólo, en un 38,19% de las células estudiadas. Agrupando los datos de este parámetro por córneas se puede observar que la mayoría de ellas presentan más o igual número de células “sin” que “con *holes*” excepto la córnea C04i y la córnea C0i, donde las células con *holes* son las más frecuentes.

El contorno del cráter suele sobresalir hacia afuera y se observa liso y blanco. La superficie circunscrita en el interior de un cráter puede ser más clara, más oscura o de igual tono que la célula. De tal manera que, son más claros aquellos cráteres que poseen en su interior microproyecciones erectas y más oscuros cuando sólo muestran membrana celular. (Ver figura 3.8)

Antes de finalizar la descripción de las córneas control es indispensable detallar las características básicas de las microproyecciones. Acorde con la alta densidad observada, la inmensa mayoría (89,26%) de las células presentan, a 5000x, una superficie ocupada por microproyecciones que se ha catalogado como 1 (45,49%) ó 0,8 (43,77%). El resto presentan una catalogación menor, en proporciones de 8,15% para la categoría 0.5 y 2,57% para las células con microproyecciones de categoría 0,2. Entre todas las células control analizadas no se ha observado ninguna sin microproyecciones (categoría 0) (Las células descamadas o en proceso de descamación no se han incluido en este análisis)

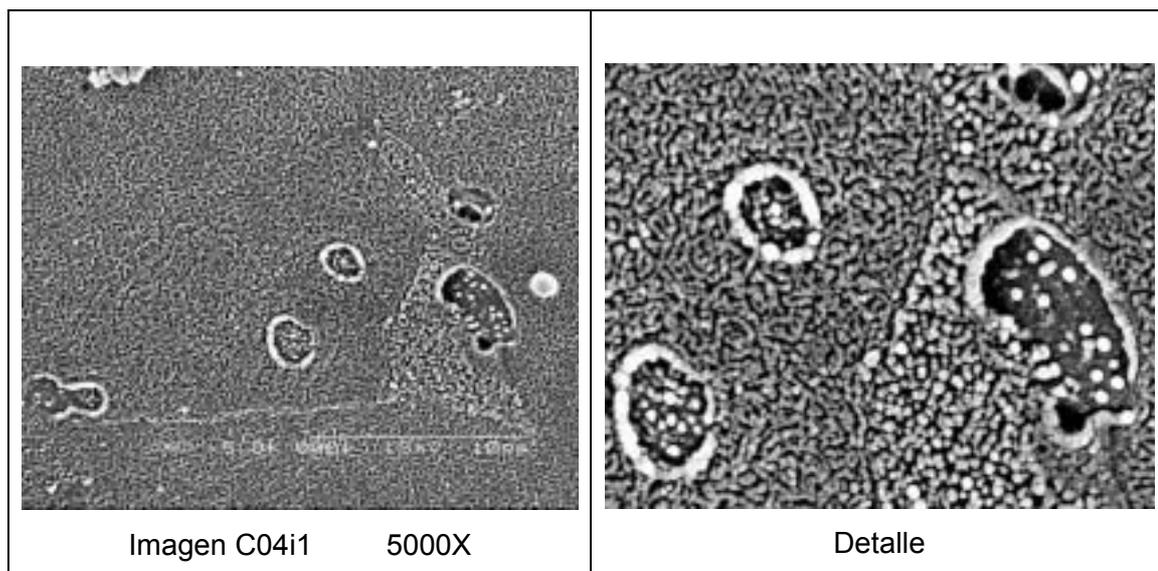


Figura 3.8. Microproyecciones y *holes*

Sin embargo, se ha podido constatar que, en algunas células, la densidad de estas estructuras disminuye cuanto más cerca se está del borde celular (ver figura 3.9), sobre todo si se trata de células con mediana o poca superficie ocupada por las microproyecciones (categorías 0,5 y 0,2).

A pesar de este último dato las células epiteliales de las córneas control presentan, en general, una elevada uniformidad en la densidad y forma de sus microproyecciones. Se ha observado, también, que las células oscuras (a 500x) suelen ser las más grandes y presentan una menor densidad de microproyecciones (a 5000x) mientras que las células más claras, frecuentemente, son las más pequeñas y muestran una elevada densidad de estas proyecciones de la membrana celular. (Ver, por ejemplo, figura 3.5 y figura 3.9) En definitiva, según estas imágenes, podría existir una relación directa entre el tono celular a 500x y la densidad de microproyecciones, de modo que, a mayor densidad más claro es el tono celular.

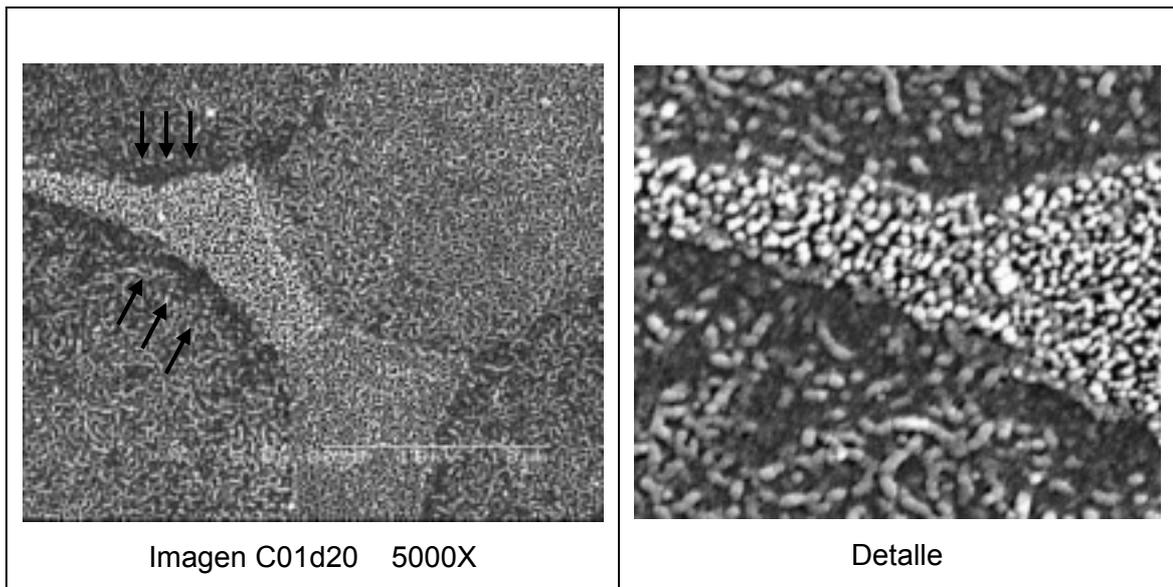


Figura 3.9. Distribución uniforme de las microproyecciones. Obsérvese como algunos bordes celulares (señalados con flechas) presentan una disminución de la densidad de estas prominencias de la membrana.

Cabe resaltar que estas estructuras de membrana poseen, a veces, tamaños diferentes de una célula a otra y muestran, también formas diferentes. Por regla general, cuando la densidad de las microproyecciones es alta se presentan erectas o vermiformes mientras que en densidades bajas aparecen con formas irregulares. (Ver, de nuevo la figura 3.9) Las estructuras vermiformes parecen ser, a juzgar por algunas imágenes, el resultado de la unión de varios microvilli erectos formando una fila. (Ver figura 3.10)

El tono gris que poseen estas estructuras puede ser uniforme o presentar cambios dentro de la misma superficie celular. En general se asume que las microproyecciones erectas muestran tonos blancos (ver, de nuevo, figura 3.10) porque sobresalen más respecto de la membrana celular. (El tono de gris, en las imágenes de microscopía electrónica será más claro en aquellas estructuras situadas en planos superiores.)

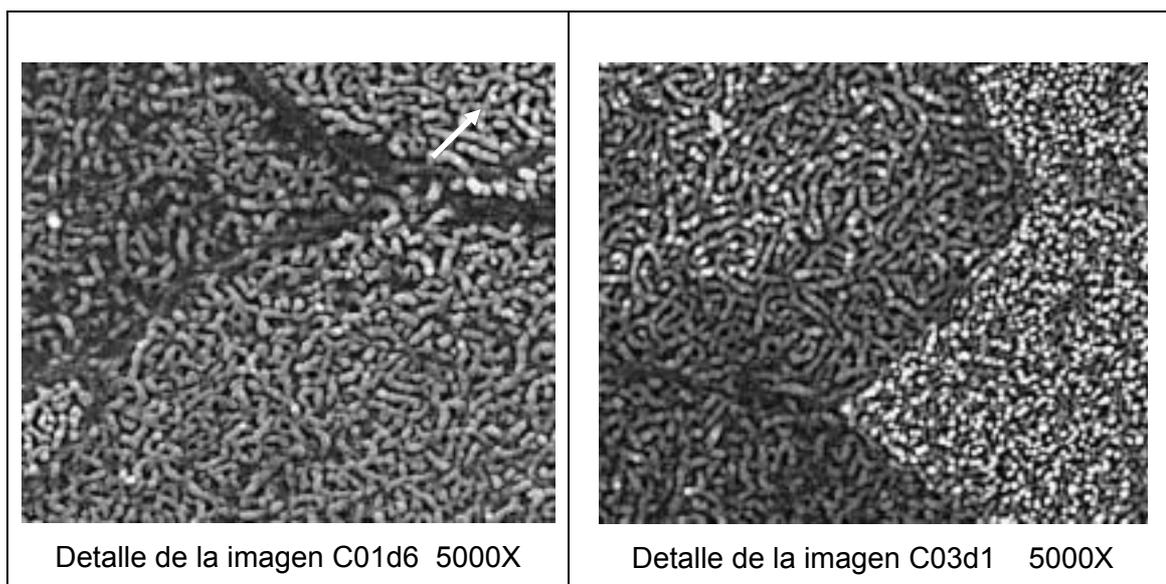


Figura 3.10. Diferencias en el tono de las microproyecciones. En la imagen izquierda aparecen microproyecciones vermiformes de tono muy uniforme (la flecha blanca indica una de estas prominencias vermiformes que parece estar formada por varios ápices de microvilli unidos) En la imagen derecha algunas de estas prominencias están erectas (puntos blancos) y otras se muestran vermiformes (de color gris)

A continuación, ha modo de resumen, se presenta una tabla con la distribución de los datos morfométricos de las células analizadas en las córneas control.

Distribución de los datos morfométricos en las células de las córneas control
(Todos los datos de esta tabla aparecen en tantos por ciento)

| <i>TONO</i> | | <i>UNIONES</i> | | <i>TAMAÑO</i> | | <i>FORMA</i> | | <i>HOLES</i> | | <i>SOM</i> | |
|-------------|-------|----------------|-------|---------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|------------|-------|
| claras | 0,42 | cat. 1 | 70,38 | peq. | 42,06 | polig. | 72,53 | con | 38,19 | cat. 1 | 45,50 |
| inter | 94,87 | cat. 0,8 | 27,89 | med. | 34,33 | inter. | 18,84 | sin | 61,81 | cat. 0,8 | 43,77 |
| osc | 4,72 | cat. 0,5 | 1,71 | gran. | 23,60 | circ. | 8,58 | | | cat. 0,5 | 8,15 |
| | | cat. 0,2 | 0 | | | | | | | cat. 0,2 | 2,57 |
| | | cat. 0 | 0 | | | | | | | cat. 0 | 0 |

Tabla 3.2. Resumen de la distribución de los datos morfométricos de las células control. SOM: Superficie ocupada por microproyecciones.

3.1.2. Córneas con TAP menor de una hora

Las seis córneas con tiempo de apertura menor de una hora muestran, al igual que las córneas control, una superficie epitelial continua. La proporción de células exfoliadas, en este caso, es del 0.5%, aproximadamente. (17 células en 30 imágenes a 500x). Estas células aparecen aisladas y presentan características variables. Pueden presentarse con o sin núcleo aparente y muestran gran variabilidad en cuanto al aspecto superficial (ver figura 3.11).

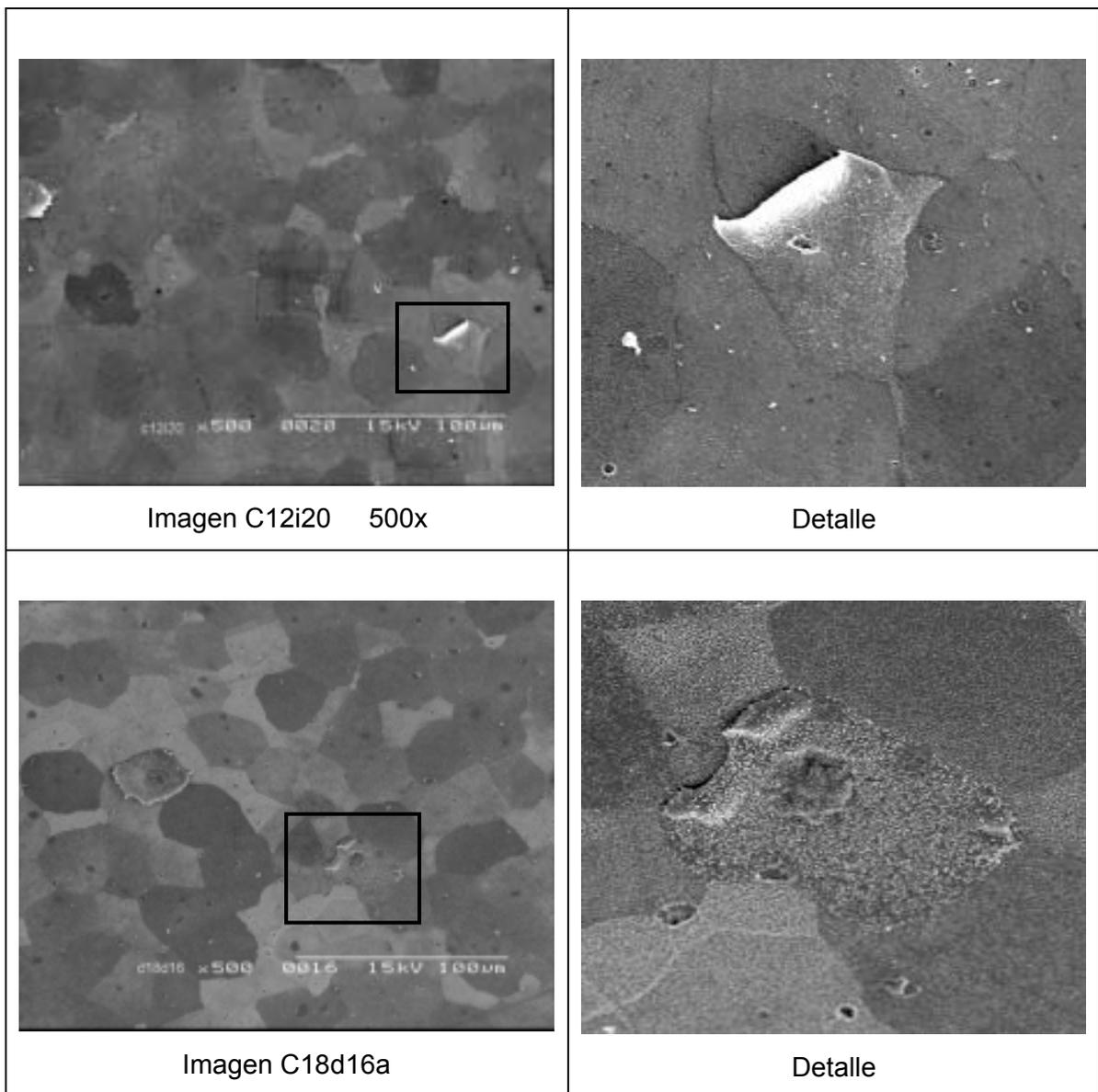


Figura 3.11. Células exfoliadas en los epitelios sometidos a un tiempo de apertura menor a una hora.

De este modo, algunas células exfoliadas presentan a 500x una superficie relativamente lisa y brillante mientras que en otras la superficie es rugosa y mate. La forma de estas células puede ser redondeada o poligonal y el color suele ser gris con los bordes celulares más o menos claros, según si están más doblados o no.

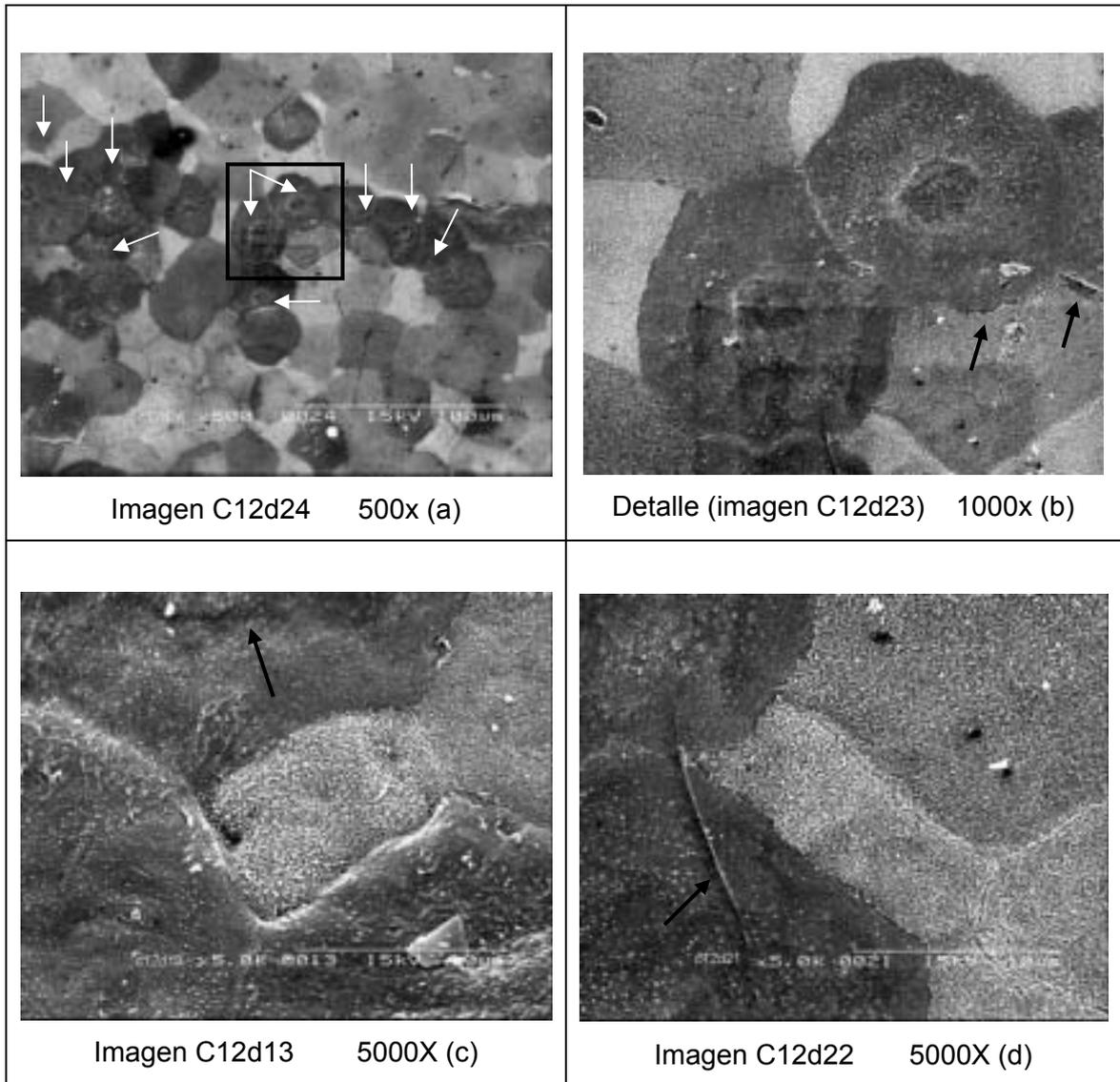


Figura 3.12. Grupo de células en proceso de descamación. En (a) dichas células aparecen señaladas por las flechas blancas. En la imagen (b) obsérvese como los núcleos son manifiestos y las grietas en las uniones intercelulares (flechas negras). En (c) y (d) nótese la falta de microproyecciones y las arrugas y ondulaciones (flechas negras) de la membrana de este tipo de células.

Por otro lado, las células en proceso de exfoliación aparecen en grupos y son oscuras con núcleos prominentes o escavados. (Ver figura 3.12 en página anterior). La textura de la membrana de estas células parcialmente despegadas del epitelio corneal es, en general, más granulosa que la observada en el resto de células del mosaico celular y, frecuentemente, presentan arrugas y ondulaciones en su superficie.

Otro aspecto importante que se observa en las células en proceso de descamación es que poseen una densidad muy baja de microproyecciones (categoría 0 ó 0,2) y sus uniones intercelulares son, también, de categorías bajas. O sea, son uniones que presentan grietas o, incluso, se han separado totalmente en parte del perímetro celular (ver, de nuevo, figura 3.12).

Además, las células adyacentes o inmediatamente inferiores a las células en proceso de descamación tienen un aspecto normal y una densidad de microproyecciones alta.

Cabe señalar que no todas las células oscuras están en proceso de descamación. (Ver figura 3.13)

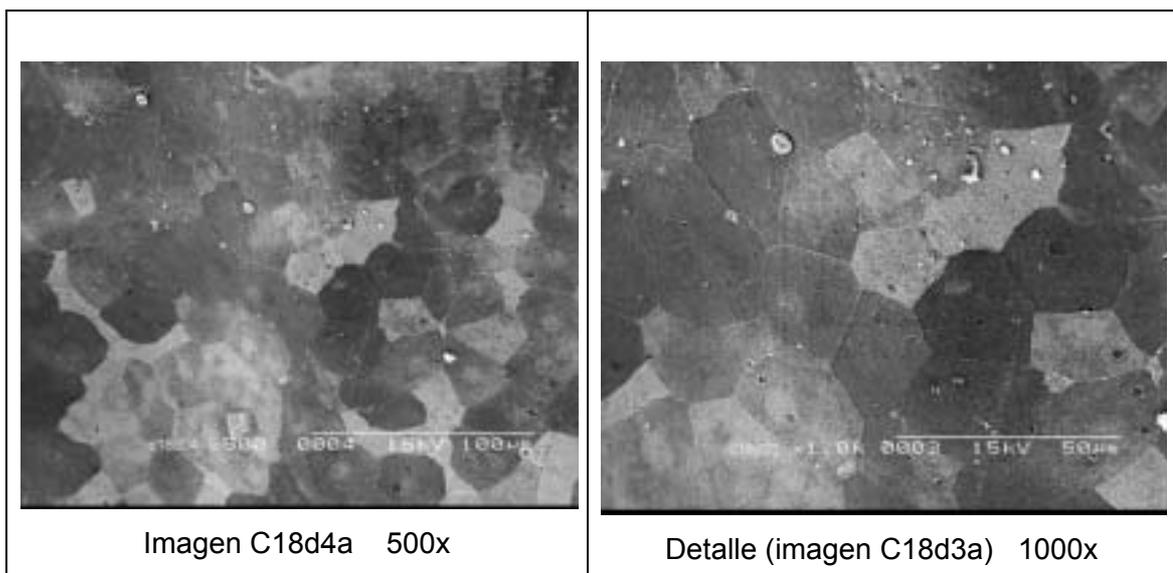


Figura 3.13. Mosaico epitelial con células oscuras sin signos de descamación.

En el epitelio aparecen células de tono oscuro con microproyecciones cuyas uniones son perfectas, sin núcleo aparente ni arrugas en la membrana con lo que nada hace suponer que se trate de células en proceso de exfoliación.

Llegados a este punto, es necesario resumir los rasgos celulares característicos de cada etapa del proceso de exfoliación, que han sido comentados anteriormente, para poder establecer un criterio discriminatorio definitivo (ver tabla 3.3).

Debe señalarse que estos rasgos, se han observado repetidamente en las células de todos los tiempos de apertura palpebral y además de utilizarse para discriminar el estadio celular dentro de la descamación servirán, más adelante, para diferenciar estas células de otras que presentan descamaciones patológicas (como se verá en los siguientes tiempos de apertura)

Por lo que respecta al aspecto del mosaico celular, este se muestra, en general, equivalente al observado en las córneas control. También en este caso, el estrato escamoso puede presentarse más o menos contrastado, con contornos celulares visibles o algo difíciles de diferenciar y textura, a veces, lisa y, a veces, más granulosa pero, siempre, con membranas celulares intactas.

Los núcleos celulares no se distinguen excepto en las células que están en proceso de descamación. En estos casos el núcleo aparece como una protuberancia o hundido pero siempre con aspecto rugoso y bien delimitado. (En este TAP sólo se han observado células en proceso de descamación en las córneas C12d y C22i)

De nuevo, al igual que las córneas control, algunas de las imágenes presentan restos de una película oscura que se sitúa adherida encima de las células. Estos restos no son restos celulares pues serían blancos y aparecerían sobre el epitelio, no adheridos a él. Parece más plausible la opción, apuntada ya en la descripción de las córneas control, que considera a estas manchas como restos de mucina. (Ver figura 3.14 en página 109)

| Tipo de célula | Células sin signos de exfoliación | Células en proceso de exfoliación | Células exfoliadas |
|--|--|--|---|
| Característica determinante | Uniones celulares intactas | Uniones celulares parcialmente incompletas | Falta de uniones celulares entre células adyacentes |
| Presentación | Individual integrando el mosaico epitelial | En grupo integrando el mosaico epitelial | Aisladas sobre el mosaico |
| Núcleo | No manifiesto | Manifiesto | Manifiesto/ no manifiesto |
| Textura de la membrana | No es visible debido a las microproyecciones | Granulosa a 5000x | Granulosa a 5000x |
| Tono de gris | Variable | Oscuro | Gris intermedio o claro |
| Densidad de las microproyecciones | Variable | Baja | No tienen microproyecciones |
| Aspecto de las células adyacentes o inferiores | Normal | Normal | Normal |

Tabla 3.3. Características de las células según su etapa en el proceso de exfoliación fisiológica

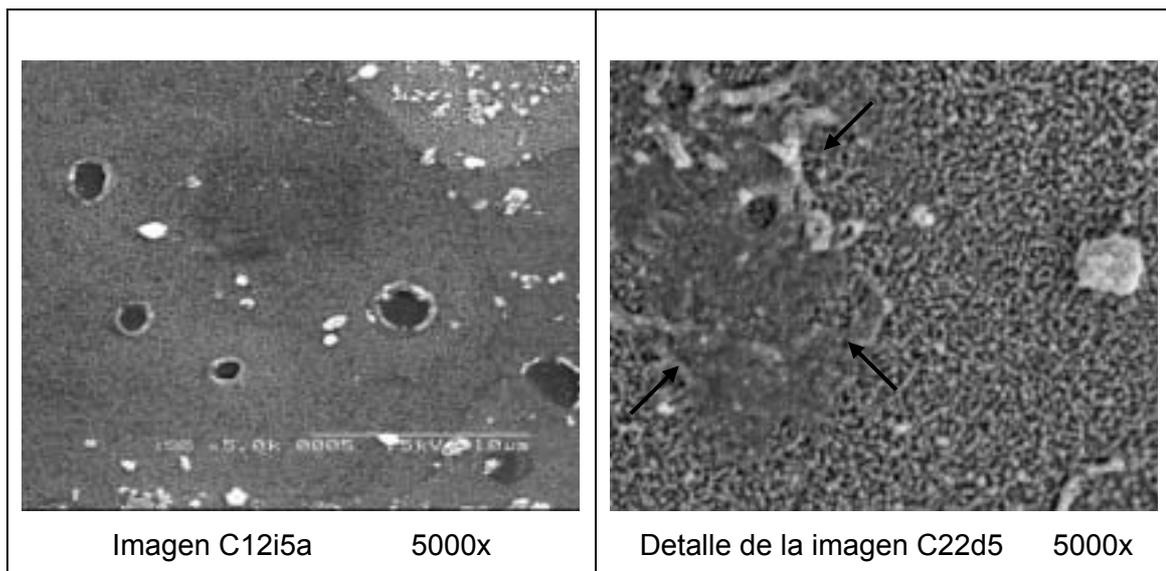


Figura 3.14. En la imagen izquierda epitelio con restos celulares (pequeñas manchas blancas) y en la imagen derecha posibles restos de mucina (señalado con flechas) junto a un resto celular blanco

Todas las células analizadas morfológicamente en este grupo de córneas presentan una membrana celular intacta. Ninguna muestra un tono claro a 500X frente a una gran mayoría (92,26%) de células de tonos intermedios y sólo un 7,74% de células oscuras.

Las uniones celulares, al igual que en las córneas control, están casi siempre intactas (71,43% de uniones de categoría 1 y 20,24% de categoría 0,8). Sólo en contadas ocasiones (4,76% de categoría 0,5 y 3,57% de categoría 0,2) presentan grietas o discontinuidades. No se han encontrado células cuyas uniones se incluyeran en la categoría 0.

En cuanto al tamaño celular, un 44,06% de las células son de tamaño intermedio mientras que existe la misma proporción de grandes que de pequeñas.

La forma de las células analizadas se decanta, más claramente, hacia una amplia mayoría de poligonales (67,86%), el grupo de células intermedias representan un 26,78% mientras que las células circulares son ocasionales (5,36%).

Por lo que respecta a los cráteres o *holes*, aparecen, aproximadamente, en la mitad de las células estudiadas (59,52%). En algunas córneas hay una amplia mayoría de células con *holes* (por ejemplo, en las córneas C12i, C22d) mientras que en otras las proporciones son iguales o, incluso, se decantan hacia la ausencia de estas formas circulares.

Las características de los *holes* son variables. De este modo, se pueden observar algunos con fondo oscuro y liso y otros con una superficie interior del mismo tono o más clara que la célula que los alberga. A estas diferencias debe añadirse la apariencia de los bordes que delimitan el cráter, que pueden aparecer hacia arriba (más claros que el resto) o hacia abajo (menos definidos). (Ver figura 3.15)

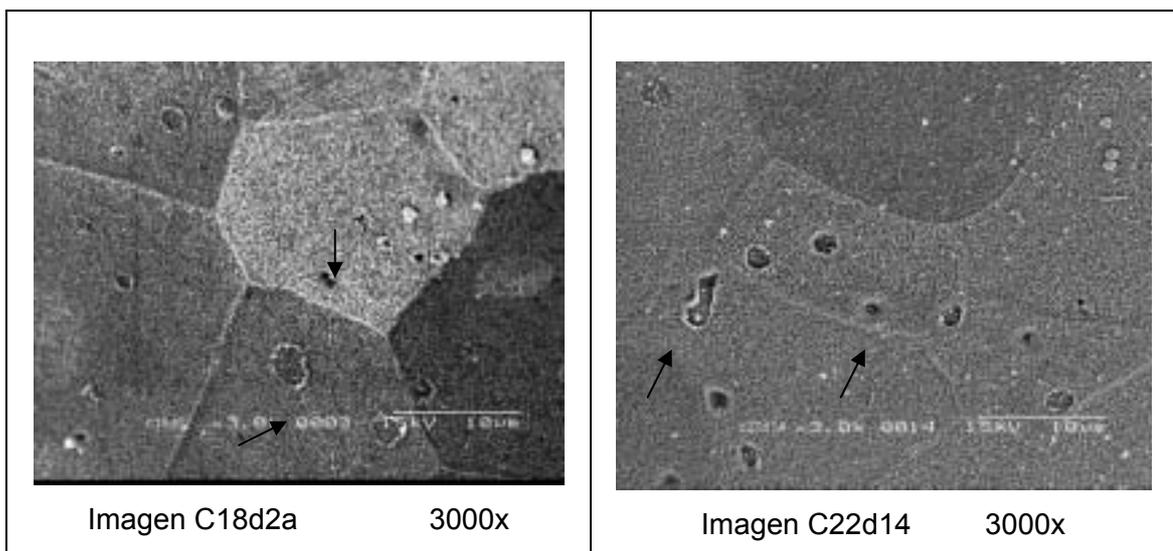


Figura 3.15. Diferentes tipos de *holes* en el mosaico epitelial (flechas)

Las microproyecciones de las células analizadas dentro de este tiempo de apertura palpebral son en una amplia mayoría (83,34%) de categorías altas (1 y 0,8) el resto incluye células cuya superficie ocupada por las microproyecciones es de categoría 0,5 ó 0,2 e incluso hay algunas células sin microproyecciones (4,16%). Este último grupo se trata, siempre, de células en proceso de exfoliación. (Ver figura 3.16)

Al igual que en las córneas control, las microproyecciones pueden variar en forma, tamaño y densidad de una célula a otra pero intracelularmente son bastante homogéneas. (Ver figura 3.17 en la página siguiente)

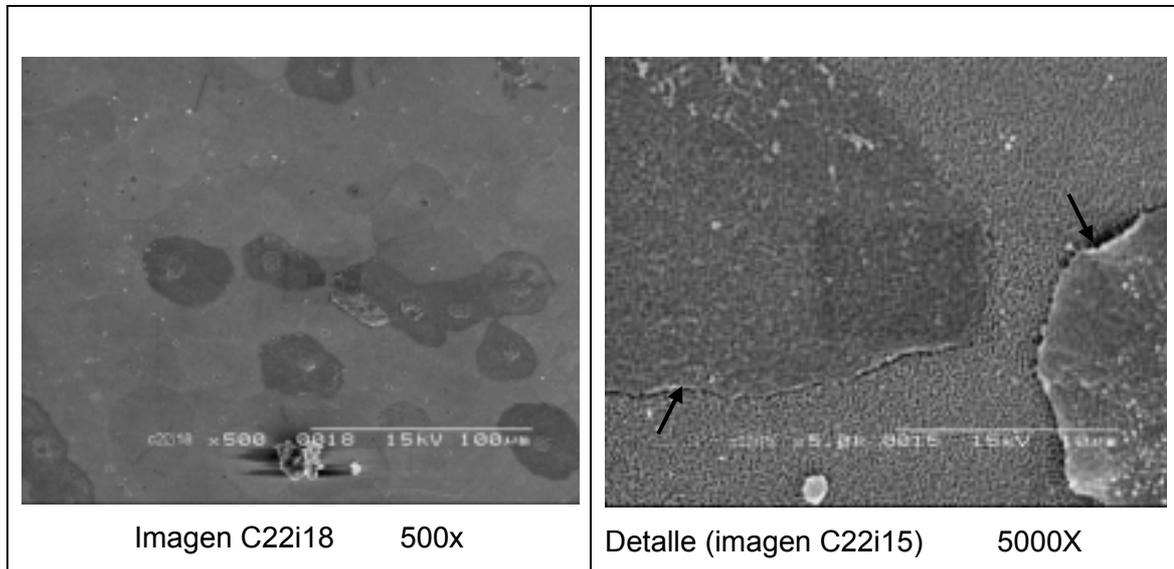


Figura 16. Imagen general de una zona de la córnea C22i y detalle a 5000X de dos células en proceso de exfoliación sin microproyecciones (señaladas con una flecha)

Las desigualdades entre células son mayores cuanto más diferente sea el valor de la variable *superficie ocupada por las microproyecciones (SOM)*. Por ejemplo, la mayoría de células de este grupo posee un patrón de microproyecciones catalogado como 1 ó 0,8 por lo que la forma de estas estructuras es, casi siempre, vermiforme o erecta. En la minoría de células, en las que la variable *SOM* es más baja, las microproyecciones son más irregulares en forma y densidad.

El tono de gris de estas estructuras de membrana suele ser, en general, uniforme en cada célula, aunque existen algunas excepciones. En los casos en los que el tono no es homogéneo, sucede que, algunas microproyecciones aparecen más erectas y, por lo tanto, son más claras, normalmente, blancas.

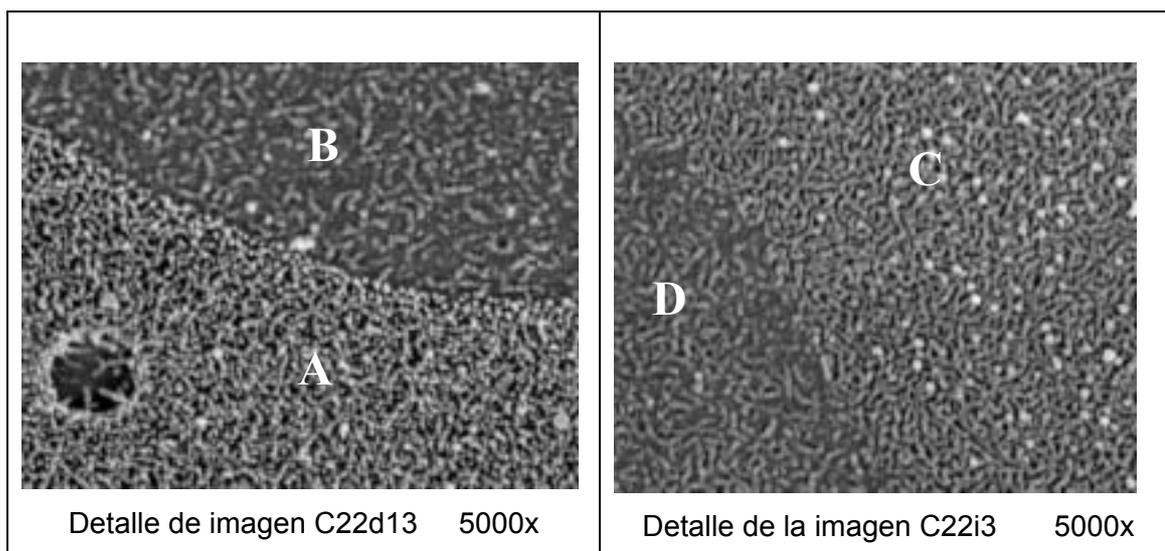


Figura 3.17. Microproyecciones. En la imagen de la izquierda dos células con dos tamaños de microproyecciones diferentes (A y B). A la derecha una célula cuyas microproyecciones tienen un tono de gris desigual con punteados blancos (C) y otra con tonos más uniformes (D).

A continuación, se presenta una tabla resumen de los datos morfométricos de las células analizadas en este grupo de córneas.

| Datos morfométricos de las células analizadas en las córneas de TAP<1h | | | | | | | | | | | |
|--|-------|----------------|-------|---------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|
| (Todos los datos de esta tabla aparecen en tantos por ciento) | | | | | | | | | | | |
| TONO | | UNIONES | | TAMAÑO | | FORMA | | HOLES | | SOM* | |
| claras | 0 | cat. 1 | 71,43 | peq. | 27,97 | polig. | 67,86 | con | 59,52 | cat. 1 | 55,36 |
| inter | 92,26 | cat. 0,8 | 20,24 | med. | 44,06 | inter. | 26,78 | sin | 40,48 | cat. 0,8 | 27,98 |
| osc | 7,74 | cat. 0,5 | 4,76 | gran. | 27,97 | circ. | 5,36 | | | cat. 0,5 | 8,93 |
| | | cat. 0,2 | 3,57 | | | | | | | cat. 0,2 | 3,57 |
| | | cat. 0 | 0 | | | | | | | cat. 0 | 4,16 |

Tabla 3.4. Resumen de los datos morfométricos de las células con tiempo de apertura palpebral de menos de una hora. *SOM: superficie ocupada por las microproyecciones.

3.1.3. Córneas con TAP entre 1 y 2 horas

La superficie apical del epitelio de las córneas de este tercer grupo presenta, contrariamente a lo observado en TAP anteriores, marcadas desigualdades de una zona a otra. De este modo, algunas imágenes a 500 aumentos muestran un estrato escamoso absolutamente normal, equivalente al observado en las córneas control, mientras que en otras imágenes el epitelio aparece algo alterado e, incluso, en ocasiones profundamente desestructurado.

Las zonas epiteliales que aparecen normales, en este tiempo de apertura, no son todas iguales. Presentan ciertas diferencias, como sucede en los tiempos de apertura anteriormente descritos, en lo que se refiere al contraste del mosaico, la visualización de los contornos celulares y la textura más o menos granulosa. Sin embargo, en todas ellas el epitelio se observa continuo, las membranas celulares están intactas y los núcleos no son aparentes, excepto en las células en proceso de exfoliación (Ver figura 3.18)

Al igual que en los otros TAP, las células exfoliadas o en proceso de exfoliación aparecen en zonas con aspecto fisiológicamente normal y poseen las mismas características que sus análogas en los tiempos de apertura anteriores. (Estas características se han resumido, anteriormente, en la tabla 3.3) Además, la pérdida de las uniones celulares se muestra progresiva, gracias a la existencia de numerosas bridas. (Ver, de nuevo, figura 3.18)

En este y en los siguientes grupos de córneas no es posible calcular la proporción de células exfoliadas, con el método anteriormente utilizado, ya que los epitelios, además de la exfoliación fisiológica, presentan una exfoliación patológica. Esta última, desencadena una descamación masiva afectando a varias capas epiteliales (como se describe más adelante), por lo que se hace inviable contar todas las células descamadas.

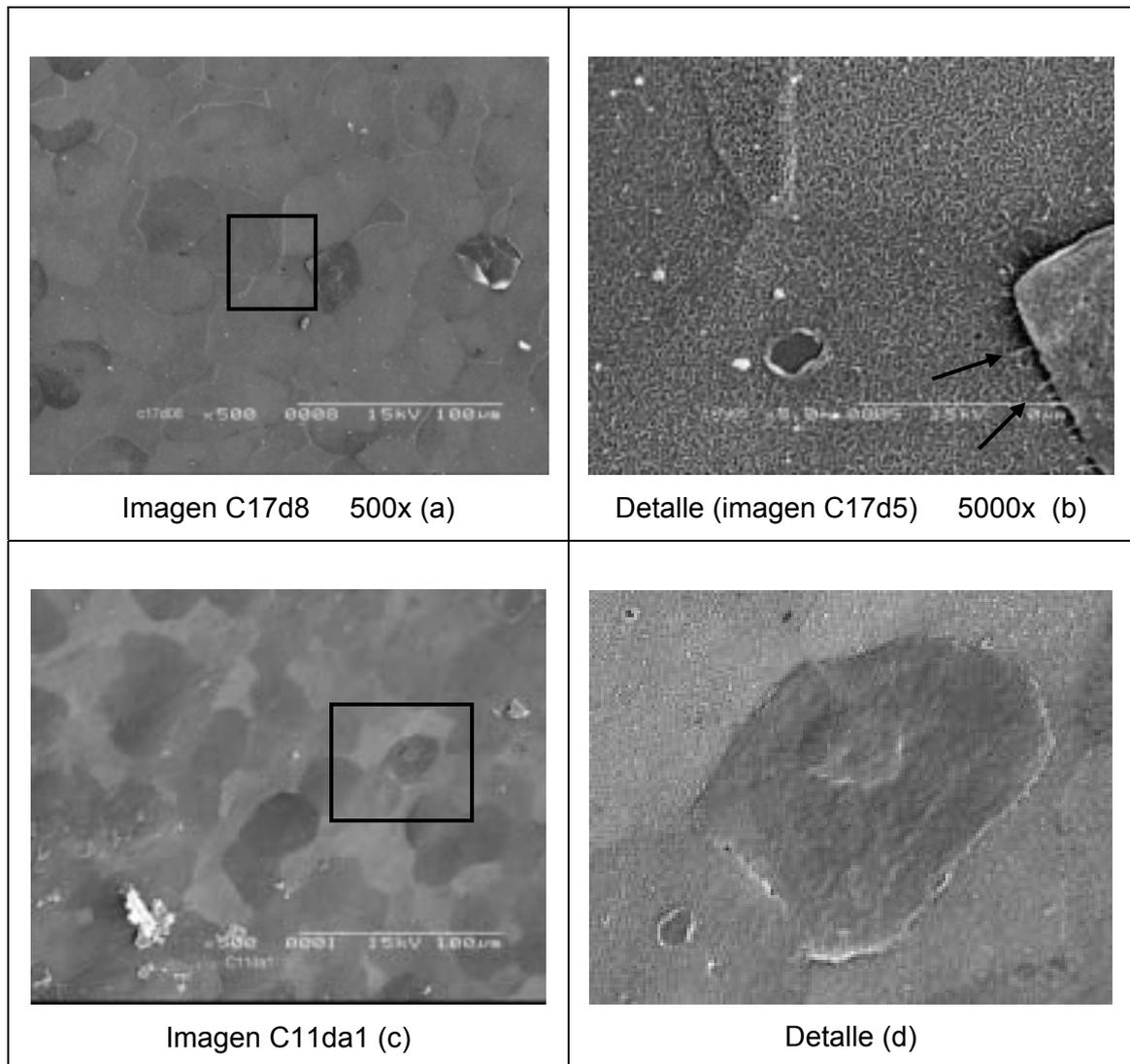


Figura 3.18. Zonas epiteliales de aspecto normal en las córneas de TAP 1-2h. Obsérvese el diferente contraste de tonos de gris entre los dos epitelios (a) y (c). En las imágenes (b) y (d) detalles de células en proceso de exfoliación. Las bridas de unión entre la célula exfoliada y el epitelio aparecen señaladas con una flecha.

Las zonas alteradas, fruto de las condiciones adversas a las que ha sido sometido el epitelio, tampoco presentan siempre el mismo aspecto, mostrando, en conjunto, cierta gradación. De este modo, aparecen áreas epiteliales poco afectadas con marcado aspecto granuloso, núcleos celulares manifiestos en casi todas las células, estén o no en proceso de exfoliación, membranas apicales con un leve grado de ondulación y/o pequeñas erosiones ocasionales. (Ver figura 3.19)

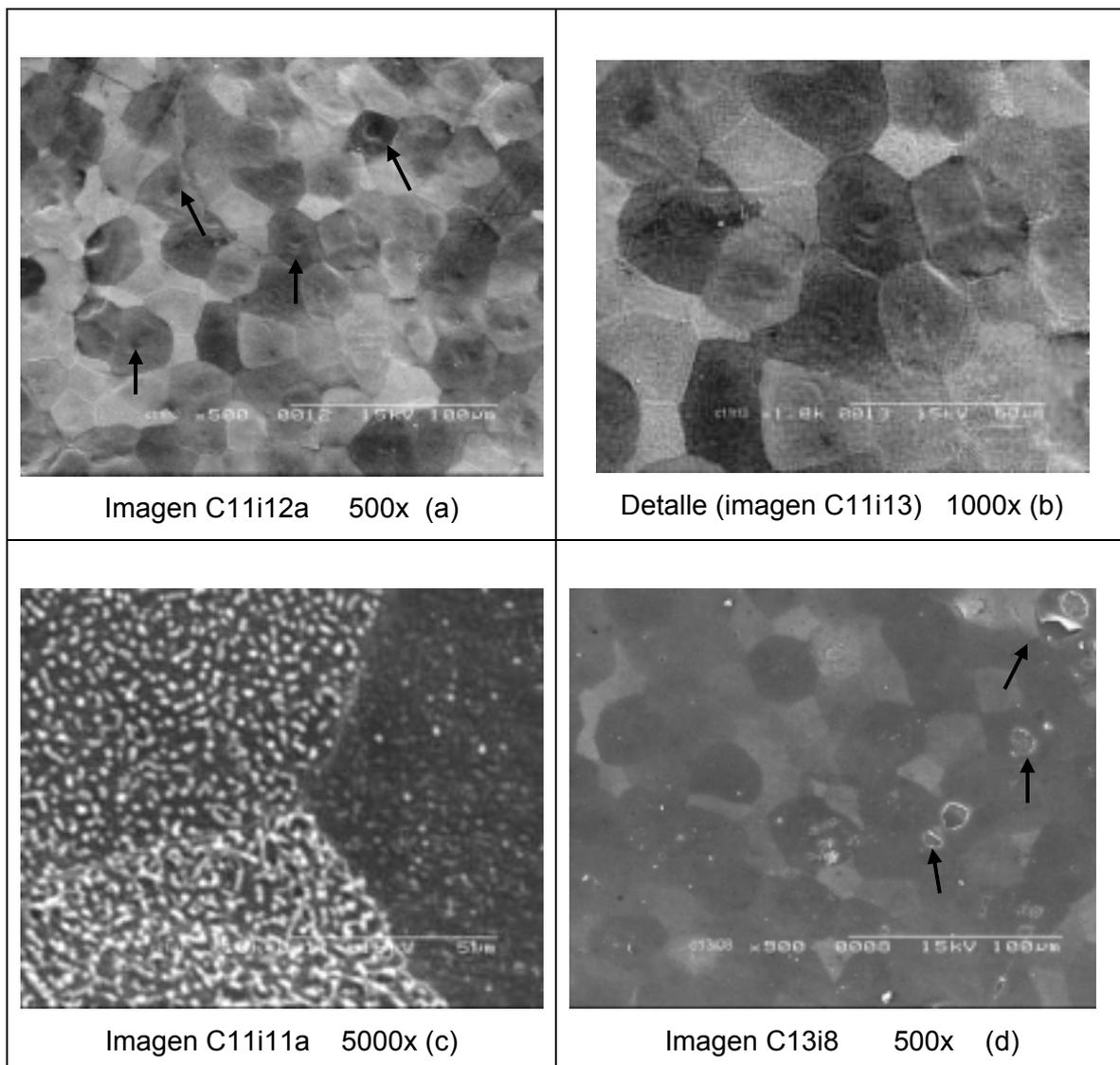


Figura 3.19. Alteraciones leves en el grupo de córneas con tiempo de apertura de una a dos horas. Las imágenes (a), (b) y (c) corresponde a la misma zona visualizada a diferentes aumentos. Su aspecto es marcadamente granuloso, las membranas celulares son onduladas y los núcleos manifiestos (flechas). En la imagen (d) se señalan las pequeñas erosiones de la membrana.

Este aspecto más granuloso se debe a que, en dichas zonas y de forma generalizada, las células poseen una densidad menor de microproyecciones, la mayoría de las cuales aparecen erectas, hecho que desencadena una pérdida de uniformidad en el tono celular. La visualización de muchos de los núcleos celulares es una característica que no se ha observado en las imágenes de los TAP anteriores, en los que sólo las células en proceso de exfoliación o exfoliadas presentan un núcleo manifiesto.

Por lo que respecta a las ondulaciones de la membrana plasmática, estas tienden a incrementarse en ciertas zonas, ocasionando evidentes pérdidas de tonicidad de la membrana. (Ver figura 3.20)

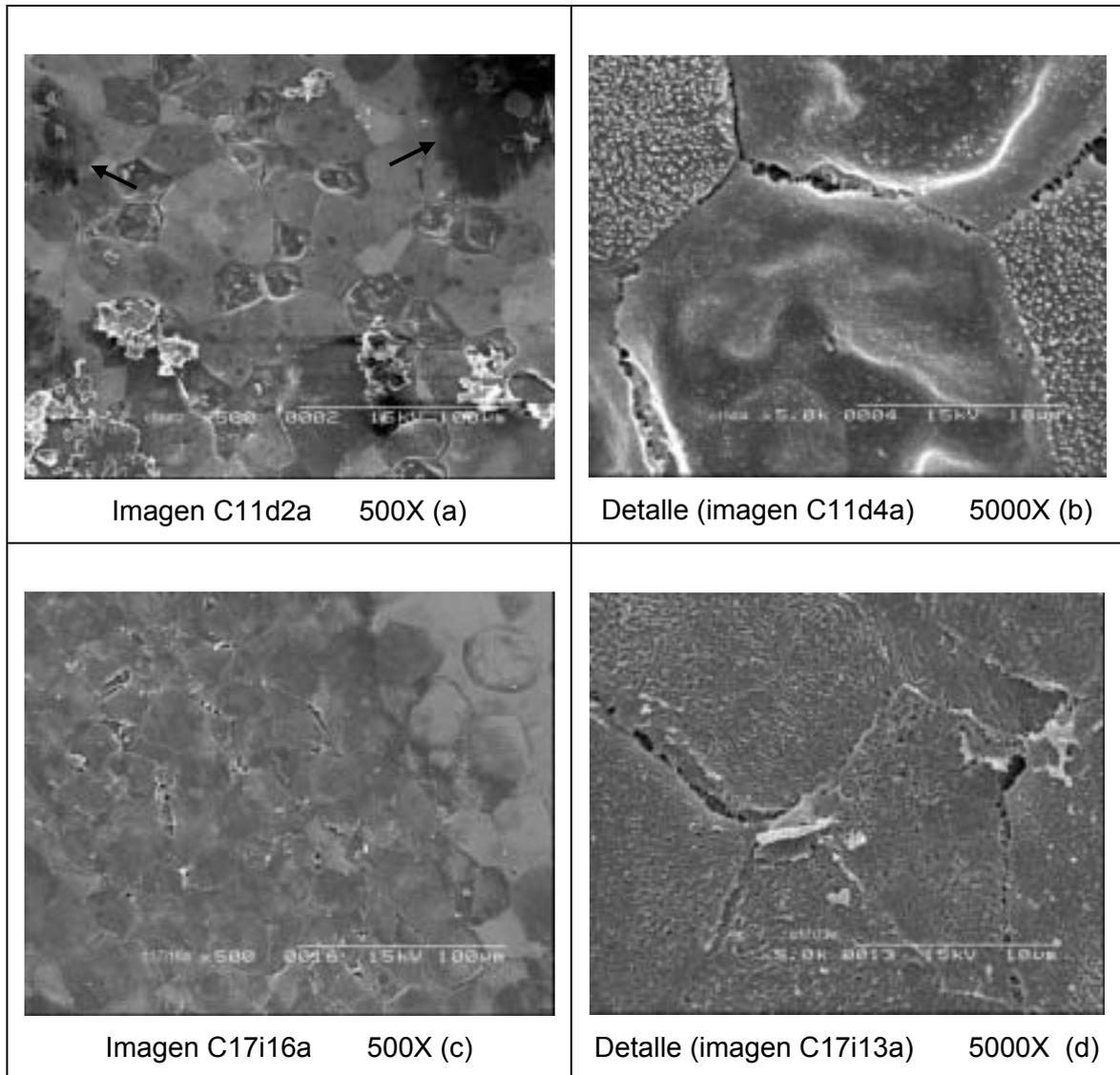


Figura 3.20. Dos zonas con graves alteraciones en el grupo de córneas con TAP de una a dos horas. Las áreas negras (flechas) que aparecen en (a) son debidas a cargas electrostáticas generadas por la elevada cantidad de restos epiteliales, relativamente grandes, que aparecen sobre la superficie corneal.

En consecuencia, parte de las células de algunas áreas más afectadas aparecen con aspecto arrugado y deshinchado, con una pérdida total de microproyecciones, sin núcleo aparente y con un tono gris oscuro. Las células que las rodean pueden presentar diferentes tonos de gris y un aspecto casi

normal a no ser por la baja densidad de las microproyecciones, todas muy claras.

En otras ocasiones, estas áreas más alteradas pueden presentar un aspecto acerado de color gris uniforme (el contraste de tonos intercelulares se ha perdido) y sin núcleos aparentes. La uniformidad de estas zonas implica, también, a las microproyecciones que, desaparecen en todas las células. Además las membranas celulares se muestran muy porosas y con irregularidades. (Ver, de nuevo, figura 3.20).

A pesar de la existencia de ciertas desigualdades entre las zonas más afectadas, todas poseen una característica común que es la pérdida de integridad en las uniones celulares. Esta pérdida origina, en ocasiones, discontinuidades del epitelio que abarcan varios estratos celulares (como se muestra en la imagen C17i16a y C17i13a de la figura 3.20). Estas discontinuidades no aparecen nunca en las córneas sanas ni en los TAP menores de una hora.

En consecuencia, el proceso degenerativo, desencadenado a causa de la falta de parpadeo, posee ciertos rasgos comunes con la descamación fisiológica pero presenta algunas características diferenciales que le dotan de un carácter necrótico, inexistente en una exfoliación normal. En la tabla 3.5 se exponen las principales diferencias entre los dos procesos, observadas en las imágenes de este grupo de córneas.

Como ya se ha comentado anteriormente, todas las células de las zonas alteradas presentan una disminución de la densidad de las microproyecciones. Es necesario matizar que este hecho conlleva, frecuentemente, una importante pérdida de homogeneidad en la distribución y forma de estas prominencias de la membrana.

| EXFOLIACIÓN FISIOLÓGICA | | ALTERACIONES PATOLÓGICAS | |
|---------------------------------------|---|---|---|
| Rasgos del proceso | Signos histológicos | Rasgos del proceso | Signos histológicos |
| Perdida progresiva de las uniones | Existencia de bridas de unión Afecta a un sólo estrato celular | Rotura acelerada de las uniones | Grandes grietas en el contorno celular Afecta a varios estratos celulares |
| Reabsorción progresiva del citoplasma | Las células presentan suaves ondulaciones y relativa turgencia de la membrana | Brusca pérdida del contenido citoplasmático | Severa disminución de la tonicidad de la membrana. Células con grandes ondulaciones y hundimiento de la membrana |
| Afectación puntual | Implicación de una célula epitelial o grupos de tres o cuatro. | Afectación masiva | Implicación de una zona del epitelio |

Tabla 3.5. Diferencias entre la exfoliación fisiológica y las alteraciones patológicas más severas observadas en las córneas con TAP 1-2h.

Aunque, al describir las córneas control también se ha especificado que las células con categorías de microproyecciones más baja presentaban un patrón menos uniforme, nunca es tan heterogéneo como en las células alteradas de los epitelios con tiempo de apertura de una a dos horas. (Ver figura 3.21)

Por otro lado, ninguna de las imágenes de este tercer grupo de córneas presenta signos claros de restos de mucina.

Los datos morfométricos obtenidos en las células de este grupo de córneas demuestran que el tono celular de la inmensa mayoría de ellas es intermedio (95,29%). De entre todas las células escogidas, ninguna se ha clasificado como clara.

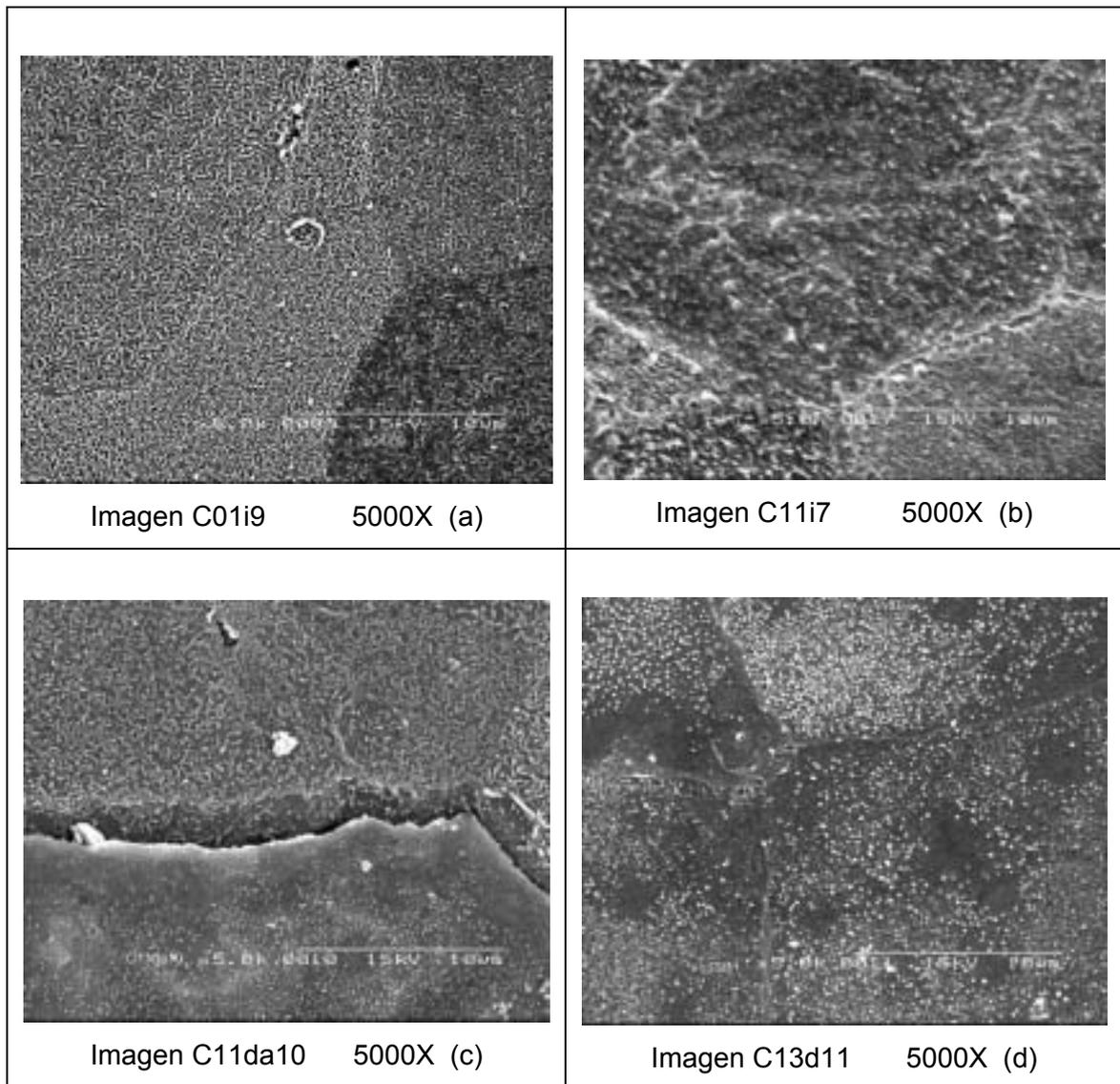


Figura 3.21. Heterogenicidad en el patrón de las microproyecciones. Obsérvese las alteraciones de las microproyecciones en las células visualizadas en (b), (c) y (d) respecto de la imagen (a) de una córnea control.

A pesar de la existencia de zonas alteradas, la mitad de las células presentan uniones en perfecto estado (categoría 1: 56,02%). El resto, casi a partes iguales, se distribuyen entre las categorías 0,8, 0,5 y 0,2, quedando un 0,52% de células cuyas uniones han desaparecido por completo.

El parámetro tamaño celular sigue teniendo bastante dispersión y muestra un patrón muy parecido al observado en los anteriores grupos de córneas (14,14% de células pequeñas, 49,21 % de células intermedias y 36,65% de grandes).

Sólo resalta el ligero aumento del número de células grandes. (36,65% en este grupo frente a 27,97% en el anterior)

La forma de las células analizadas en este tiempo de apertura palpebral presenta, también, una analogía con los grupos precedentes. De este modo, algo más de la mitad de las células son poligonales (54,45%), en menor número aparecen las células intermedias (33,51%) y por último las circulares, que aunque son minoría, han aumentado su número considerablemente respecto a los TAP anteriores. (En este grupo las células circulares representan un 12,04% mientras que en las córneas control y las sometidas a un tiempo de apertura de menos de una hora son, respectivamente, un 8,58 y un 5,36% del total de células estudiadas)

Por lo que respecta a los cráteres o *holes*, estos están presentes en un 63,33% de las células. Sin embargo, si este parámetro se analiza córnea a córnea se observa, al igual que en los grupos anteriores, la existencia de córneas (C11i y C13d) cuyas células sin *holes* son mayoritarias.

En este tiempo de apertura palpebral, el parámetro que cuantifica las microproyecciones muestra una pauta nueva. En concreto, el cambio observado se basa en un descenso de la categoría 1 y un aumento, bastante importante, de las últimas categorías, véase, las categorías 0,5, 0,2 y 0. En la tabla 3.6 se resumen todos los datos morfométricos de este tercer grupo.

| Datos morfométricos de las células analizadas en las córneas de TAP1-2h | | | | | | | | | | | |
|--|-------|----------------|-------|---------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|
| (Todos los datos de esta tabla aparecen en tantos por ciento) | | | | | | | | | | | |
| TONO | | UNIONES | | TAMAÑO | | FORMA | | HOLES | | SOM* | |
| claras | 0 | cat. 1 | 56,02 | peq. | 14,14 | polig. | 54,45 | con | 36,65 | cat. 1 | 18,32 |
| inter | 95,29 | cat. 0,8 | 15,18 | med. | 49,21 | inter. | 33,51 | sin | 63,33 | cat. 0,8 | 24,61 |
| osc | 4,71 | cat. 0,5 | 14,66 | gran. | 36,65 | circ. | 12,04 | | | cat. 0,5 | 19,37 |
| | | cat. 0,2 | 13,61 | | | | | | | cat. 0,2 | 25,65 |
| | | cat. 0 | 0,52 | | | | | | | cat. 0 | 12,04 |

Tabla 6. Relación de datos de las córneas del TAP una a dos horas. *SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

3.1.4. Córneas con TAP entre 2 y 3 horas

En las córneas sometidas a este tiempo de apertura resalta, como en el TAP anterior, la existencia de zonas con diferentes grados de alteración. En general, la mayor parte del epitelio corneal analizado presenta alguna característica que le aleja del patrón observado en las córneas control.

De este modo, en muy pocas zonas (delimitadas por las imágenes a 500X) existe una absoluta analogía con un epitelio normal, con lo que, sólo se ha observado una célula exfoliada y ninguna en proceso de exfoliación fisiológica (ver figura 3.22).

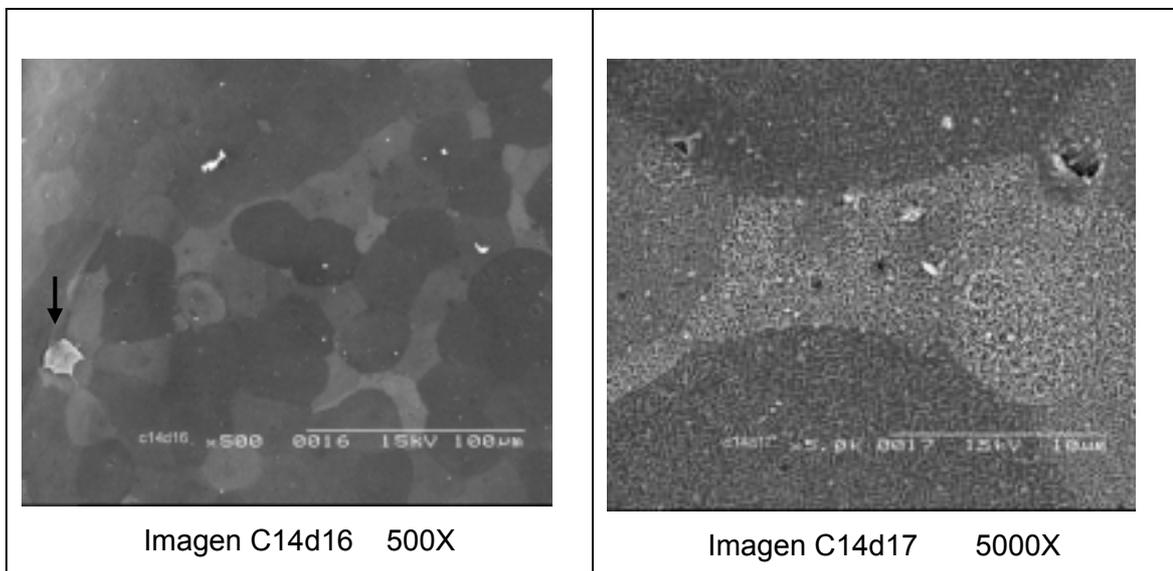


Figura 3.22. Zona epitelial normal en el TAP 2-3h. Obsérvese la célula exfoliada a 500X (flecha)

Por el contrario, muchas áreas epiteliales de este grupo de córneas presentan un aspecto marcadamente granuloso (ver figura 3.23), con núcleos celulares manifiestos, a veces. Dicha textura granulosa se debe, como ya se ha comentado anteriormente, a alteraciones en las microproyecciones. En concreto, las prominencias de la membrana presentan una elevada heterogeneidad en su forma y distribución intracelular.

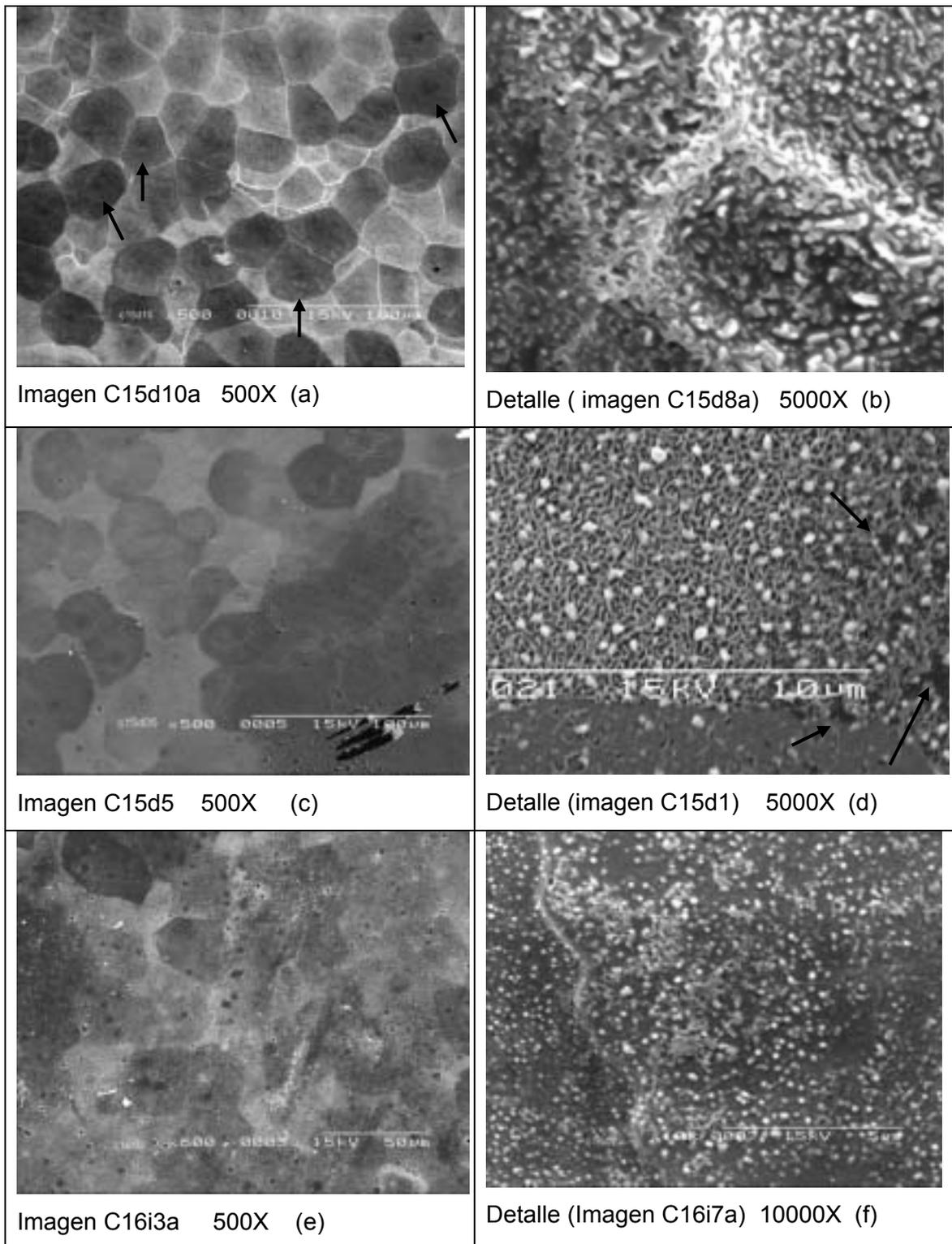


Figura 3.23. Tres zonas (a), (c) y (e) con diferentes alteraciones en las microproyecciones. En (a) obsérvense los núcleos celulares manifiestos (flechas) y en (b) la irregular forma de las microproyecciones. En (d) discontinuidades de la membrana celular (flechas) y en (e) y (f) aspecto extremadamente granuloso del epitelio.

Hasta ahora, esta pérdida de uniformidad se había observado en aquellas células que mostraban una baja densidad de microproyecciones. Sin embargo, en este grupo, de tiempo de apertura más alto, la falta de homogeneidad se observa, también, en células cuya membrana aparece llena de prominencias.

Por otro lado, en algunas de estas células se pueden detectar, a 5000X, discontinuidades de la membrana en forma de agujeros de forma irregular y tono mucho más oscuro que el resto. (Ver, de nuevo la figura 3.23).

A parte de las muchas zonas con alteraciones en las microproyecciones existen otras que presentan un aspecto normal a no ser por la presencia de pequeñas pero frecuentes erosiones del epitelio. (Este tipo de alteraciones ya se han observado en el TAP anterior aunque no de forma tan frecuente.)

En estos casos el desprendimiento del epitelio está muy localizado en diferentes áreas cuyo tamaño, normalmente, no llega a cubrir toda la superficie de una célula. A pesar de que las lesiones son pequeñas se muestran profundas ya que implican a más de una capa epitelial. Además, las células de capas subyacentes que quedan al descubierto muestran una falta total de microproyecciones. (Ver figura 3.24)

En una primera observación se podría pensar que estas erosiones son lesiones mecánicas producto de la manipulación de la muestra. Sin embargo, esta explicación parece poco probable ya que las alteraciones son pequeñas, frecuentes y están distribuidas al azar mientras que las lesiones mecánicas suelen ser más grandes, no siguen contornos celulares sino que, de forma fortuita, incluyen grupos de células siguiendo una dirección principal y, normalmente, son lesiones que aparecen en solitario.

Además de las alteraciones descritas hasta el momento, este grupo de córneas presenta algunas zonas epiteliales gravemente deterioradas. El aspecto de estas zonas es similar al observado en las áreas más dañadas del TAP anterior. (Para comprobar estas semblanzas visualmente se deben comparar

las imágenes incluidas en las figuras 3.20 y 3.25 en las páginas 116 y 126 respectivamente)

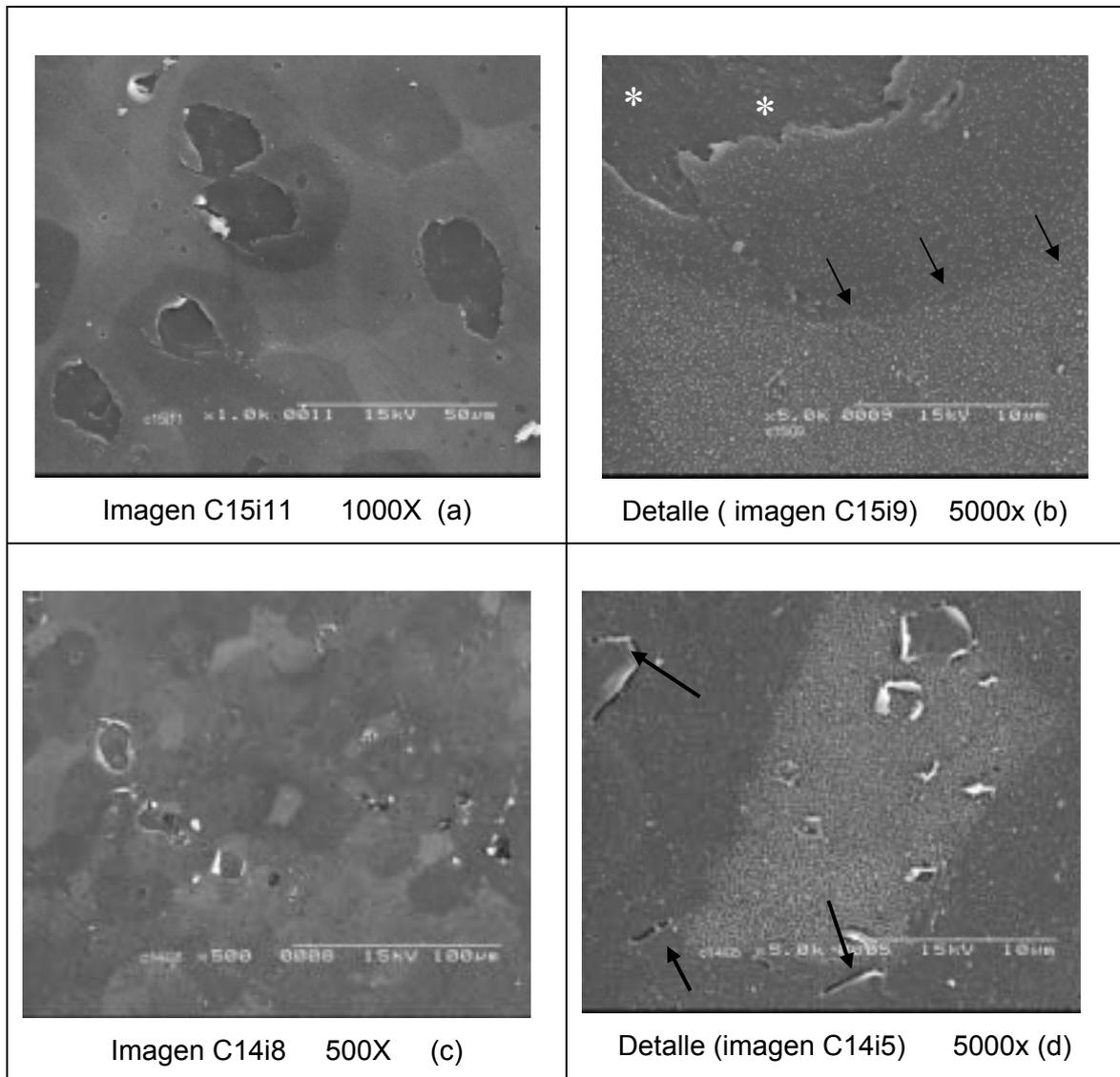


Figura 3.24. Dos zonas (a) y (c) con erosiones. En (b) se puede observar como algunas lesiones dejan al descubierto tres capas de células (el límite entre células de la primera y segunda capa está señalado con flechas). Además hay una falta total de microproyecciones en las células de capas más profundas (*). En (d) el proceso parece presentarse de forma incipiente pues el epitelio aparece seccionado por pequeñas ranuras bastante profundas (flechas)

De este modo, en las córneas sometidas a un tiempo de apertura de dos a tres horas se diferencian, también, dos tipos de alteraciones graves. En las

primeras, las uniones intercelulares aparecen profundamente alteradas afectando a amplias zonas, en diferentes capas. En estos casos, el epitelio presenta una uniformidad en el tono de gris que, a veces dificulta la visualización de los contornos celulares. Los núcleos no son visibles y las membranas muestran una total pérdida de las microproyecciones y una textura extremadamente porosa, con grietas y pequeños agujeros que rompen su continuidad. (Ver imágenes (a), (b), (c) y (d) de la figura 3.25)

En un segundo grupo de imágenes, como por ejemplo la imagen (e) y (f) de la figura 3.25, se puede observar como el epitelio ha perdido su integridad a causa de una particular descamación forzada. En este caso, las alteraciones están muy localizadas y no implican a toda una zona sino, sobre todo, a una célula y las inmediatamente colindantes a ella. La célula más afectada, al desprenderse, ha dejado una depresión con la forma exacta de su silueta, generando, así, un importante desnivel en la superficie epitelial.

El resto de las células implicadas presentan una membrana que ha perdido la tonicidad y, en consecuencia, se muestra muy arrugada, incluso hundida en el lugar en el que parece estar localizado el núcleo.

Cabe resaltar que el profundo desnivel originado en el epitelio de la figura 3.25 (f) demuestra que la célula ausente ha perdido todas sus uniones, de forma casi simultánea, antes de que el citoplasma se pudiera reabsorber totalmente. Ello podría indicar que la superficie epitelial, en este grupo de córneas, está desprovista de parte de sus primeras capas (células planas), al menos en algunas zonas, con lo que el estrato escamoso estaría incompleto.

Este tipo de exfoliación nunca ocurre en una córnea sana cuyas células escamosas son planas y se desprenden de sus uniones de forma progresiva (como ya se ha comentado anteriormente), después que el citoplasma se haya reabsorbido. En consecuencia, el epitelio en condiciones fisiológicas se mantiene siempre liso.

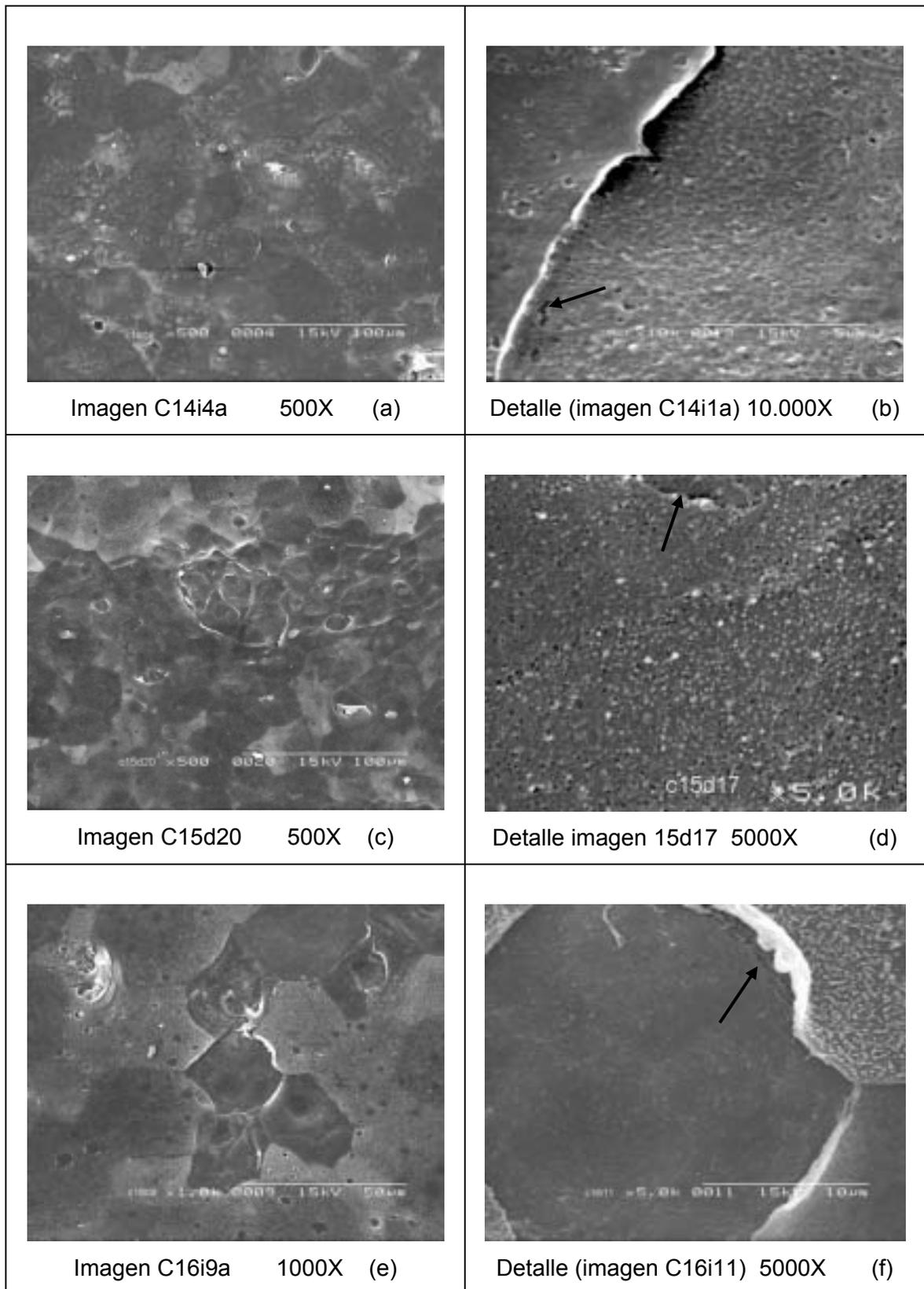


Figura 3.25. Zonas (a), (c) y (e) con importante deterioro epitelial en las córneas sometidas a un TAP de 2-3h. Obsérvese las discontinuidades de la membrana, en forma de poros o grietas (señaladas con flechas).

Por lo que respecta al análisis morfométrico, los resultados demuestran que en este tiempo de apertura palpebral aparecen ciertos cambios que confirman la tendencia del epitelio al deterioro, tendencia que ya se apuntaba en el TAP anterior.

Estos cambios observados se reflejan en el aumento de células con categorías bajas en los parámetros uniones intercelulares y microproyecciones. En concreto, la mitad de las uniones intercelulares se han clasificado dentro de la categoría más alta (categoría 1: 50,73%) como en el grupo de córneas anterior. En cambio el valor diferencial, como ya se ha comentado más arriba, aparece, sobre todo, con el aumento de la categoría más baja (inexistencia de uniones intercelulares). En concreto, la categoría 0 que representa al 0,52% de las células del TAP 1-2h se incrementa hasta el 2,44% en este TAP de 2-3h. Este valor, aún siendo unas cinco veces más alto, es todavía muy pequeño pero posee una significación importante a la hora de justificar el progresivo deterioro del epitelio corneal.

La importancia de este dato se puede comprender si se analizan las características morfométricas de las córneas control. En ellas no se ha encontrado ninguna unión de tan baja categoría y tampoco se encuentran uniones de este tipo en el TAP<1h. Por todo lo expuesto, este cambio observado aunque pequeño en valor absoluto tiene una gran importancia desde un punto de vista relativo. Dicho punto de vista es el que debe prevalecer en este análisis puesto que se pretenden estudiar los cambios acontecidos en la superficie corneal, inicialmente sana.

Más obvio es el caso de las microproyecciones de categorías bajas cuya presencia en las córneas control es insignificante (sólo un 2,57% de las células control muestran una *superficie ocupada por microproyecciones* de categoría 0,2 y no hay células con microproyecciones de categoría cero) y, sin embargo, representan el 47,80% de las células analizadas en las córneas con TAP de 2 a 3 horas.

Por otro lado, el incremento de formas circulares y de células con tamaños grandes, observado en el TAP anterior, se mantiene, también, en este grupo confirmando, de nuevo, la tendencia al cambio. Sin embargo, el tono celular aparece, como en todos los TAP, ampliamente dominado por la categoría intermedia (97,07%).

En cuanto a la presencia o ausencia de *holes*, las dos categorías aparecen bastante igualadas (44,88% y 55,12%, respectivamente.) Si este parámetro se analiza córnea a córnea, sólo una presenta una amplia mayoría de células con ausencia de *holes* (córnea C15d)

A continuación, se expone la correspondiente tabla resumen de los datos morfométricos de este grupo de córneas.

| Datos morfométricos de las células analizadas en las córneas de TAP2-3h | | | | | | | | | | | |
|--|-------|----------------|-------|---------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|
| (Todos los datos de esta tabla aparecen en tantos por ciento) | | | | | | | | | | | |
| TONO | | UNIONES | | TAMAÑO | | FORMA | | HOLES | | SOM* | |
| claras | 0 | cat. 1 | 50,73 | peq. | 20,48 | polig. | 51,22 | con | 55,12 | cat. 1 | 17,07 |
| inter | 97,07 | cat. 0,8 | 28,79 | med. | 44,40 | inter. | 36,10 | sin | 44,88 | cat. 0,8 | 17,56 |
| osc | 2,93 | cat. 0,5 | 7,80 | gran. | 35,12 | circ. | 12,67 | | | cat. 0,5 | 17,56 |
| | | cat. 0,2 | 10,24 | | | | | | | cat. 0,2 | 30,73 |
| | | cat. 0 | 2,44 | | | | | | | cat. 0 | 17,07 |

Tabla 3.7. Relación de datos de las córneas del TAP dos a tres horas. *SOM: superficie ocupada por las microproyecciones.

3.1.5. Córneas con TAP mayor de tres horas

El epitelio de este nuevo grupo de seis córneas, sometidas al tiempo de apertura palpebral más largo, presenta, casi siempre, alguna alteración. Aproximadamente la mitad de las imágenes obtenidas a 500 aumentos muestran graves daños, como resultado de las condiciones adversas, mientras que el resto presenta una apariencia normal. A mayores aumentos estas zonas supuestamente normales poseen, también, ciertos rasgos que las apartan del patrón fisiológico. (Ver figura 3.26)

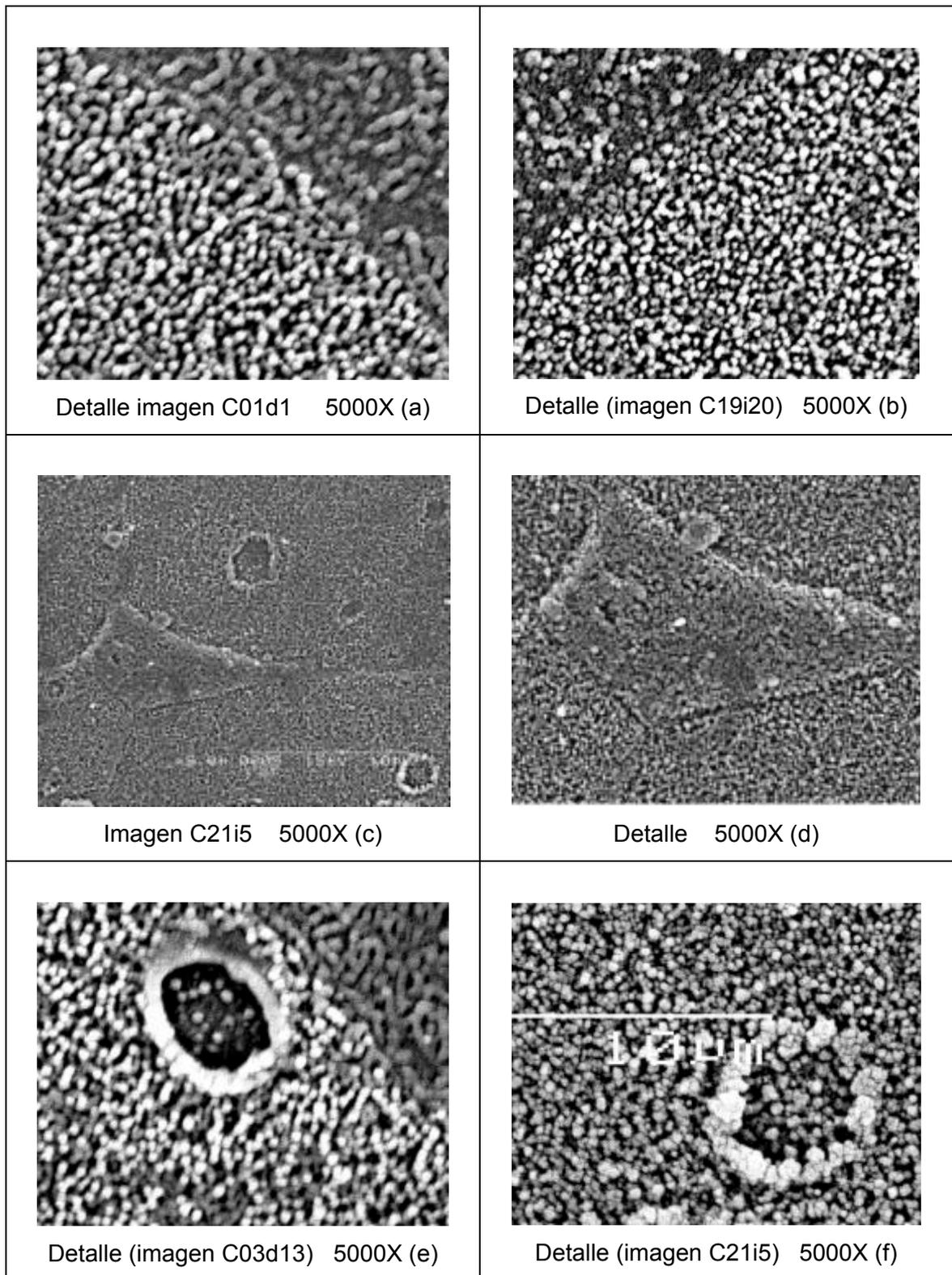


Figura 3.26. Textura granulosa del epitelio a 5000X. Nótese la diferencia entre microproyecciones en un epitelio control (a) y en un epitelio de TAP>3h (b). En (c) y (d) célula pequeña con membrana muy granulosa. En (e) cráter de una célula control y en (f) cráter de una célula de TAP>3h.

En concreto, si se observan a 5000X, las células de zonas no dañadas poseen una elevada densidad de microproyecciones. Sin embargo, estas presentan, frecuentemente, un aspecto extremadamente granuloso con formas pequeñas, erectas y poco regulares. Algunas de estas prominencias, a veces, se muestran grumosas al adherirse entre ellas. Incluso los cráteres o *holes*, muy numerosos en algunas zonas, han sustituido su típico contorno liso y continuo por un conjunto de abultamientos. (Ver figura 3.26)

La membrana presenta, también, un elevado carácter granuloso. Tanto es así que, es difícil saber si la superficie celular posee microproyecciones o, por el contrario, estas han desaparecido y lo que se está visualizando es una membrana de textura muy marcada (Ver, de nuevo, la figura 3.26)

En las córneas del conejo 21 existen algunas zonas con grandes grupos celulares en proceso de descamación, aparentemente fisiológica (ver figura 3.27).

Aunque este proceso ya se ha observado en las córneas de TAP anteriores, nunca se ha mostrado tan masivo. En general, las células que pronto se descamarán son más oscuras, con núcleo manifiesto y aparecen al mismo nivel que el resto de células o ligeramente hundidas. En algunas ocasiones estos grupos celulares presentan signos de alteración, como grandes arrugas y grietas, impropios de la descamación fisiológica. (Ver, de nuevo figura 3.27).

Por otro lado, las zonas más deterioradas muestran el desprendimiento de capas enteras del epitelio. En estos casos, las imágenes presentan zonas en las que se están desprendiendo al menos tres capas de células superficiales.

Este proceso lesivo permite visualizar las capas inferiores que se observan, en general, con aspecto normal y una elevada densidad de microproyecciones. Mientras, las células en proceso de desprendimiento masivo aparecen gravemente alteradas mostrando, como ya se ha descrito en los dos TAP anteriores, un tono de gris uniforme y un contorno celular difuso. Las membranas de estas células aparecen, normalmente, sin microproyecciones ni

holes y muestran una textura muy porosa y arrugada a 5000X. (Ver, figuras 3.28 y 3.29 en páginas 132 y 133)

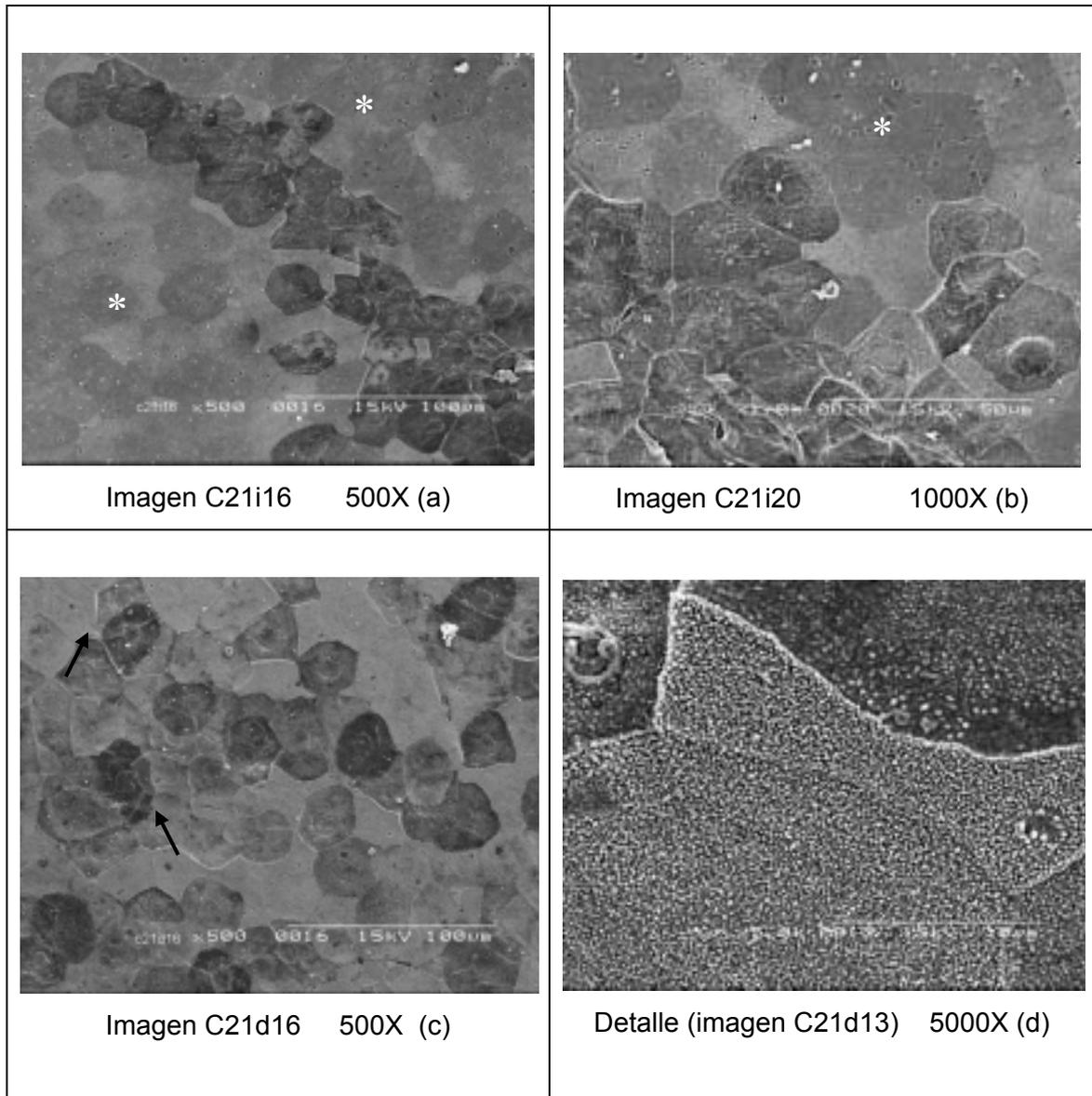


Figura 3.27. Zonas en proceso de descamación pseudofisiológica. En (a) y (b) elevada densidad de *holes* (*). Obsérvese en (b) las arrugas y grietas de las células más oscuras y en (c) como algunas células negras aparecen cubiertas por otras (señalado con flechas). En (d) se puede apreciar la menor densidad de microproyecciones de las células que se descaman (zonas más oscuras)

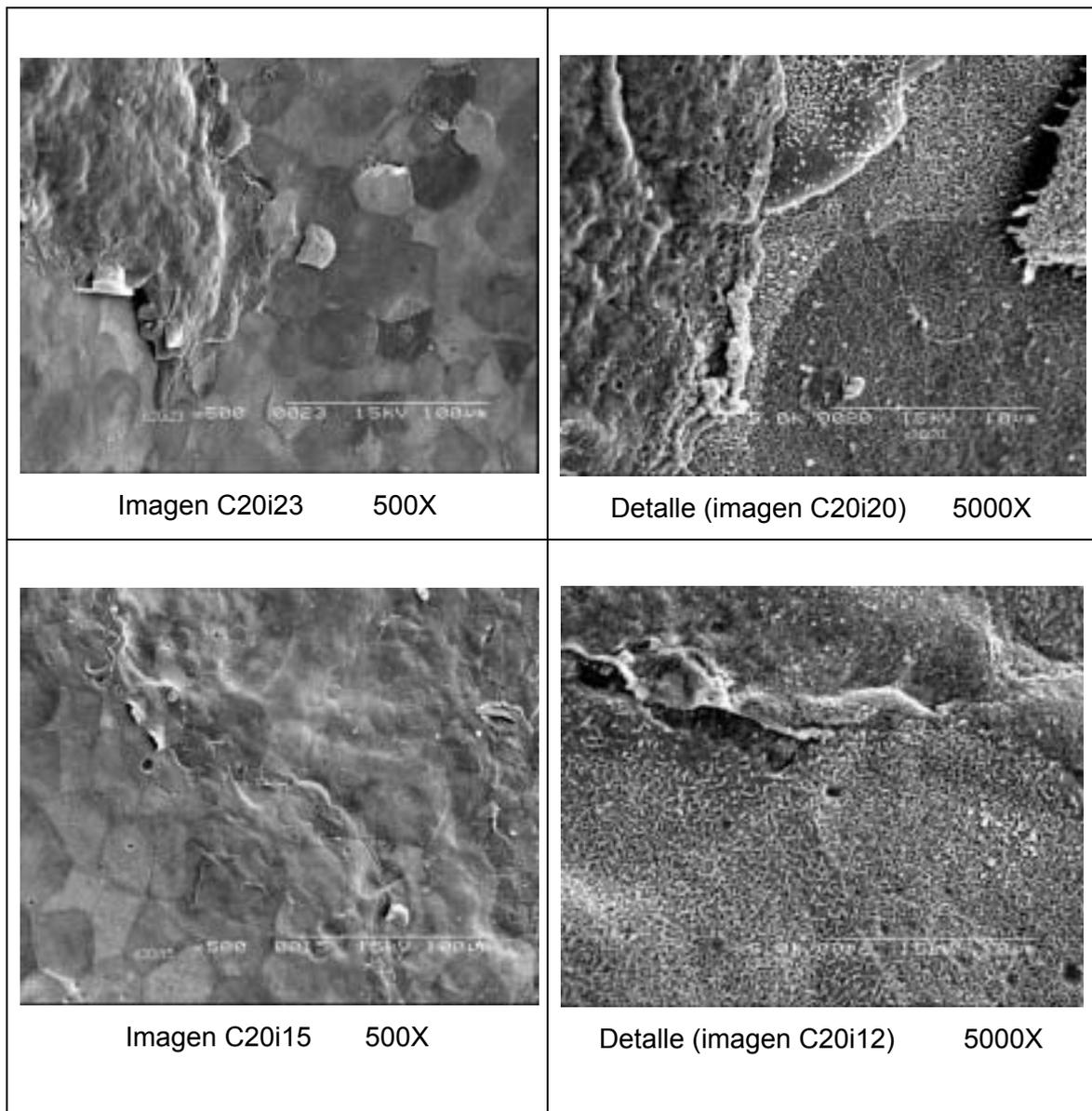


Figura 3.28. Desprendimiento masivo de las capas más superficiales del epitelio en las córneas de TAP>3h.

Como las características celulares son diferentes, existe una nítida frontera que separa las áreas alteradas en proceso de desprendimiento de las zonas contiguas aparentemente normales, ya sean de su mismo estrato o de uno inferior. (Ver, de nuevo, figura 3.29)

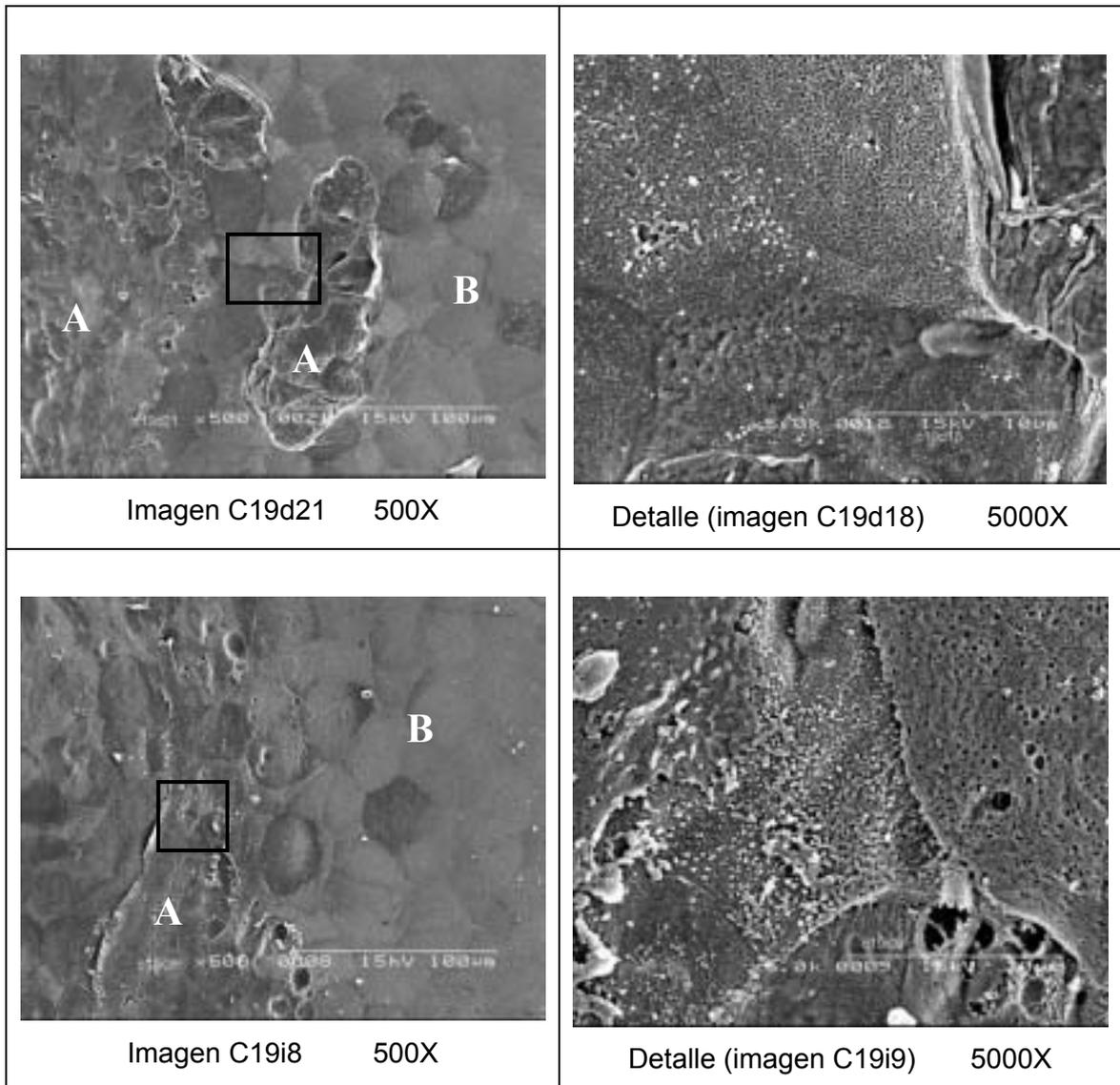


Figura 3.29. Zonas gravemente alteradas en incipiente proceso de desprendimiento (A) frente a otras inmediatamente contiguas de aspecto normal (B).

Lo mismo sucede en aquellos casos en los que las áreas que se desprenden se hallan colindantes a una zona con alteraciones leves (núcleos manifiestos y ligeras arrugas) como sería el caso que ilustra la figura 3.30 donde la zona más dañada parece hundirse al desprenderse.

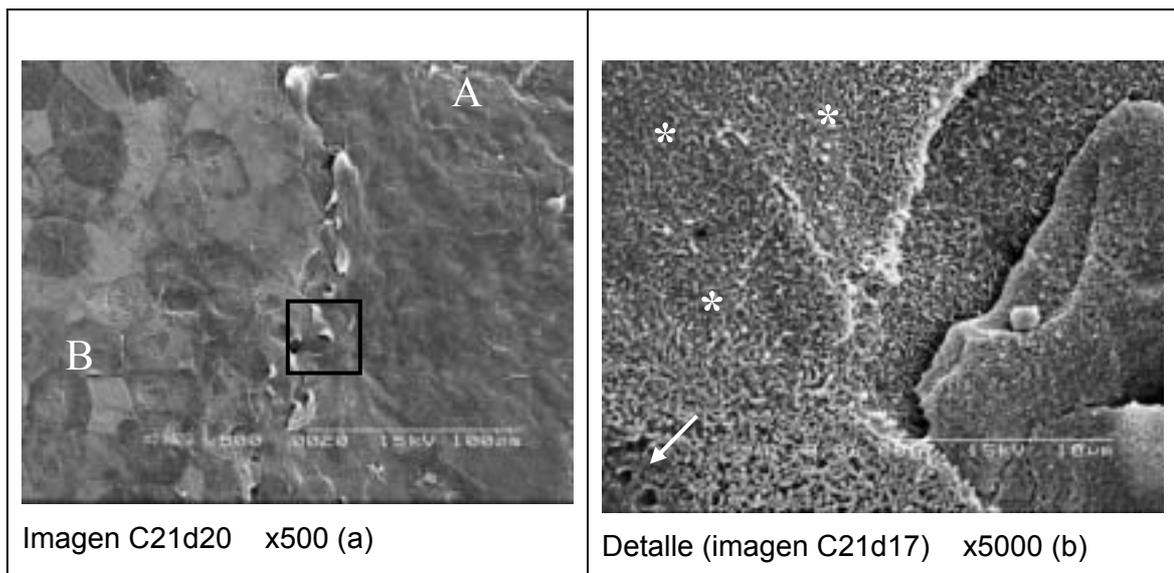


Figura 3.30. Zona que se desprende y se hunde (A) al lado de otra con alteraciones leves (B). Obsérvese la elevada densidad de microproyecciones en las células de la imagen (b) (señaladas con un asterisco) y los poros de la membrana (flecha).

Los tonos celulares de las células analizadas morfométricamente presentan, en su inmensa mayoría, un valor intermedio (99,48%). Aunque esta pauta se ha repetido en los otros tiempos de apertura, es en este TAP donde el porcentaje de células intermedias se acerca más la 100%.

Las uniones intercelulares de categoría más alta aparecen en estas córneas bastante por debajo del 50%. Cabe puntualizar que este es el único grupo de córneas en el que esto sucede. Como es lógico esperar, las uniones de categoría baja aumentan, tanto respecto de la córnea control como respecto del TAP anterior. En concreto, la falta de uniones (categoría 0) duplica su valor respecto de los resultados de las córneas sometidas a un tiempo de apertura de dos a tres horas.

En cuanto al tamaño y la forma de las células analizadas, este grupo muestra un pequeño descenso, respecto del TAP anterior, en el número de células grandes y en las formas circulares. A pesar de ello, los porcentajes (31,94% de células grandes y 8,38% de células circulares) son mucho más altos que los de las córneas control. En general, el patrón observado en el presente tiempo de apertura muestra una mayor dispersión de tamaños respecto de las córneas

control en las que dominaban, claramente, las células pequeñas, que aquí son minoritarias. Aunque también existe cierta dispersión en el parámetro forma, la mitad de las células de este grupo son poligonales, como en todos los TAP.

Por otro lado, en este grupo de córneas predominan las células que no tienen *holes*. Analizando este parámetro córnea a córnea se observa que sólo en la córnea C20i las células con *holes* son mayoritarias. Además cabe resaltar, como ya se ha comentado antes, que existen ciertas zonas de aspecto normal a 500x con una densidad muy elevada de estas estructuras (Ver figura 3.27) mientras que en las áreas afectadas no aparece ningún *hole*.

A cerca de las microproyecciones, señalar un ligero aumento de la categoría 1 respecto del TAP anterior, aunque respecto de las córneas control el valor sigue siendo más bajo (36,65% frente a 45,49% de células con microproyecciones 1 en el grupo control) No obstante, la característica más relevante del patrón de las microproyecciones en este TAP es el incremento de células con categoría 0. Este incremento se ha observado siempre en todos los grupos. De modo que, el número de células sin microproyecciones ha ido subiendo, progresivamente, a medida que el tiempo de apertura aumentaba. A continuación se exponen los resultados morfométricos de este último grupo de córneas en forma de tabla.

| Datos morfométricos de las células analizadas en las córneas de TAP>3h | | | | | | | | | | | |
|--|-------|----------------|-------|---------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|-------------|-------|
| (Todos los datos de esta tabla aparecen en tantos por ciento) | | | | | | | | | | | |
| TONO | | UNIONES | | TAMAÑO | | FORMA | | HOLES | | SOM* | |
| claras | 0 | cat. 1 | 35,60 | peq. | 17,80 | polig. | 62,82 | con | 41,88 | cat. 1 | 36,65 |
| inter | 99,48 | cat. 0,8 | 19,37 | med. | 50,26 | inter. | 28,80 | sin | 58,11 | cat. 0,8 | 23,04 |
| osc | 0,52 | cat. 0,5 | 15,71 | gran. | 31,94 | circ. | 8,38 | | | cat. 0,5 | 8,90 |
| | | cat. 0,2 | 24,61 | | | | | | | cat. 0,2 | 9,95 |
| | | cat. 0 | 4,71 | | | | | | | cat. 0 | 21,46 |

Tabla 3.8. Relación de datos de las córneas del TAP mayor de tres horas. *SOM: superficie ocupada por las microproyecciones.

3.2 Resultados estadísticos

En este subapartado se exponen los resultados de los estudios estadísticos realizados en el epitelio corneal de los conejos. Los datos de la muestra (valores de las variables celulares, previamente descritas) han sido sometidos a una serie de pruebas establecidas en base a los dos objetivos inicialmente propuestos: la caracterización morfológica de las tipologías celulares y el análisis de la influencia del TAP sobre las córneas. El análisis se ha llevado a cabo mediante los programas del paquete estadístico SPSS 12.0S “para Windows” versión 12.01 (SPSS INC. 1989-2003).

Las variables se han clasificado en dos grandes grupos, véase, principales y subordinadas. Las variables principales pueden ser objetivas o subjetivas. Dentro de estas últimas están la variable *holes* y la variable *uniones intercelulares* que se han cuantificado en base a los cambios descritos tras el estudio visual de las células, de ahí su carácter subjetivo. Los valores de estas variables son datos numéricos que representan categorías; dos categorías (0, sin cráteres y 1 con cráteres) para la variable *holes* y cinco categorías (0; 0,2; 0,5; 0,8 y 1) para las diferentes *uniones intercelulares* observadas. (Ver más detalles sobre las categorías en el capítulo de material y método)

En cuanto a las variables principales de carácter objetivo, se han obtenido midiendo los parámetros morfológicos de cada célula en las imágenes del epitelio corneal. Por lo tanto, pueden adoptar cualquier valor dentro del rango de las dimensiones celulares.

Por otro lado, las variables subordinadas se obtienen a partir de la agrupación por categorías de los datos obtenidos en las variables principales de carácter objetivo (ver tabla 3.9). En consecuencia, este grupo de variables sólo puede adoptar ciertos valores concretos, que se corresponden con los números asignados previamente a cada categoría. (Ver más detalles en apartado de material y método). Por ejemplo, de la variable principal *área* se obtiene su correspondiente variable subordinada *cat tamaño*. Para ello, a cada valor de área celular (medida en μm^2) se le ha asignado un número que puede ser 0,

0,5 ó 1 según si el área medida se ha considerado, respectivamente, pequeña, mediana o grande.

| Variables principales | Definición | Variables subordinadas | Número de Categorías |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------|
| Superficie ocupada por las microproyecciones (SOM) | Tanto por ciento de la superficie celular ocupada por las microproyecciones | Cat SOM | 5 |
| Área | Área celular en μm^2 | Cat tamaño | 3 |
| Forma | Circularidad de la célula | Cat forma | 3 |
| Tono | Media del tono de gris del área celular a 500x | Cat tono | 3 |

Tabla 3.9. Variables principales de carácter objetivo y sus correspondientes variables subordinadas.

Cabe señalar que para definir las diferentes categorías de las variables subordinadas se ha empleado un criterio subjetivo (ver, de nuevo, el apartado de material y método) a pesar de que la asignación en una u otra categoría depende de un valor numérico, establecido previamente mediante una medición objetiva.

Además, aunque no sea este el caso, en la práctica clínica sería posible realizar dicha asignación basándose, sólo, en la observación de las células epiteliales. Dicho de otro modo, se podría establecer mediante una comparación visual si una célula es pequeña, mediana o grande (utilizando el ejemplo anteriormente expuesto) sin necesidad de medir su área.

En aras de mejorar la discriminación clínica entre un epitelio sano y uno que inicia su degradación será importante comprobar si las variables subordinadas son fieles, en esencia, a la información que se trasluce de sus correspondientes variables principales y si, además, son capaces de predecir el tiempo de apertura al que ha sido sometido un epitelio. Si el resultado es

afirmativo se podrá considerar que las variables subordinadas son una buena herramienta clínica para valorar el estado del epitelio corneal en condiciones de excesiva evaporación.

Existe otro aspecto importante que es necesario comentar antes de iniciar la descripción de los resultados. Las variables principales *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* y *área* se sometieron, inicialmente, a una transformación logarítmica para adecuar su escalado y mejorar, así, los resultados del análisis estadístico. Sin embargo, se ha comprobado que las nuevas variables transformadas no mejoran de forma determinante los resultados por lo que, finalmente, no se han empleado.

3.2.1. Células control

Para establecer las características morfológicas diferenciales de las células superficiales de la córnea, se ha examinado las células control. Ello nos permitirá, a posteriori, describir los cambios que sufren dichas células cuando son sometidas a diferentes tiempos de apertura palpebral (TAP).

Con este fin, se ha analizado, primero, los estadísticos descriptivos de las variables principales y subordinadas, estableciendo, también, las posibles relaciones entre ellas. Además, se ha valorado la capacidad de las variables subordinadas para mostrar una información análoga a la que presentan las variables principales de origen.

Seguidamente, agrupando los datos según el tamaño celular, se ha establecido tres tipos morfológicos celulares (células pequeñas, medianas y grandes). Después, se ha calculado los estadísticos descriptivos de las variables principales, comparando la tendencia central de las mismas, entre los diferentes tamaños celulares. Estos análisis han permitido describir las características de las tres subpoblaciones y las posibles diferencias entre ellas, alcanzando, así, el objetivo propuesto.

Estudio de los estadísticos descriptivos de las variables en las células control

En base a los estadísticos descriptivos la población de células control presenta algunas características morfológicas extremadamente variables mientras que otras son, desde un punto de vista relativo, mucho más uniformes. (En la tabla 3.10 aparecen los estadísticos descriptivos de todas las variables estudiadas)

| VARIABLES | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. var. (%) |
|--------------------------|-----|--------|---------|--------|------------|----------------|
| SOM (%) | 232 | 16.71 | 63.42 | 48.35 | 7.25 | 15.00 |
| Cat SOM | 232 | 0.20 | 1.00 | 0.85 | 0.18 | 20.96 |
| Área (μm^2) | 232 | 4.97 | 1285.83 | 355.73 | 288.56 | 81.12 |
| Cat tamaño | 232 | 0.00 | 1.00 | 0.41 | 0.39 | 97.32 |
| Forma | 232 | 0.26 | 0.97 | 0.68 | 0.17 | 24.43 |
| Cat forma | 232 | 0.00 | 1.00 | 0.18 | 0.31 | 177.59 |
| Tono | 232 | 12.45 | 182.32 | 118.48 | 22.67 | 19.13 |
| Cat tono | 232 | 0.00 | 1.00 | 0.48 | 0.11 | 23.39 |
| Holes | 232 | 0 | 1 | 0.38 | 0.49 | |
| Uniones intercel | 232 | 0.5 | 1 | 0.94 | 0.11 | 11.37 |

Tabla 3.10. Descriptivos básicos de las células control. Media, desviación típica, máximo, mínimo y coeficiente de variación muestral SOM: superficie ocupada por microproyecciones. N: número de individuos de la muestra.

Analizando los resultados observamos que las medias de las diferentes variables muestran dos tipos de comportamiento. Por un lado aparecen variables principales como *área*, *tono* y *forma* que presentan una media centrada en el rango de los datos y un alto coeficiente de variación. Por otro lado, las variables *SOM* y *uniones intercelulares* poseen medias cercanas al valor máximo y coeficientes de variación relativamente bajos.

De todo ello se puede deducir que en el epitelio sano existe una elevada variabilidad de formas y tamaños. Además, la inmensa mayoría de las uniones intercelulares están intactas y las células poseen, en general, una elevada

densidad de microproyecciones, como era de esperar en un epitelio control. En la figura 3.31, a modo de ilustración, se presentan los gráficos de cajas de dos variables principales de carácter objetivo. En ellos puede apreciarse su diferente comportamiento.

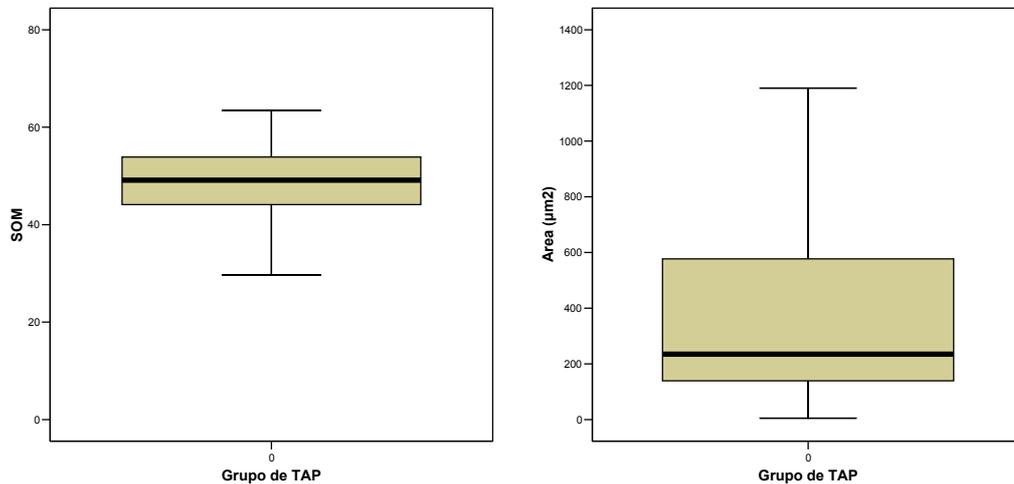


Figura 3.31. Gráficos de caja que ilustran el comportamiento de las variables *SOM* (superficie ocupada por microproyecciones) y *área* en la muestra de células control. La línea negra dentro de la caja señala la mediana.

En la figura 3.31, la variable *superficie ocupada por microproyecciones* presenta una mediana centrada en un rango de datos estrecho, rango que está distribuido en la zona de los valores altos de la escala. En el otro extremo se halla la variable *área*, cuya mediana está muy descentrada dentro de un amplísimo rango de datos, por lo que la distribución es claramente asimétrica.

La variable *holes*, merece un comentario específico. Esta es una variable binaria (presencia o ausencia de cráteres) que aparece centrada en el rango de los datos (probabilidad estimada de que una célula no tenga *holes* = 0,38). Por lo tanto, presenta una elevada dispersión y no existe una tendencia clara hacia la falta o existencia de dichas estructuras.

Por otra parte, cada variable subordinada se comporta de manera análoga a su variable principal correspondiente. De este modo, si una variable principal

muestra una media centrada en el rango de datos y una desviación típica relativamente alta, su variable subordinada también presentará estas características. Siempre, el coeficiente de dispersión será mayor en una variable subordinada ya que en este tipo de variables los datos representan categorías.

Estudio de las relaciones entre variables en las células control

Para establecer la existencia de posibles relaciones lineales entre las variables estudiadas, se ha realizado un análisis de la correlación. Los resultados del mismo quedan reflejados en la tablas 3.11; 3.12 y 3.13.

En la tabla 3.11 puede verse la interdependencia existente entre todas las variables principales, con la única excepción de la variable *uniones intercelulares*, que no aparece correlacionada con ninguna otra.

| Variables | SOM | Área | Forma | Tono | Uniones Intercelulares |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-------|------------------------|
| SOM | 1 | | | | |
| Área | - 0,289** | 1 | | | |
| Forma | - 0,139* | 0,616** | 1 | | |
| Tono | 0,359** | - 0,326** | - 0,252** | 1 | |
| Uniones Intercel | ----- | ----- | ----- | ----- | 1 |

Tabla 3.11. Correlaciones bivariadas entre variables principales de las células control. **Nivel de significación de 0,01; *Nivel de significación de 0,05. SOM: superficie ocupada por microproyecciones. ----- Valores no significativos.

En general, los coeficientes de correlación entre las variables principales no poseen valores muy altos pero son significativos. El nivel de significación es de $p < 0.01$ excepto para la correlación entre *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* frente a *forma* que es de $p < 0.05$. Además, se debe notar que las correlaciones entre los pares *área / forma* y *SOM / tono* son las que presentan un valor absoluto más alto.

Respecto de las correlaciones con *área*, cabe señalar que los coeficientes con valor absoluto más alto y el signo de dichos coeficientes confirma la tendencia de las células a ser más circulares, más oscuras (valores de tono celular bajos) y con menor superficie ocupada por las microproyecciones a medida que aumentan en tamaño. (El coeficiente es de 0,616 para la correlación entre *forma* y *área*; -0.326 entre *tono* y *área* y -0,289 entre *SOM* y *área*)

Para analizar correctamente la relación entre la variable principal de carácter binario, *holes*, y el resto de variables principales es conveniente realizar un estudio estadístico con el que se puedan establecer las posibles interdependencias no lineales. Con este fin, se ha calculado, mediante una regresión logística, un modelo predictivo que pronostique la falta o la existencia de cráteres (*holes*) en base a las variables principales de las células control. Con este modelo se podría establecer si alguna, o algunas, de las características morfológicas celulares descritas tienen relación con el hecho de que una célula presente o no presente cráteres y, de este modo, avanzar en el conocimiento del origen de estas formaciones de la membrana epitelial.

Los resultados de la regresión logística de la variable *holes* contra el resto de variables principales muestran un modelo en el que las covariables no resultan significativas y se reduce a una constante. Por tanto, la presencia o no de cráteres no parece depender, claramente, de ninguna de las variables descritas.

En cuanto a las variables subordinadas se puede decir que, todas presentan una alta y significativa correlación con sus respectivas variables principales. (Ver tabla 3.12)

| Cat SOM/SOM | Cat tamaño/area | Cat forma/forma | Cat tono/tono |
|----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 0,922** | 0,898** | 0,695** | 0,552** |

Tabla 3.12. Correlaciones entre variables principales y sus correspondientes variables subordinadas. **Nivel de significación de 0,01. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

La correlación más alta aparece entre *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* y su variable subordinada, *cat SOM* (coeficiente de correlación de 0,922). En el otro extremo se encuentran las variables *tono* y *cat tono* que poseen la correlación más baja (coeficiente de correlación de 0,552).

Por su parte, los pares de variables subordinadas, en general, mantienen correlaciones algo más bajas que las halladas entre sus respectivas variables principales pero siguen siendo significativas. Por ejemplo, *cat tono/cat SOM* presenta una correlación con un coeficiente de 0,317 y una significación al nivel $p < 0,01$ mientras que el coeficiente de la correlación *tono/SOM* es de 0,359 con el mismo nivel de significación. Existen excepciones como los pares *cat tono/cat tamaño* y *cat tono/cat forma* cuya correlación es muy baja y no es estadísticamente significativa. (Ver tabla 3.13) Por lo tanto, podríamos decir que las variables subordinadas *cat tamaño* y *cat forma* no muestran relación con la variable *cat tono*, cosa que sí ocurría entre sus respectivas variables principales (ver tabla 3.11)

| | Cat SOM | Cat tamaño | Cat forma | Cat tono |
|-------------------|-----------|------------|-----------|----------|
| Cat SOM | 1 | | | |
| Cat tamaño | - 0,227** | 1 | | |
| Cat forma | - 0,147* | 0,591** | 1 | |
| Cat tono | 0.317** | ----- | ----- | 1 |

Tabla 3.13 Correlaciones entre variables subordinadas asociadas a una variable principal. **Nivel de significación de 0,01. SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

En definitiva, se podría afirmar que las categorías establecidas en las variables subordinadas mantienen, en esencia, buena parte de la información que proporcionan las variables principales (ver tabla 3.11). La única excepción es *cat tono* que presenta un comportamiento parcialmente análogo a su variable de origen.

Estudio de las células control por tamaños

Para llevar a cabo el objetivo propuesto en este subapartado y poder comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros autores (Doughty 1990a,b,c y 1991) se han agrupado las células control atendiendo a su tamaño. Así, las células superficiales del epitelio quedan incluidas en tres categorías: pequeñas, medianas y grandes (ver criterios de discriminación en el apartado de material y métodos). En la tabla 3.14 aparecen los resultados de los estadísticos descriptivos de las diferentes variables numéricas en cada uno de los tipos celulares establecidos.

Como puede observarse, a medida que aumentan en tamaño, las células control presentan una clara tendencia hacia una forma más circular, un tono más oscuro y una disminución de la superficie ocupada por las microproyecciones (tendencia que concuerda con los datos de la tabla de correlaciones) En cuanto a las uniones intercelulares, como era de esperar en un epitelio sano, todos los tipos celulares muestran valores muy altos. Es decir, las células están firmemente adheridas las unas a las otras.

Por otro lado, el coeficiente de variación muestra como las células grandes poseen menor dispersión, en el área y la forma, que las células medianas o pequeñas. Sin embargo, para el resto de variables las células de mayor tamaño poseen mayores coeficientes de variación; con lo que *SOM*, *tono* y *uniones intercelulares* presentan valores más dispersos en las células grandes que en los otros dos tamaños definidos. En las figuras que preceden a la tabla 3.14 (figuras 3.32, 3.33 y 3.34) se representan en forma gráfica estos resultados agrupados por el tamaño celular.

Para determinar la existencia de posibles diferencias entre los tres grupos de células control (células pequeñas, medianas y grandes) se ha contrastado la tendencia central de las variables principales. Las variables subordinadas se retomarán, más adelante, pues, como ya se ha comentado anteriormente, se pretende comprobar su capacidad de predecir el TAP.

Para poder llevar a cabo el contraste de la tendencia central, es conveniente que exista, previamente, un análisis de la normalidad de la distribución de cada variable principal, análisis que se ha realizado con el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov. Con los resultados de dicho test se ha rechazado la normalidad en la distribución para las variables: *área*, *holes* y *uniones intercelulares*.

Seguidamente, las variables supuestamente normales (*SOM*, *forma* y *tono*) han sido sometidas a un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), tomando como factor el tamaño a los niveles pequeño, mediano y grande. Si procede (en el caso de rechazarse la hipótesis nula de igualdad de medias), se les ha aplicado el contraste de Scheffé para comparar los grupos por pares. (Ver resultados en la tabla 3.15)

Con la misma intención, las variables *holes* y *uniones intercelulares*, cuya distribución no es normal, se ha sometido al test no paramétrico de Kruskal Wallis. La variable *área* no ha sido evaluada porque se ha utilizado como factor en los análisis precedentes.

Los resultados del ANOVA establecen la existencia de diferencias significativas entre los tres grupos de tamaño celular para las tres variables con distribución normal estudiadas (tabla 3.15). Por su parte, el test de Scheffé ha determinado diferencias significativas, en lo que a *SOM* se refiere, entre las células pequeñas y las grandes ($p < 0,01$) y entre las medianas y las grandes ($p < 0,05$). Respecto a la variable *forma*, hay diferencias entre todos los pares de tamaños celulares comparados ($p < 0,01$) y, finalmente, *tono* tan sólo aparece diferente entre las células pequeñas y las grandes ($p < 0,01$). (Corroborar con figuras 3.32, 3.33, 3.34)

| | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. var (%) |
|--------------------------|----------|---------------|---------------|--------------|-------------------|----------------------|
| SOM (%) | | | | | | |
| Pequeñas | 98 | 16.71 | 63.42 | 50.13 | 6.66 | 13.29 |
| Medianas | 80 | 21.69 | 60.92 | 48.40 | 7.12 | 14.71 |
| Grandes | 54 | 22.98 | 56.36 | 45.04 | 7.46 | 16.56 |
| Área | | | | | | |
| Pequeñas | 98 | 4.97 | 190.28 | 114.86 | 52.20 | 45.45 |
| Medianas | 80 | 200.39 | 591.24 | 355.95 | 131.25 | 36.87 |
| Grandes | 54 | 604.42 | 1285.83 | 792.56 | 174.80 | 22.05 |
| Forma | | | | | | |
| Pequeñas | 98 | 0.26 | 0.89 | 0.59 | 0.14 | 24.17 |
| Medianas | 80 | 0.31 | 0.94 | 0.69 | 0.15 | 21.06 |
| Grandes | 54 | 0.52 | 0.97 | 0.83 | 0.11 | 12.60 |
| Tono | | | | | | |
| Pequeñas | 98 | 63.75 | 182.32 | 124.68 | 19.51 | 15.65 |
| Medianas | 80 | 67.65 | 179.71 | 116.30 | 20.76 | 17.85 |
| Grandes | 54 | 12.45 | 167.94 | 110.45 | 27.51 | 24.91 |
| Holes | | | | | | |
| Pequeñas | 98 | | | 0,34 | | |
| Medianas | 80 | | | 0,36 | | |
| Grandes | 54 | | | 0,50 | | |
| Uniones intercel. | | | | | | |
| Pequeñas | 98 | 0.80 | 1.00 | 0.94 | 0.09 | 9.75 |
| Medianas | 80 | 0.50 | 1.00 | 0.93 | 0.11 | 12.16 |
| Grandes | 54 | 0.50 | 1.00 | 0.93 | 0.12 | 13.00 |

TABLA 3.14. Media, desviación típica, coeficiente de variación y extremos de la muestra global agrupada por tamaños. SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

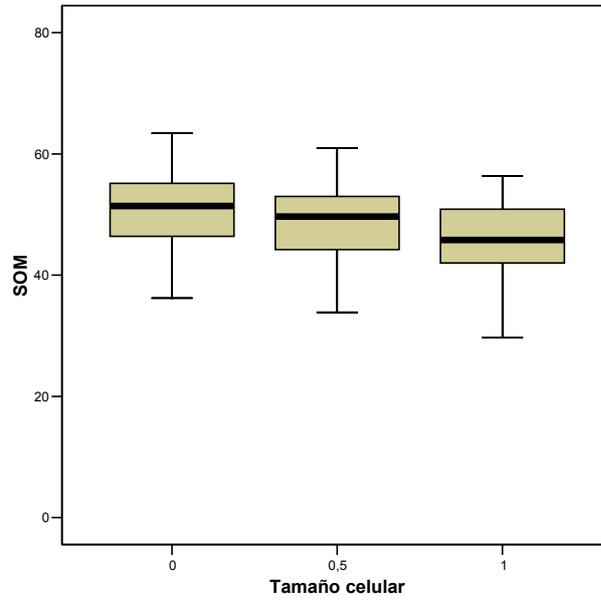


Figura 3.32. Distribución de la variable *SOM* según el tamaño celular. Los valores del tamaño celular son 0 para las células pequeñas 0,5 para las medianas y 1 para las grandes.

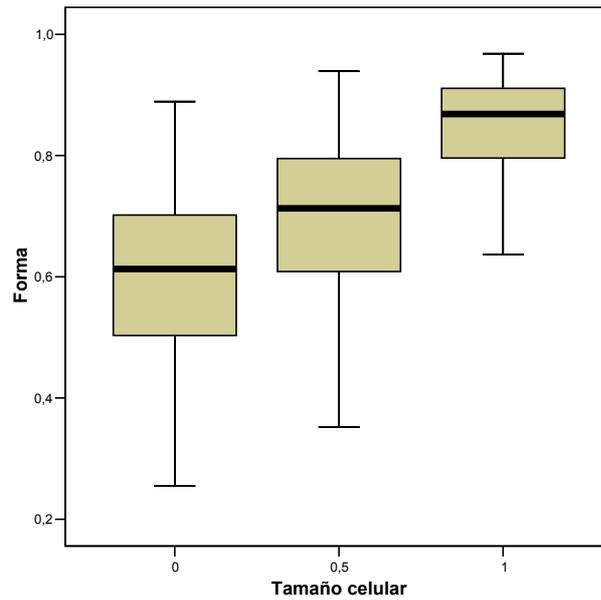


Figura 3.33. Distribución de la variable *forma* según los tamaños celulares. Los valores del tamaño celular son 0 para las células pequeñas 0,5 para las medianas y 1 para las grandes.

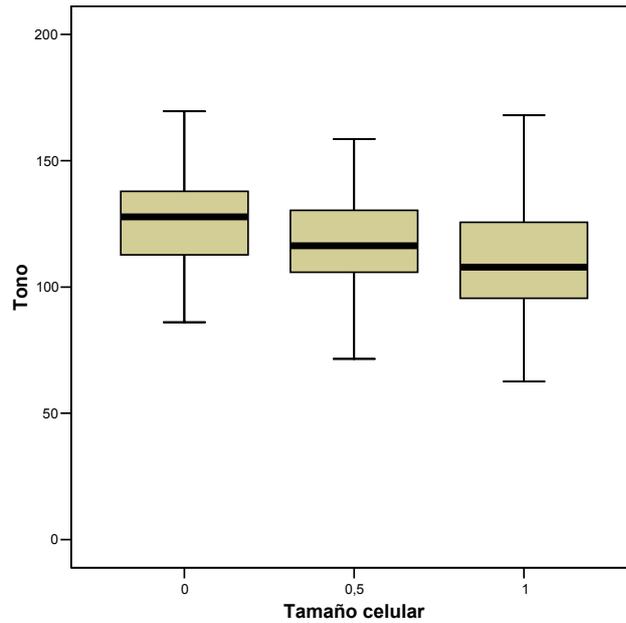


Figura 3.34. Distribución del tono según el tamaño celular. Los valores del tamaño celular son 0 para las células pequeñas 0,5 para las medianas y 1 para las grandes.

En cuanto a las variables con distribución no normal, el contraste no paramétrico de Kruskal- Wallis indica que no hay diferencias significativas ni en la variable *uniones intercelulares* ni en la variable *holes* de los tres grupos de tamaño.

| Variables | ANOVA | | Comparación intergrupos (Test de Scheffé) | | |
|-----------|--------|-------|--|---------|---------|
| | F | P | P/M | P/G | M/G |
| SOM | 8,194 | 0,000 | ----- | 0,000** | 0,047* |
| Forma | 53,425 | 0,000 | 0,000** | 0,000** | 0,000** |
| Tono | 7,980 | 0,000 | ----- | 0,001** | ----- |

Tabla 3.15. Resultados del análisis de la varianza (ANOVA) y las comparaciones entre pares de tamaños celulares con el test de Scheffé. SOM: superficie ocupada por microproyecciones P: pequeña; M: mediana, G: grande *Nivel de significación de $p < 0,05$; ** Nivel de significación de $p < 0,01$; ----- No hay diferencias significativas.

En definitiva, la tendencia central que muestran las células pequeñas se decanta hacia una superficie ocupada por las microproyecciones mayor, un tono más claro y una forma distinta de la observada en las células grandes (las células pequeñas son, en general, más poligonales mientras que las grandes tienden a ser casi circulares)

Por su parte las células medianas sólo se diferencian estadísticamente de las células pequeñas en que la media de la forma es más circular. Sin embargo, si se comparan estas mismas células medianas con las grandes las diferencias significativas aparecen no sólo en la tendencia de la forma sino también en la de la densidad de las microproyecciones (*SOM*). La figura 3.35 presenta unas gráficas ilustrativas al respecto.

En ellas también se puede observar que, en realidad, las células control de tamaño mediano se dividen siempre en dos grupos. Un primer grupo de tamaño muy parecido a las células pequeñas y un segundo de tamaño similar a las grandes. Por lo tanto, existe una zona de área intermedia en la que el número de células es muy escaso.

Según estos resultados, las células superficiales del epitelio corneal, agrupadas según el tamaño, muestran unas características morfológicas diferenciadas. Las más pequeñas son, generalmente, poligonales, de tono claro y con una elevada densidad de microproyecciones. Por su parte, las grandes suelen ser las más circulares, de tono intermedio a oscuro y poseen, además, una relativamente menor densidad de microproyecciones. Por último, las células medianas presentan características que las sitúan entre las células pequeñas y las grandes. En general, podrían clasificarse como poligonales con una cierta tendencia a la circularidad (pseudopoligonales), de tono intermedio-oscuro y densidad de microproyecciones elevada.

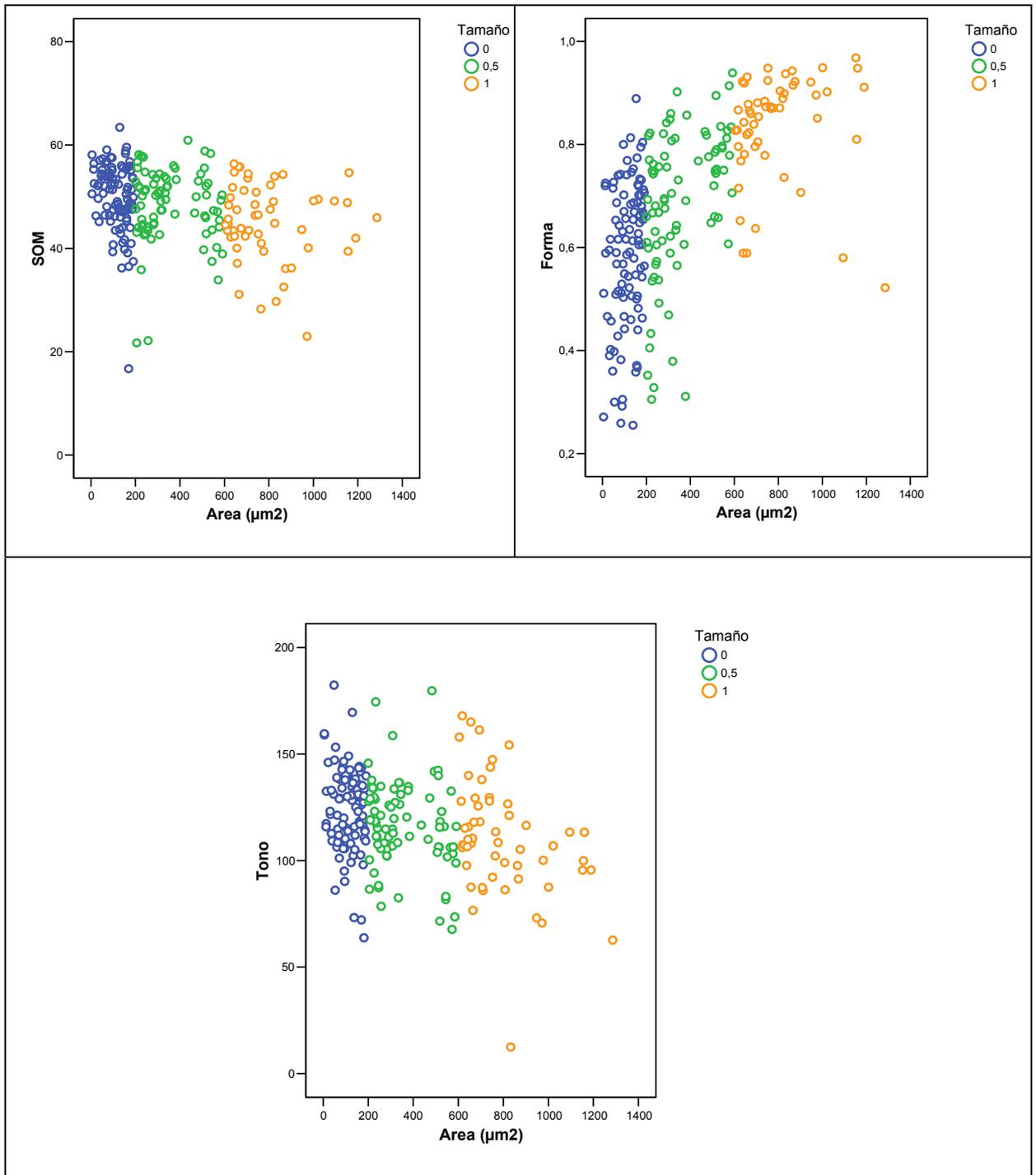


Figura 3.35. Gráficos de dispersión de las variables SOM, forma y tono frente al área de las células control

Estudio del tono celular en las células control

Con el fin de analizar el origen de los diferentes tonos celulares observados en un epitelio sano bajo microscopía electrónica, se ha realizado un estudio específico en las células control en el que se incluyen dos nuevas variables celulares, *el tono medio de la membrana* y *el tono medio de las microproyecciones*.

En dicho estudio se ha analizado el comportamiento de estas nuevas variables y su relación con las variables anteriormente comentadas para, si es posible, esclarecer las implicaciones de cada una de ellas en la constitución del tono característico de las células. En la tabla 3.16 se exponen los estadísticos descriptivos de las tres variables tonales utilizadas en el análisis, véase, *tono*, *tono medio de las microproyecciones* y *tono medio de la membrana*.

Los valores de la variable *tono* se obtienen con el cálculo de la media de tono de gris de los píxeles circunscritos en el área de la imagen celular a 500x. Por su parte, el *tono medio de las microproyecciones* (*tono medio_{mcp}*) es el resultado de promediar el tono de aquellos píxeles que se ha considerado como “objetos” en el proceso de binarización de un área celular a 5000x. En cuanto al *tono medio de la membrana* (*tono medio_{mb}*), representa la media del tono de gris de los píxeles del área celular a 5000x que se han considerado integrantes del fondo de dicha imagen en el proceso de binarización. (Ver más detalles sobre el proceso de binarización en el capítulo de material y métodos)

Analizando los resultados expuestos en la tabla 3.16 se puede observar que la media de la variable *tono medio_{mcp}* disminuye y la dispersión de los valores aumenta a medida que aumenta el tamaño de las células. De modo que, podría afirmarse que las microproyecciones de las células pequeñas presentan una media de tono más alta y más uniforme que el resto mientras que las células grandes poseen microproyecciones con tendencia a presentar una media de tonos más oscuros y más dispares entre si.

| Muestra | Variables | Mínimo | Máximo | Media | Des. tip. | Coef. var. |
|----------------|---------------------------|---------------|---------------|--------------|------------------|-------------------|
| T(233) | Tono | 12.45 | 182.32 | 118.44 | 22.63 | 19.10 |
| | Tono medio _{mcp} | 97.56 | 214.76 | 165.65 | 25.03 | 15.11 |
| | Tono medio _{mb} | 28.81 | 104.11 | 53.40 | 11.28 | 21.13 |
| P(98) | Tono | 63.75 | 182.32 | 124.68 | 19.51 | 15.65 |
| | Tono medio _{mcp} | 122.59 | 214.76 | 176.81 | 21.55 | 12.19 |
| | Tono medio _{mb} | 32.25 | 94.89 | 54.73 | 10.88 | 19.88 |
| M(80) | Tono | 67.65 | 179.71 | 116.31 | 20.76 | 17.85 |
| | Tono medio _{mcp} | 108.20 | 202.05 | 161.96 | 22.69 | 14.01 |
| | Tono medio _{mb} | 38.10 | 104.11 | 52.83 | 11.76 | 22.27 |
| G(55) | Tono | 12.45 | 167.94 | 110.43 | 27.25 | 24.68 |
| | Tono medio _{mcp} | 97.56 | 197.16 | 151.15 | 25.39 | 16.80 |
| | Tono medio _{mb} | 28.81 | 87.35 | 51.87 | 11.22 | 21.63 |

Tabla 3.16. Estadísticos descriptivos de las variables *tono*, *tono medio de las microproyecciones* y *tono medio de la membrana* en la muestra de células control y en todas las células agrupadas según el tamaño celular. T (número total de células control); P (número de células control pequeñas); M (número de células control medianas); G (número de células control grandes). Des. tip.: desviación típica de la muestra. Coef. var.: coeficiente de variación de la muestra. Tono: tono medio de una célula a 500x. Tono medio_{mcp}: media del tono de las microproyecciones. Tono medio_{mb}: media del tono de la membrana celular.

Por lo que respecta a la variable *tono medio_{mb}* no parece sufrir muchos cambios si se comparan los valores medios de los diferentes grupos de tamaño celular. Las desviaciones típicas son también muy parecidas. Es decir, que el tono medio de la membrana parece estar poco influido por el tamaño celular.

En la figura 3.36 aparecen las gráficas de dispersión de las variables tonales frente al área. En ellas puede observarse como la variable *tono* presenta un comportamiento muy parecido a la variable *tono medio_{mcp}*. Por su parte, la

variable $\text{tono}_{\text{medio}_{\text{mb}}}$ muestra una variabilidad menor que se mantiene relativamente constante para todos los tamaños.

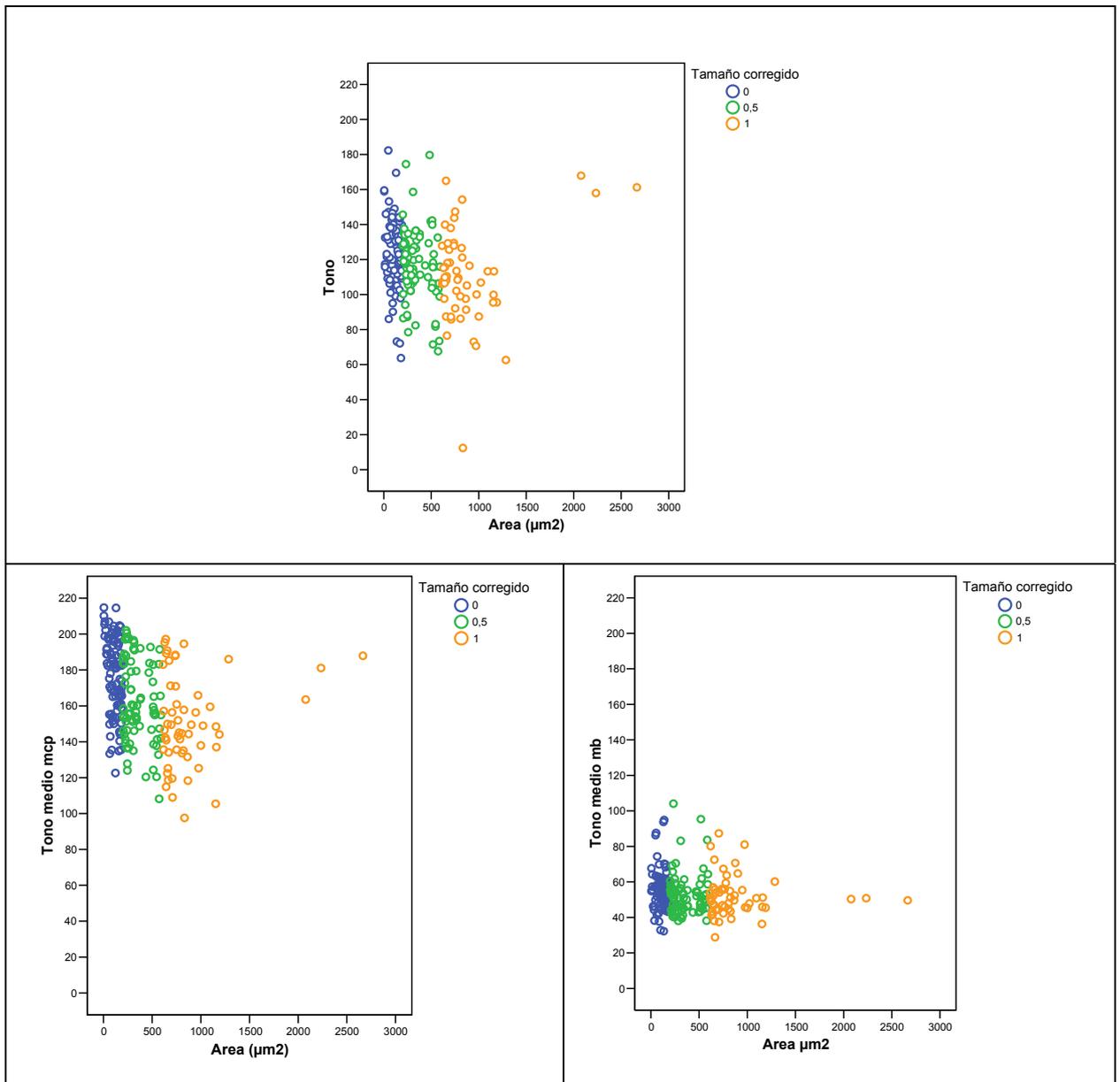


Figura 3.36. Dispersión de las variables tonales frente al área en la muestra de células control.

De los resultados del estudio de la variable *tono* se establece que el tono medio de una célula tiende a ser más bajo (oscuro) y más disperso a medida que el tamaño celular aumenta (como ya se comentó anteriormente). Por lo tanto, parece plausible pensar que un factor desencadenante de los cambios observados en el tono celular podría ser el tono medio de las

microproyecciones ya que las dos variables presentan comportamientos análogos (ver figura 3.36). La tendencia del *tono medio_{mb}* a no sufrir grandes alteraciones da pie a pensar que dicha variable no interviene, de forma determinante, en los cambios de tono entre células control.

Para esclarecer las posibles relaciones entre variables se ha realizado un análisis de sus correlaciones, incluyendo en dicho análisis a todas las variables principales. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 3.17.

| | Tono | Tono medio _{mcp} | SOM | Area | Forma | Uniones celulares |
|---------------------------|---------|---------------------------|---------|----------|----------|-------------------|
| Tono | 1 | 0,598** | 0,359** | -0,144* | -0,256** | ----- |
| Tono medio _{mcp} | 0,598** | 1 | ----- | -0,318** | -0,398** | ----- |
| Tono medio _{mb} | ----- | 0,181** | ----- | ----- | -0,129* | ----- |

Tabla 3.17. Correlaciones entre las variables tonales y el resto de variables principales. **La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral) *La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral) ----- No hay correlación estadísticamente significativa. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Este análisis confirma, efectivamente, que existe una clara relación entre el *tono* y el *tono medio_{mcp}* en las células control (coeficiente de correlación 0,598 con un nivel de significación de $p < 0,01$). Sin embargo, la variable *tono medio_{mb}* y la variable *tono* no están correlacionadas. Así pues, podemos afirmar que el tono medio de las microproyecciones es un factor desencadenante de las diferencias de tono entre las células del epitelio control. Contrariamente, el tono medio de la membrana no.

Continuando con el análisis de las correlaciones, cuyos resultados se exponen en la tabla 3.17, cabe señalar que existe cierta correlación entre las variables *tono medio_{mcp}* y *tono medio_{mb}*. A pesar de que el coeficiente de correlación es

muy bajo (0,181) es estadísticamente significativo (nivel de significación de $p < 0,01$) y establece una débil conexión entre el tono de la membrana y el de las microproyecciones.

Por su parte, las variables *área* y *forma* presentan correlaciones bajas pero significativas para la mayoría de las variables tonales. De entre todas ellas, la correlación más alta aparece al comparar *área* o *forma* con el *tono medio*_{mcp}. De tal modo que, se podría decir que existe cierta tendencia al oscurecimiento del tono medio de las microproyecciones a medida que el tamaño celular aumenta y se hace más circular. (El coeficiente de correlación del *área* frente al *tono medio*_{mcp} es de $-0,318$ con un nivel de significación de $p < 0,01$ y el coeficiente de correlación de la *forma* frente al *tono medio*_{mcp} es de $-0,398$ con el mismo nivel de significación) La variable *uniones intercelulares* no presentan correlaciones significativas con ninguna de las variables tonales.

La variable *holes* se ha excluido del análisis de las correlaciones ya que es una variable binaria y, como ya se comentó anteriormente, para poder establecer las relaciones no lineales entre *holes* y las variables tonales es conveniente realizar una regresión logística. Los resultados de dicho análisis (*holes* frente a las variables tonales) muestran un modelo en el que las covariables no resultan significativas y se reduce a una constante. Por tanto, la presencia o no de cráteres no parece depender, claramente, de ninguna de las variables descritas por lo que podríamos decir que no poseen ninguna relación.

La relación de la variable *SOM* (superficie ocupada por microproyecciones) con las variables tonales merece una mención especial. Esta variable mide la densidad de las microproyecciones y, en consecuencia, depende, principalmente, del número de estas estructuras por unidad de superficie celular. Su correlación con las variables tonales (ver tabla 3.17) posee, en general, coeficientes muy bajos y sin significación estadística, excepto para la correlación entre *SOM* y *tono* (coeficiente de correlación 0,359 y nivel de significación de $p < 0,01$).

Parece lógico que la variable que estima la densidad de las microproyecciones (*SOM*) no tenga relación con el *tono medio de la membrana* pues estas variables miden las características morfológicas de dos estructuras celulares diferentes. Sin embargo, la falta de correlación entre *SOM* y el *tono medio de las microproyecciones* es menos evidente. Se ha de tener en cuenta que las dos variables miden rasgos morfológicos propios de las microproyecciones que pueden o no estar relacionados. Los resultados de las correlaciones indican que no existe relación lineal entre ellas. De modo que, una célula puede poseer un número elevado o escaso de microproyecciones y ello no influirá en el tono medio de dichas prominencias. En un epitelio control casi todas las células poseen una *SOM* alta (como se ha podido constatar en estos resultados) aunque algunas pueden presentar microproyecciones de un tono medio más alto y otras más bajo, según su orientación o el material que las constituye.

Además, en una célula con elevada densidad de microproyecciones (*SOM* alta) la variable *tono* no será nunca demasiado baja, sea cual sea la orientación de dichas prominencias. De hecho, incluso en el caso más desfavorable en el que la célula tenga pocas microproyecciones erectas la elevada densidad de las mismas llevaría al tono celular hacia valores medios o altos.

Para comprender esta afirmación es preciso recordar aquí que el tono de una estructura celular observada con microscopía electrónica depende, entre otros factores, de las características del material constituyente y de la altura a la que dicha estructura se encuentra, altura referida (en este caso) respecto a la superficie celular. Por lo tanto, cuanto más erecta es una microproyección más clara es su tonalidad. Sin embargo, aún estando casi horizontal el tono de la microproyección siempre será más claro que el tono de la membrana de la que sobresale.

En definitiva, el tono de las microproyecciones a 5000x, y por lo tanto su disposición espacial, no parece depender, en el caso de las células control, de

la mayor o menor densidad de estas prominencias de la membrana. Por otro lado, el tono celular a 500x parece estar condicionado tanto por el tono medio de las microproyecciones como por la densidad de las mismas.

3.2.2. Células en función del tiempo de apertura palpebral (TAP)

Para establecer los cambios morfológicos que sufren las células más superficiales del epitelio corneal se ha analizado los valores obtenidos para las diferentes variables celulares en cada uno de los tiempos de apertura palpebral, comparándolos con los obtenidos en las córneas control.

Con esta intención, se ha estudiado los estadísticos descriptivos de las variables principales y subordinadas, estableciendo, también, las posibles relaciones entre ellas. Además, para determinar las diferencias según el TAP se ha comparado la tendencia central de las variables principales.

Por otro lado, se han agrupado los datos según el tamaño celular (células pequeñas, medianas y grandes), como ya se hizo, anteriormente, para las células control. En cada uno de estos grupos se ha calculado, de nuevo, los estadísticos descriptivos de las variables principales y se ha comparado la tendencia central de dichas variables entre las células pequeñas, medianas y grandes. Estos análisis han permitido describir los cambios que el tiempo de apertura palpebral desencadena en las tres subpoblaciones celulares.

Una vez conseguida la caracterización morfológica de los cambios celulares se ha calculado un modelo estadístico que pronostica el tiempo de apertura palpebral en base a los datos morfológicos de una célula. Este nuevo análisis se ha llevado a cabo con la intención de establecer que características morfológicas, de entre todas las descritas, son esenciales para definir los cambios acontecidos en cada TAP.

Dicho de otro modo, con este modelo predictivo se podrá determinar que aspectos morfológicos deben tenerse en cuenta a la hora de establecer el

grado de afectación de un epitelio corneal sometido a una evaporación de lágrima excesiva.

Estudio de los estadísticos descriptivos de las variables celulares en función del TAP

En la muestra de células sometidas a diferentes tiempos de apertura palpebral se puede observar, en base a los estadísticos descriptivos de las variables principales (ver tabla 3.18), como a medida que aumenta el tiempo de apertura la media de las *uniones intercelulares* desciende de forma clara. Los valores de las variables *superficie ocupada por las microproyecciones (SOM)* y *tono* también descienden respecto del control. La variable *SOM* presenta, no obstante, cierta recuperación en el TAP 4 y *tono* aumenta ligeramente desde el TAP 3. En cuanto a *Área* y *forma*, muestran un comportamiento diferente pues inician un ligero aumento en los primeros TAP y luego parecen estabilizarse.

La dispersión de los datos aumenta claramente en la variable *uniones intercelulares* y en *SOM* a medida que el TAP aumenta, tal y como se puede observar en el coeficiente de variación. En las *uniones intercelulares* el aumento es progresivo mientras que en *SOM* la dispersión aumenta de forma brusca en el TAP 2 y se mantiene elevada, mostrando sólo ligeros cambios, en el resto de TAP.

Por su parte, *área* y *forma* mantienen una dispersión por debajo de la observada en las células control mientras que los valores del *tono* son menos dispersos a medida que el TAP aumenta.

En cuanto al comportamiento de la variable *holes*, es quizás el más errático pues, según estos resultados, no sigue un patrón definido.

| Variables | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. var. |
|--------------------------|----------|---------------|---------------|--------------|-------------------|-------------------|
| SOM | | | | | | |
| TAP 0 | 232 | 16.71 | 63.42 | 48.29 | 7.30 | 15.12 |
| TAP 1 | 168 | 0.24 | 64.04 | 47.77 | 12.82 | 26.84 |
| TAP 2 | 191 | 0.27 | 69.60 | 34.12 | 16.74 | 49.06 |
| TAP 3 | 205 | 0.37 | 59.76 | 30.25 | 17.67 | 58.41 |
| TAP 4 | 191 | 0.23 | 61.73 | 36.16 | 19.95 | 55.17 |
| Area | | | | | | |
| TAP 0 | 232 | 4.97 | 1285.83 | 357.58 | 289.31 | 80.91 |
| TAP 1 | 168 | 5.52 | 1136.75 | 422.43 | 270.00 | 63.92 |
| TAP 2 | 191 | 25.01 | 1213.37 | 505.48 | 273.93 | 54.19 |
| TAP 3 | 205 | 31.69 | 1228.33 | 492.34 | 300.78 | 61.09 |
| TAP 4 | 191 | 21.64 | 1995.99 | 497.66 | 338.10 | 67.94 |
| Forma | | | | | | |
| TAP 0 | 232 | 0.26 | 0.97 | 0.68 | 0.17 | 25.00 |
| TAP 1 | 168 | 0.20 | 0.94 | 0.70 | 0.17 | 24.29 |
| TAP 2 | 191 | 0.22 | 0.96 | 0.75 | 0.15 | 20.00 |
| TAP 3 | 205 | 0.22 | 0.96 | 0.74 | 0.16 | 21.62 |
| TAP 4 | 191 | 0.23 | 0.95 | 0.71 | 0.17 | 23.94 |
| Tono | | | | | | |
| TAP 0 | 232 | 12.45 | 182.32 | 118.44 | 22.63 | 19.11 |
| TAP 1 | 168 | 43.50 | 160.33 | 104.26 | 20.10 | 19.28 |
| TAP 2 | 191 | 59.88 | 176.11 | 109.14 | 20.38 | 18.67 |
| TAP 3 | 205 | 56.34 | 178.89 | 104.88 | 18.95 | 18.07 |
| TAP 4 | 191 | 64.78 | 156.75 | 112.66 | 16.24 | 14.42 |
| Holes | | | | | | |
| TAP 0 | 232 | | | 0,38 | | |
| TAP 1 | 168 | | | 0,60 | | |
| TAP 2 | 191 | | | 0,37 | | |
| TAP 3 | 205 | | | 0,55 | | |
| TAP 4 | 191 | | | 0,42 | | |
| Uniones intercel. | | | | | | |
| TAP 0 | 232 | 0.5 | 1.0 | 0.94 | 0.11 | 11.70 |
| TAP 1 | 168 | 0.2 | 1.0 | 0.91 | 0.19 | 20.88 |
| TAP 2 | 191 | 0.0 | 1.0 | 0.78 | 0.30 | 38.46 |
| TAP 3 | 205 | 0.0 | 1.0 | 0.80 | 0.28 | 35.00 |
| TAP 4 | 191 | 0.0 | 1.0 | 0.64 | 0.35 | 54.69 |

Tabla 3.18. Media, desviación típica, coeficiente de variación y rango de las variables principales por grupo de TAP. (SOM: superficie ocupada por microproyecciones)

Por lo tanto, a la vista de los datos se podría concluir que las características celulares que cambian, de forma más clara, con el aumento progresivo del tiempo de apertura palpebral son: las uniones intercelulares y la densidad de las microproyecciones.

En consecuencia, los epitelios sometidos a una evaporación excesiva parecen definir sus alteraciones, básicamente, en una pérdida progresiva de las uniones entre las células y en el número de microproyecciones de las mismas respecto de lo observado en los controles.

En las células de los epitelios sanos estas variables mantenían su media cercana a los valores máximos del rango de los datos. Para ilustrar estas afirmaciones se presentan los gráficos de cajas de cada una de las variables principales de carácter objetivo (figura 3.37) y los histogramas de la variable *uniones intercelulares* (figura 3.38).

Por lo que respecta al comportamiento de las variables subordinadas, es análogo al observado en las variables principales (ver tabla 3.19), tal como ya se había constatado en las células de las córneas control. De este modo, si una variable principal posee una media que desciende progresivamente y una desviación típica que aumenta a medida que lo hace el TAP, su variable subordinada también presenta estas características.

Cabe recordar, de nuevo, que las variables subordinadas se obtienen categorizando los datos de las variables principales objetivas por lo que su comportamiento paralelo frente al TAP es, en cierto modo, lógico.

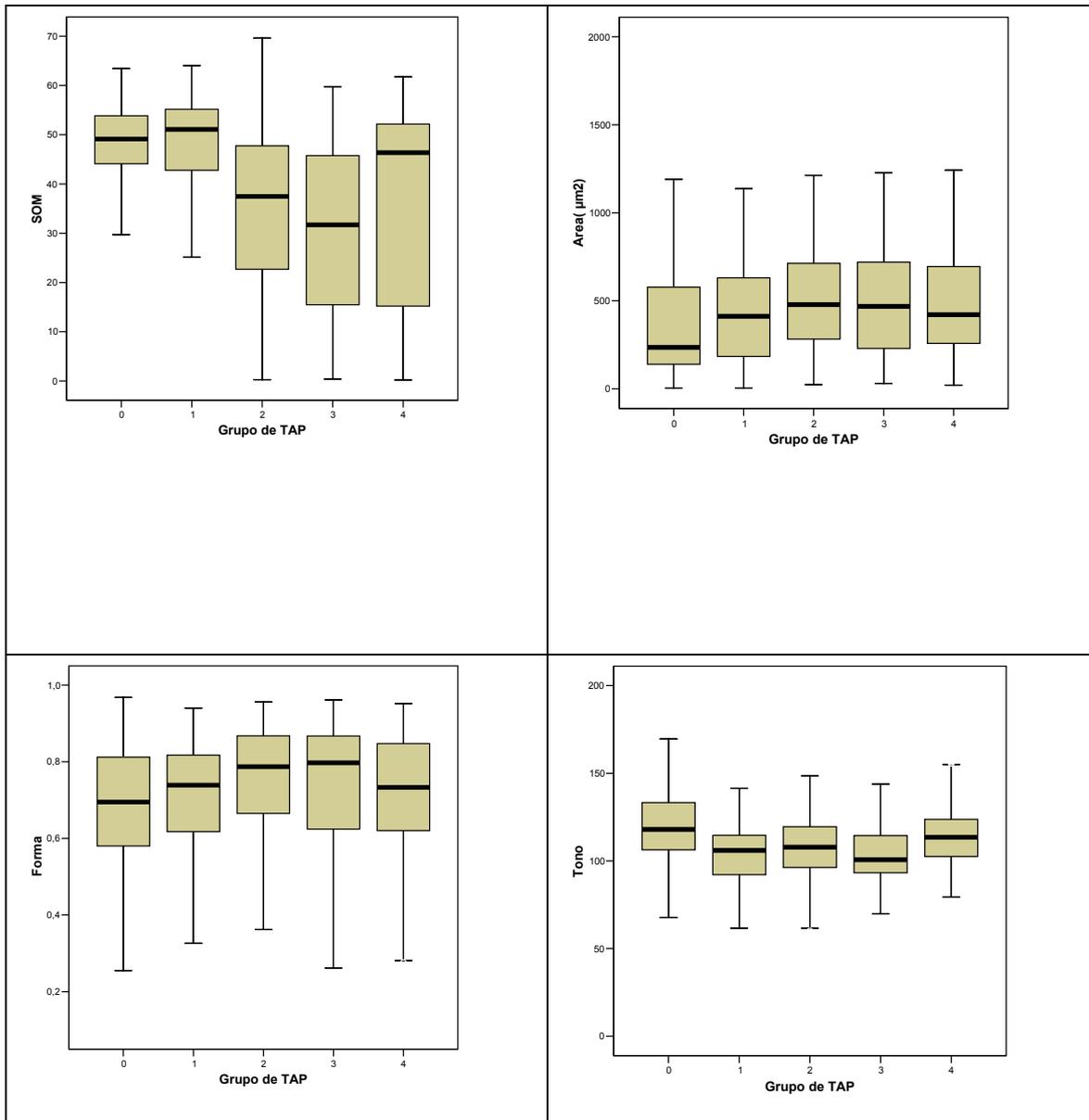


Figura 3.37. Gráficos de caja de las diferentes variables principales según el TAP

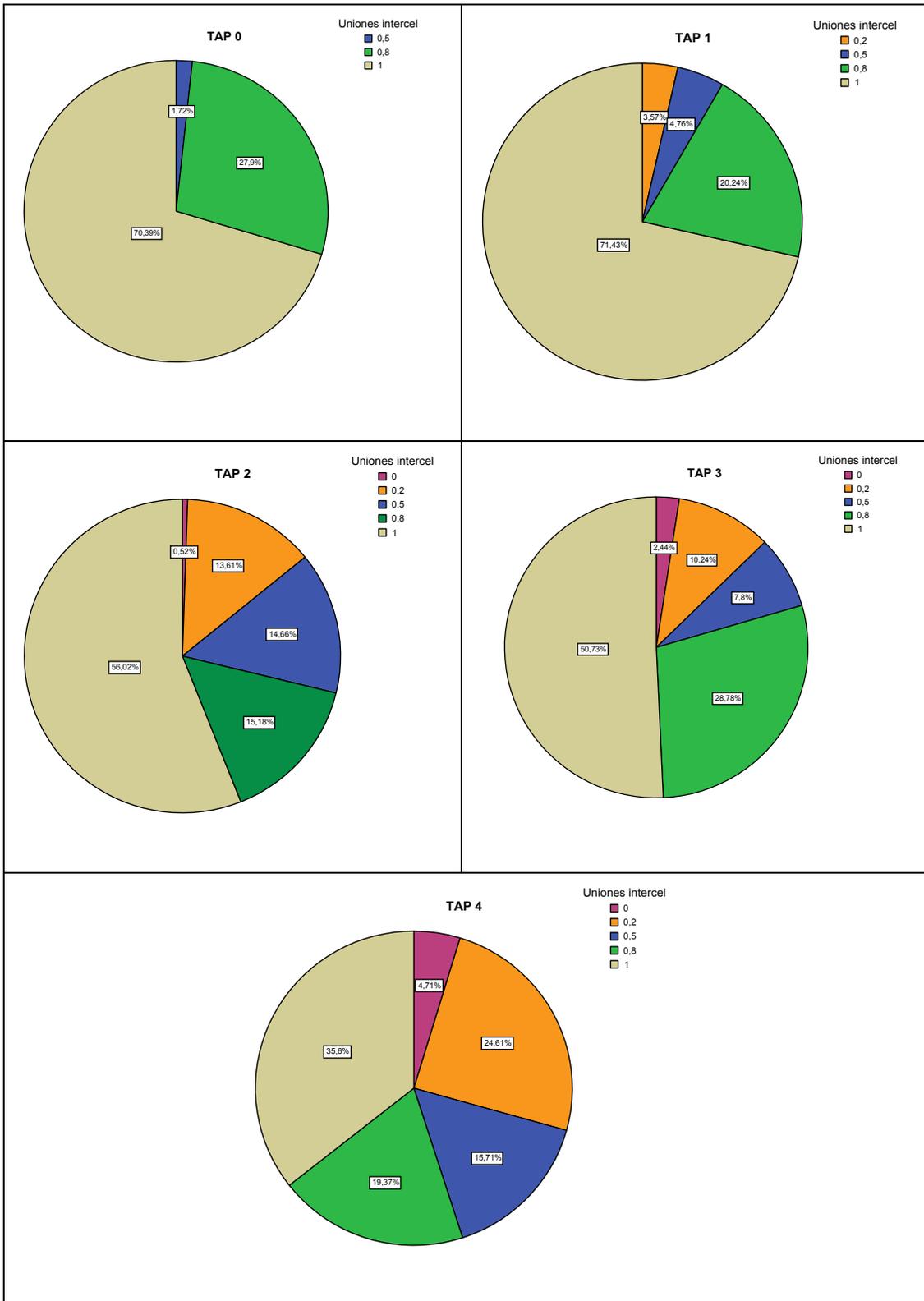


Figura 3.38. Gráficas de sectores de la variable uniones intercelulares según el TAP

| Variables | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. Var. |
|-------------------|-----|--------|--------|-------|------------|------------|
| Cat SOM | | | | | | |
| TAP 0 | 233 | 0.2 | 1 | 0.85 | 0.18 | 21.13 |
| TAP 1 | 168 | 0 | 1 | 0.83 | 0.26 | 31.74 |
| TAP 2 | 191 | 0 | 1 | 0.53 | 0.35 | 65.84 |
| TAP 3 | 205 | 0 | 1 | 0.46 | 0.36 | 77.66 |
| TAP 4 | 191 | 0 | 1 | 0.62 | 0.40 | 65.54 |
| Cat tamaño | | | | | | |
| TAP 0 | 233 | 0 | 1 | 0.41 | 0.40 | 96.97 |
| TAP 1 | 168 | 0 | 1 | 0.50 | 0.38 | 75.02 |
| TAP 2 | 191 | 0 | 1 | 0.61 | 0.34 | 55.33 |
| TAP 3 | 205 | 0 | 1 | 0.57 | 0.37 | 63.94 |
| TAP 4 | 191 | 0 | 1 | 0.57 | 0.35 | 60.70 |
| Cat forma | | | | | | |
| TAP 0 | 233 | 0 | 1 | 0.18 | 0.32 | 176.30 |
| TAP 1 | 168 | 0 | 1 | 0.19 | 0.29 | 156.30 |
| TAP 2 | 191 | 0 | 1 | 0.29 | 0.35 | 121.25 |
| TAP 3 | 205 | 0 | 1 | 0.31 | 0.35 | 114.23 |
| TAP 4 | 191 | 0 | 1 | 0.23 | 0.32 | 141.90 |
| Cat tono | | | | | | |
| TAP 0 | 233 | 0 | 1 | 0.48 | 0.11 | 23.33 |
| TAP 1 | 168 | 0 | 0.5 | 0.46 | 0.13 | 29.05 |
| TAP 2 | 191 | 0 | 0.5 | 0.48 | 0.11 | 22.30 |
| TAP 3 | 205 | 0 | 0.5 | 0.49 | 0.08 | 17.41 |
| TAP 4 | 191 | 0 | 0.5 | 0.50 | 0.04 | 7.27 |

Tabla 3.19. Media, desviación típica, coeficiente de variación y rango de las variables subordinadas por grupo de TAP. Cat SOM: categorías de la superficie ocupada por microproyecciones

Estudio de las relaciones entre variables celulares en función del TAP

Con la idea de establecer las posibles relaciones entre las variables estudiadas y entre estas y el tiempo de apertura palpebral, se ha realizado un análisis de la correlación. Los resultados del mismo quedan reflejados en las tablas 3.20, 3.21, 3.22.

Los valores expuestos demuestran que las correlaciones se mantienen en la línea ya descrita para las células control. Como muestra la tabla 3.20, los coeficientes no son muy altos pero las variables principales están siempre correlacionadas entre ellas de forma significativa ($p < 0,01$).

Las *uniones intercelulares* siguen siendo una excepción ya que sólo se correlacionan con la *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* (nivel de significación de $p < 0,01$). En las células control las *uniones intercelulares* no presentaban correlación con ninguna de las otras variables principales.

| Variables | SOM | Area | Forma | Tono | Uniones intercelulares |
|-------------------------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------------------------------|
| SOM | 1 | | | | |
| Area | - 0,374** | 1 | | | |
| Forma | - 0,309** | 0,637** | 1 | | |
| Tono | 0,449** | - 0,452** | - 0,362** | 1 | |
| Uniones intercelulares | 0,451** | ----- | ----- | ----- | 1 |

Tabla 3.20. Correlaciones entre variables principales de todos los TAP. ** Nivel de significación de 0,01* Nivel de significación de 0,05 SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Por otro lado, para analizar la interdependencia entre la variable principal *holes*, de carácter binario y el resto de variables, que no son binarias, es conveniente establecer un método que permita determinar las posibles relaciones no lineales (como ya se ha comentado al establecer las relaciones entre variables en las células control). Para lo cual, se ha calculado, mediante una regresión logística, un modelo predictivo que pronostica la falta o la existencia de *holes* (cráteres) en base a las variables principales de las células y al grupo de TAP. Con este modelo se puede establecer si el tiempo de apertura palpebral y las alteraciones que este produce en las características morfológicas celulares tienen relación con el hecho de que una célula presente o no presente *holes*. Dicho de otro modo, si la ausencia o presencia de *holes* podría ser indicativa de alteraciones epiteliales producidas por una excesiva evaporación de lágrima.

Los resultados de la regresión logística de la variable *holes* contra el TAP y las variables principales muestran un modelo con un ajuste adecuado ($\chi^2_6 =$

153.482 con un nivel de significación de 0.000) Las variables en la ecuación son: el TAP (nivel de significación de 0.000), la *SOM* (nivel de significación de 0.000), el *tono* (nivel de significación de 0.041) y las *uniones intercelulares* (nivel de significación de 0.000). El *área* y la *forma* no son estadísticamente significativas por lo que su influencia en el modelo es despreciable ($p > 0,05$).

De estos resultados se desprende que la variable *holes* posee cierta relación con el TAP, con *SOM* y con *uniones intercelulares*. Estas, a su vez, son las variables principales que presentan un coeficiente de correlación más alto con el tiempo de apertura palpebral. (Ver más adelante en la tabla 3.23). Parece, pues, que la ausencia o presencia de cráteres podría ser un factor determinante para valorar el estado del epitelio. Sin embargo, para ser concluyentes sería necesario establecer una nueva variable que proporcionara más información, no sólo la ausencia o presencia de dichas estructuras sino, por ejemplo, el número de ellas en cada célula. Por lo tanto, serán necesarios análisis posteriores a esta tesis para poder esclarecer este punto.

En cuanto a la relación entre variables subordinadas y sus respectivas variables principales (ver tabla 3.21), también en este caso, muestran una alta y significativa correlación (nivel de significación de $p < 0,01$).

| Cat SOM/SOM | Cat tamaño/area | Cat forma/forma | Cat tono/tono |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 0,969** | 0,886** | 0,713** | 0,446** |

Tabla 3.21. Correlaciones entre variables principales y subordinadas. ** Nivel de significación de 0,01. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Al igual que sucedía en las células de las córneas control, la correlación más alta aparece entre *Cat SOM* y *SOM* y la más baja entre *Cat tono* y *tono*

Por otra parte, los pares de variables subordinadas mantienen las correlaciones halladas entre sus respectivas variables principales pero los coeficientes son algo más bajos, como ya sucedía en las células control (tabla 3.22).

| Variables | Cat SOM | Cat tamaño | Cat forma | Cat tono |
|-------------------|----------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Cat SOM | 1 | | | |
| Cat tamaño | - 0,377** | 1 | | |
| Cat forma | - 0,279** | 0,518** | 1 | |
| Cat tono | 0,160** | - 0,127** | - 0,087** | 1 |

Tabla 3.22. Correlaciones entre variables subordinadas de todos los TAP. ** Nivel de significación de 0,01 * Nivel de significación de 0,05 SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

En definitiva, se puede afirmar que en la muestra de células de los diferentes TAP todas las variables subordinadas mantienen buena parte de la información que proporcionan sus variables principales originales. En los resultados de las células control, esta afirmación era válida para todas las variables subordinadas excepto para la variable *Cat tono*, que sólo seguía a la variable *tono celular* de forma parcial.

Respecto a la relación entre las diferentes variables estudiadas y el TAP, el análisis de la correlación indica la existencia de relaciones con coeficientes no muy altos pero significativos en todos los casos (nivel de significación de $p < 0,01$ en todos los pares correlacionados menos para TAP con *cat tono* que es de $p < 0,05$) (tablas 3.23 y 3.24).

Según estas correlaciones, a medida que aumenta el tiempo de apertura disminuye el valor de *uniones intercelulares* (coeficiente de correlación negativo de $- 0,361$) y de *superficie ocupada por microproyecciones* (coeficiente de correlación de $- 0,365$). También disminuye significativamente el *tono* aunque su correlación con el TAP posee, en este caso un coeficiente muy bajo ($- 0,102$).

| | SOM | Area | Forma | Tono | Uniones intercelulares |
|-----|-----------|---------|---------|-----------|------------------------|
| TAP | - 0,365** | 0,174** | 0,092** | - 0,102** | - 0,361** |

Tabla 3.23. Correlaciones entre las variables principales y el tiempo de apertura palpebral (TAP). SOM: superficie ocupada por microproyecciones

| | Cat SOM | Cat tamaño | Cat forma | Cat tono |
|-----|-----------|------------|-----------|----------|
| TAP | - 0,347** | 0,162** | 0,096** | 0,081* |

Tabla 3.24. Correlaciones entre las variables subordinadas y el TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Por el contrario, al aumentar el TAP aumenta el *área* de las células de forma significativa ($p < 0.01$) y también lo hace la *forma* ($p < 0.01$) aunque en ambos casos el coeficiente de correlación es bajo.

La figura 3.39 ilustra los resultados de estas correlaciones. En ella aparecen las gráficas de dispersión de datos de las variables principales *SOM*, *forma* y *tono* respecto del *área* para todas las células, para las células del TAP 0 y las del TAP 4, valores de TAP extremos. Como se puede observar cada una de las variables muestra un comportamiento característico al progresar el TAP.

La *superficie ocupada por microproyecciones* tiene cierta tendencia a disminuir y a una mayor dispersión con el aumento del *área* celular (coeficiente de correlación entre *SOM* y *área* de $- 0,374$ según la tabla 3.20). Al comparar el TAP 0 con el TAP 4 se puede observar como, en general,

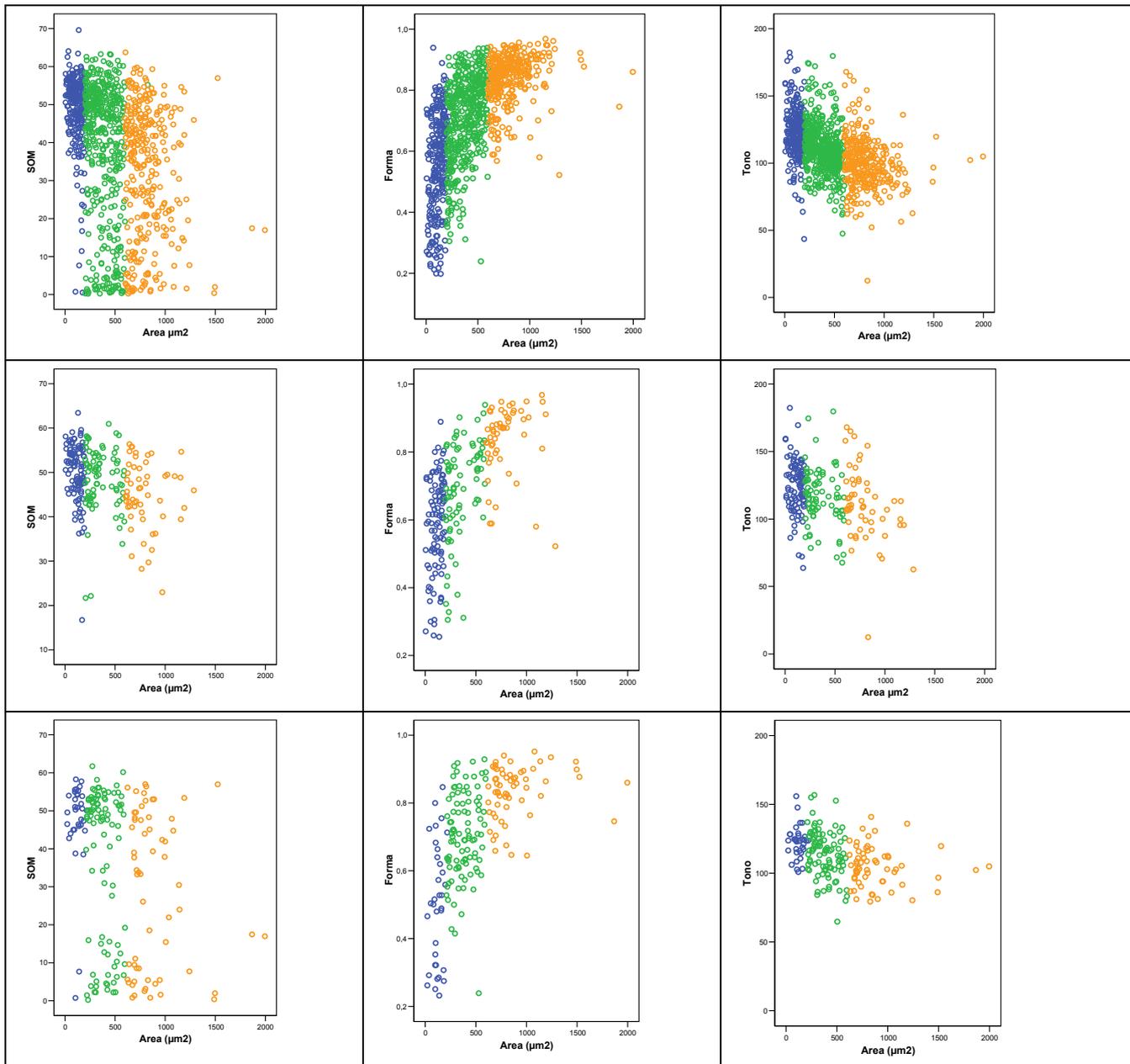


Figura 3.39. Dispersión de las variables SOM, forma y tono en función del área. En las gráficas de la primera fila aparecen las células de todos los TAP, en la segunda las células del TAP 0 y en la tercera las del TAP 4.

SOM disminuye (coeficiente de correlación entre *SOM* y TAP de -0.365 según la tabla 3.23). Cabe también señalar que en el TAP 4 parecen haberse formado dos subpoblaciones (en cuanto a *SOM*): una muy semejante al TAP 0 y otra con *SOM* muy baja. Esto podría deberse a la descamación de grandes zonas del epitelio que presentan las córnea sometidas a más de tres horas de TAP (TAP 4). En consecuencia, parte de la población celular hace tiempo que sufre en contacto directo con un medio externo seco mientras que el resto forma parte de la capa subyacente que acaba de incorporarse a la capa apical e inicia su contacto directo con las condiciones adversas del exterior.

En cuanto a los valores de *forma*, aumentan (formas más redondas) a medida que el área celular se hace mayor (coeficiente de correlación de 0,637 según la tabla 3.20). Existe una ligera tendencia hacia las formas circulares al comparar el TAP 0 con el TAP 4 (valores altos) (coeficiente de correlación entre *forma* y TAP de 0,092 según la tabla 3.23). Dicha tendencia es uniforme para todos los tamaños celulares, como señala la forma similar de las nubes de puntos en toda la columna de las gráficas de *forma* frente a *área*.

Por su parte, el tono muestra una clara disminución (se oscurece) a medida que el área celular aumenta (coeficiente de correlación de -0,452 según la tabla 3.20). Al comparar los dos TAP más extremos se observa como el tono presenta una ligera tendencia hacia valores bajos (más oscuros), en todos los tamaños celulares, a medida que el TAP aumenta (coeficiente de correlación de - 0,102 según la tabla 3.23)

Por último, la variable *área* muestra siempre cierta tendencia hacia los valores altos en las gráficas del TAP 4, tendencia que se muestra mucho más difusa en las del TAP 0 (coeficiente de correlación entre *área* y TAP de 0,174 según la tabla 3.23). Cabe señalar, también, que las células de tamaño mediano, en las tres gráficas del TAP 0, presentan unas áreas cercanas a las de las células pequeñas o a las de las células grandes. De este modo, existe una franja estrecha de áreas (centrada en el rango de datos) sin puntos. Sin embargo, en las gráficas del TAP 4 (última fila de la figura 3.39) esa zona no existe. Además

el número de células pequeñas es menor, con lo que parece que todos los subgrupos de tamaño aumentarían sus dimensiones.

En resumen, estos resultados confirman la tendencia de las medias observada en los estadísticos descriptivos, expuestos anteriormente. De este modo, las células a medida que sufren un exceso de evaporación de lágrima presentan cierta tendencia a poseer menos microproyecciones, a presentar unas uniones intercelulares más débiles, un área algo mayor, una forma más circular y un tono celular ligeramente más bajo.

Estudio de la tendencia central de las variables celulares principales en función del TAP

Para comparar la tendencia central de las variables principales según el TAP aplicado se ha llevado a cabo el mismo procedimiento estadístico utilizado en las células control. Las variables subordinadas se retomarán, más adelante, pues (como ya se ha comentado anteriormente) se pretende comprobar su capacidad para predecir el TAP.

El proceso de comparación de la tendencia central se ha iniciado con un análisis de la normalidad de la distribución de cada variable para lo cual se ha empleado el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov. Con los resultados de dicho test se ha rechazado la normalidad en la distribución de todas las variables principales excepto para *tono*.

Con los valores de dicha variable se ha realizado un análisis de la varianza. El ANOVA ha establecido la existencia de diferencias significativas (el valor de $F = 18,291$ con un nivel de significación de $p < 0,01$) entre los grupos según el TAP. Con el test de Scheffé (ver tabla 3.25) se han determinado diferencias significativas (nivel de significación de $p < 0,05$) en la variable *tono* entre el TAP cero y el resto de TAP, excepto para la comparación con el TAP 4.

Por su parte, el TAP 1 presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tono de sus células frente al TAP cero y al TAP 4. La prueba muestran, también, que

el TAP 2 sólo es significativamente diferente (nivel de significación de $p < 0,05$) del TAP cero y que el tono de las células del TAP 4 es diferente, desde un punto de vista estadístico (nivel de significación de $p < 0,05$), de las células del TAP 1 y el 3.

De ello se deduce que el tono celular no parece ser una variable que diferencie muy claramente los grupos de células según el tiempo de apertura palpebral. Los mejores resultados se obtienen comparando el TAP cero (células control) con los otros TAP pero, aún así, no se pueden diferenciar por el tono celular las células control de las sometidas a un TAP de más de tres horas (TAP 4)

| | TAP 0 | TAP 1 | TAP 2 | TAP 3 | TAP 4 |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|
| TAP 0 | | 0.000** | 0.000** | 0.000** | ----- |
| TAP 1 | 0.000** | | ----- | ----- | 0.003** |
| TAP 2 | 0.000** | ----- | | ----- | ----- |
| TAP 3 | 0.000** | ----- | ----- | | 0,005** |
| TAP 4 | ----- | 0.003** | ----- | 0,005** | |

Tabla 3.25. Resultados de la comparación del tono celular entre grupos de diferente tiempo de apertura palpebral con el test de Scheffé. ** Nivel de significación de $p < 0,01$; * Nivel de significación de $p < 0,05$; ----- No hay diferencias significativas.

El resto de las variables (*SOM, área, forma, holes y uniones intercelulares*), cuya distribución no es normal, han sido sometidas al test de Kruskal-Wallis. Los resultados de dicho test indican que hay diferencias en las tendencias centrales de todas las variables según el TAP. Las comparaciones de pares de grupos realizadas mediante el test de U-Mann-Whitney (ver tabla 3.26) muestran que todos los grupos poseen diferencias significativas en la tendencia central de una u otra variable.

| Grupos | SOM | Area | Forma | Holes | Uniones intercelulares |
|-------------|---------|---------|---------|---------|------------------------|
| TAP0/TAP 1 | ----- | 0,007** | ----- | 0,000** | ----- |
| TAP 0/TAP 2 | 0,000** | 0,000** | 0,000** | ----- | 0,000** |
| TAP 0/TAP 3 | 0,000** | 0,000** | 0,000** | 0,000** | 0,000** |
| TAP 0/TAP 4 | 0,000** | 0,000** | 0,046* | ----- | 0,000** |
| TAP 1/TAP 2 | 0,000** | 0,005** | 0,002** | 0,000** | 0,000** |
| TAP 1/TAP 3 | 0,000** | 0,029* | 0,002** | ----- | 0,000** |
| TAP 1/TAP 4 | 0,000** | ----- | ----- | 0,001** | 0,000** |
| TAP 2/TAP 3 | 0,037* | ----- | ----- | 0,000** | ----- |
| TAP 2/TAP 4 | 0,019* | ----- | 0,021* | ----- | 0,000** |
| TAP 3/TAP 4 | 0,000** | ----- | 0,031* | 0,009** | 0,000** |

Tabla 3.26. Resultados de las comparaciones de las variables no normales entre los grupos de TAP según el contraste de U-Mann-Whitney. ----- No hay diferencias significativas. **Nivel de significación de 0,01. *Nivel de significación de 0,05. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

En las comparaciones frente al control, las diferencias aparecen siempre muy significativas (nivel de significación de $p < 0,001$) para las variables *SOM* y *uniones intercelulares*, excepto para la comparación con el TAP 1. En general, los grupos con mayor número de variables cuya tendencia central es significativamente diferente de la observada en las células control son, como era de esperar, los que han sufrido un tiempo de apertura más prolongado, véase, TAP 2, 3 y 4.

En las comparaciones por pares de TAP que no incluyen al grupo control, las *uniones intercelulares* y la *SOM* siguen siendo las variables con más capacidad discriminante de los tiempos de apertura palpebral seguidas de *área* y *forma*, aunque el *área* parece variar menos si se comparan los TAP más altos entre sí. Según estos resultados, los grupos de TAP más parecidos serían el TAP2 y el TAP 3 (sólo poseen diferencias significativas en *SOM* y en *holes*) y los TAP 0 y 1 (cuyas diferencias aparecen solamente en *área* y *holes*).

Cabe resaltar que, la variable *holes* no muestra un comportamiento regular para los diferentes pares de TAP estudiados. Este comportamiento tan errático podría ser debido al carácter binario de la información que presenta dicha variable.

Estudio de las células atendiendo al tamaño y al TAP

Con el fin de poder analizar los cambios que la falta de parpadeo produce en los tres tipos celulares (células pequeñas, medianas y grandes) descritos anteriormente en las córneas control, se han reagrupado los datos de cada TAP atendiendo al tamaño celular y se han calculado los estadísticos descriptivos para cada grupo en cada tiempo de apertura. En las tablas 3.27, 3.28 y 3.29 se exponen los resultados obtenidos.

En los tres grupos de tamaño estudiados (como aparece en dichas tablas), la media de las *uniones intercelulares* tiende a disminuir progresivamente a medida que el TAP aumenta mientras que la dispersión aumenta. Esta tendencia de la media y la dispersión se magnifica al llegar al TAP 4 (tiempo de apertura palpebral mayor de 3h) en todos los grupos de tamaño.

En cuanto a la *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)*, también se observa, en todos los tamaños, una clara tendencia a la disminución del valor medio y una mayor dispersión a medida que el TAP aumenta. El aumento de la dispersión es especialmente marcado entre las células medianas y sobre todo entre las grandes. Ello sugiere la posibilidad de que existan grandes diferencias en la *superficie ocupada por microproyecciones* de células de diferentes tamaños, a partir del TAP 2. En estos casos, las células medianas y grandes pueden presentar valores de *SOM* muchísimo más bajos que los de las células pequeñas, hecho que no ocurre entre las células control donde las diferencias entre tamaños son mucho más pequeñas.

| Células pequeñas | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef var |
|--------------------------|----------|---------------|---------------|--------------|-------------------|-----------------|
| SOM | | | | | | |
| TAP 0 | 98 | 16.71 | 63.42 | 50.13 | 6.66 | 13.29 |
| TAP 1 | 47 | 32.11 | 64.04 | 53.30 | 5.89 | 11.05 |
| TAP 2 | 27 | 23.26 | 69.60 | 47.20 | 10.13 | 21.46 |
| TAP 3 | 42 | 0.54 | 58.97 | 43.60 | 12.24 | 28.08 |
| TAP 4 | 34 | 0.75 | 58.27 | 47.20 | 12.07 | 25.57 |
| Area | | | | | | |
| TAP 0 | 98 | 4.97 | 190.28 | 114.86 | 52.20 | 45.45 |
| TAP 1 | 47 | 5.52 | 197.94 | 105.38 | 58.57 | 55.58 |
| TAP 2 | 27 | 25.01 | 199.35 | 125.79 | 52.62 | 41.84 |
| TAP 3 | 42 | 31.69 | 198.98 | 108.43 | 48.96 | 45.16 |
| TAP 4 | 34 | 21.64 | 216.94 | 120.63 | 48.92 | 40.56 |
| Forma | | | | | | |
| TAP 0 | 98 | 0.26 | 0.89 | 0.59 | 0.14 | 23.73 |
| TAP 1 | 47 | 0.20 | 0.94 | 0.54 | 0.18 | 34.07 |
| TAP 2 | 27 | 0.22 | 0.79 | 0.59 | 0.15 | 26.23 |
| TAP 3 | 42 | 0.22 | 0.83 | 0.58 | 0.16 | 27.28 |
| TAP 4 | 34 | 0.23 | 0.85 | 0.50 | 0.18 | 35.82 |
| Tono | | | | | | |
| TAP 0 | 98 | 63.75 | 182.32 | 124.68 | 19.51 | 15.65 |
| TAP 1 | 47 | 43.50 | 160.33 | 114.25 | 18.88 | 16.53 |
| TAP 2 | 27 | 104.26 | 176.11 | 128.66 | 19.11 | 14.85 |
| TAP 3 | 42 | 85.72 | 178.89 | 122.94 | 19.16 | 15.59 |
| TAP 4 | 34 | 100.84 | 155.91 | 122.25 | 11.73 | 9.59 |
| Cráteres | | | | | | |
| TAP 0 | 98 | | | 0.34 | | |
| TAP 1 | 47 | | | 0.43 | | |
| TAP 2 | 27 | | | 0.26 | | |
| TAP 3 | 42 | | | 0.60 | | |
| TAP 4 | 34 | | | 0.35 | | |
| Uniones intercel. | | | | | | |
| TAP 0 | 98 | 0.8 | 1 | 0.94 | 0.09 | 9.57 |
| TAP 1 | 47 | 0 | 1 | 0.92 | 0.15 | 16.63 |
| TAP 2 | 27 | 0 | 1 | 0.79 | 0.25 | 31.77 |
| TAP 3 | 42 | 0 | 1 | 0.84 | 0.25 | 29.29 |
| TAP 4 | 34 | 0 | 1 | 0.60 | 0.40 | 66.67 |

Tabla 3.27. Estadísticos descriptivos de las células pequeñas según el TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

| Células medianas | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. Var. |
|--------------------------|----------|---------------|---------------|--------------|-------------------|-------------------|
| SOM | | | | | | |
| TAP 0 | 80 | 21.69 | 60.92 | 48.40 | 7.12 | 14.71 |
| TAP 1 | 74 | 0.71 | 63.28 | 48.56 | 12.74 | 26.24 |
| TAP 2 | 94 | 0.27 | 60.51 | 35.54 | 16.90 | 47.55 |
| TAP 3 | 91 | 0.37 | 58.55 | 28.21 | 18.95 | 67.17 |
| TAP 4 | 96 | 0.23 | 61.74 | 36.85 | 20.19 | 54.80 |
| Area | | | | | | |
| TAP 0 | 80 | 200.39 | 591.24 | 355.95 | 131.25 | 36.87 |
| TAP 1 | 74 | 202.11 | 825.53 | 404.81 | 111.75 | 27.61 |
| TAP 2 | 94 | 201.37 | 593.14 | 389.65 | 112.15 | 28.78 |
| TAP 3 | 91 | 202.17 | 597.00 | 399.23 | 116.31 | 29.13 |
| TAP 4 | 96 | 210.50 | 598.53 | 381.38 | 112.30 | 29.45 |
| Forma | | | | | | |
| TAP 0 | 80 | 0.31 | 0.94 | 0.69 | 0.15 | 21.74 |
| TAP 1 | 74 | 0.39 | 0.92 | 0.73 | 0.11 | 15.29 |
| TAP 2 | 94 | 0.36 | 0.92 | 0.71 | 0.14 | 19.37 |
| TAP 3 | 91 | 0.36 | 0.94 | 0.73 | 0.15 | 20.94 |
| TAP 4 | 96 | 0.24 | 0.93 | 0.70 | 0.13 | 18.18 |
| Tono | | | | | | |
| TAP 0 | 80 | 67.65 | 179.71 | 116.30 | 20.76 | 17.85 |
| TAP 1 | 74 | 47.47 | 158.78 | 103.36 | 20.78 | 20.11 |
| TAP 2 | 94 | 79.75 | 172.10 | 113.55 | 17.21 | 15.16 |
| TAP 3 | 91 | 77.44 | 173.93 | 106.01 | 16.67 | 15.72 |
| TAP 4 | 96 | 64.78 | 156.75 | 114.19 | 16.63 | 14.56 |
| Cráteres | | | | | | |
| TAP 0 | 80 | | | 0,36 | | |
| TAP 1 | 74 | | | 0.68 | | |
| TAP 2 | 94 | | | 0.40 | | |
| TAP 3 | 91 | | | 0.44 | | |
| TAP 4 | 96 | | | 0.41 | | |
| Uniones intercel. | | | | | | |
| TAP 0 | 80 | 0.5 | 1 | 0.93 | 0.11 | 11.83 |
| TAP 1 | 74 | 0 | 1 | 0.90 | 0.20 | 21.67 |
| TAP 2 | 94 | 0 | 1 | 0.72 | 0.34 | 46.53 |
| TAP 3 | 91 | 0 | 1 | 0.73 | 0.32 | 43.70 |
| TAP 4 | 96 | 0 | 1 | 0.63 | 0.35 | 55.56 |

Tabla 3.28. Estadísticos descriptivos de las células medianas según el TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

| Células grandes | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. Var. |
|--------------------------|----------|---------------|---------------|--------------|-------------------|-------------------|
| SOM | | | | | | |
| TAP 0 | 54 | 22.98 | 56.36 | 45.04 | 7.46 | 16.56 |
| TAP 1 | 94 | 0.24 | 63.72 | 41.00 | 14.93 | 36.42 |
| TAP 2 | 70 | 0.76 | 49.34 | 27.17 | 15.13 | 55.70 |
| TAP 3 | 72 | 1.20 | 59.76 | 25.06 | 14.75 | 58.86 |
| TAP 4 | 61 | 0.39 | 56.98 | 28.92 | 20.30 | 70.18 |
| Area | | | | | | |
| TAP 0 | 54 | 604.42 | 1285.83 | 792.56 | 174.80 | 22.06 |
| TAP 1 | 94 | 603.13 | 1136.75 | 767.24 | 128.64 | 16.77 |
| TAP 2 | 70 | 598.10 | 1213.37 | 807.48 | 146.35 | 18.12 |
| TAP 3 | 72 | 602.46 | 1228.33 | 833.97 | 157.34 | 18.87 |
| TAP 4 | 61 | 623.48 | 1995.99 | 890.81 | 285.25 | 32.02 |
| Forma | | | | | | |
| TAP 0 | 54 | 0.52 | 0.97 | 0.83 | 0.11 | 13.25 |
| TAP 1 | 94 | 0.61 | 0.94 | 0.81 | 0.09 | 10.94 |
| TAP 2 | 70 | 0.71 | 0.96 | 0.86 | 0.05 | 6.09 |
| TAP 3 | 72 | 0.57 | 0.96 | 0.84 | 0.07 | 8.80 |
| TAP 4 | 61 | 0.65 | 0.95 | 0.83 | 0.08 | 9.25 |
| Tono | | | | | | |
| TAP 0 | 54 | 12.45 | 167.94 | 110.45 | 27.51 | 24.91 |
| TAP 1 | 94 | 52.19 | 124.61 | 95.70 | 15.61 | 16.31 |
| TAP 2 | 70 | 59.88 | 143.94 | 95.69 | 15.76 | 16.47 |
| TAP 3 | 72 | 56.34 | 119.88 | 92.92 | 11.31 | 12.17 |
| TAP 4 | 61 | 79.34 | 140.84 | 104.91 | 14.31 | 13.64 |
| Cráteres | | | | | | |
| TAP 0 | 98 | | | 0,34 | | |
| TAP 1 | 94 | | | 0.64 | 0.48 | |
| TAP 2 | 70 | | | 0.36 | 0.48 | |
| TAP 3 | 72 | | | 0.67 | 0.48 | |
| TAP 4 | 61 | | | 0.48 | 0.50 | |
| Uniones intercel. | | | | | | |
| TAP 0 | 54 | 0.5 | 1 | 0.93 | 0.12 | 12.90 |
| TAP 1 | 94 | 0 | 1 | 0.90 | 0.20 | 22.33 |
| TAP 2 | 70 | 0 | 1 | 0.86 | 0.24 | 27.56 |
| TAP 3 | 72 | 0 | 1 | 0.86 | 0.24 | 27.44 |
| TAP 4 | 61 | 0 | 1 | 0.68 | 0.32 | 46.76 |

Tabla 3.29. Estadísticos descriptivos de las células grandes según el TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Por lo que respecta a la *forma* de los diferentes tipos celulares (pequeñas, medianas y grandes) existen ligeros cambios que parecen indicar que la media de las células pequeñas tiende a ser más poligonal (valor más bajo de la variable) a medida que el TAP aumenta mientras que la dispersión aumenta. Sin embargo, la *forma* de las células medianas es, de media, más circular (valores más altos) manteniendo más o menos constante su dispersión. Por último, las células grandes mantienen su forma media en todos los TAP pero muestran un coeficiente de variación menor en los TAP altos. De este modo, las diferencias entre las formas de los diferentes tamaños celulares se mantienen bastante constantes (ni aumentan ni disminuyen) a medida que el TAP aumenta.

Cabe resaltar que en todos los TAP se cumple que la mayor dispersión de *SOM* aparece entre las células grandes mientras que la mayor dispersión de la variable *forma* se encuentra siempre entre las células pequeñas. Aunque esta tendencia es más pronunciada a medida que el TAP aumenta.

Por su parte el tiempo de apertura no parece influir claramente en la media del *tono* sea cual sea el tamaño de las células. Sin embargo, en todos los tamaños se observa como los valores de esta variable se dispersan menos a medida que el TAP aumenta, aunque esta tendencia es, quizás, más marcada entre las células pequeñas. En consecuencia, el tono del epitelio se va uniformizando a medida que aumenta el tiempo de apertura

La variable *holes* muestra, de nuevo, un comportamiento errático frente al tiempo de apertura en los tres grupos de tamaño.

En la página siguiente, a modo de ilustración, se incluyen una serie de gráficas (ver figura 3.40) donde se pueden apreciar los cambios de las variables principales de carácter objetivo bajo al influencia del TAP en las células pequeñas medianas y grandes.

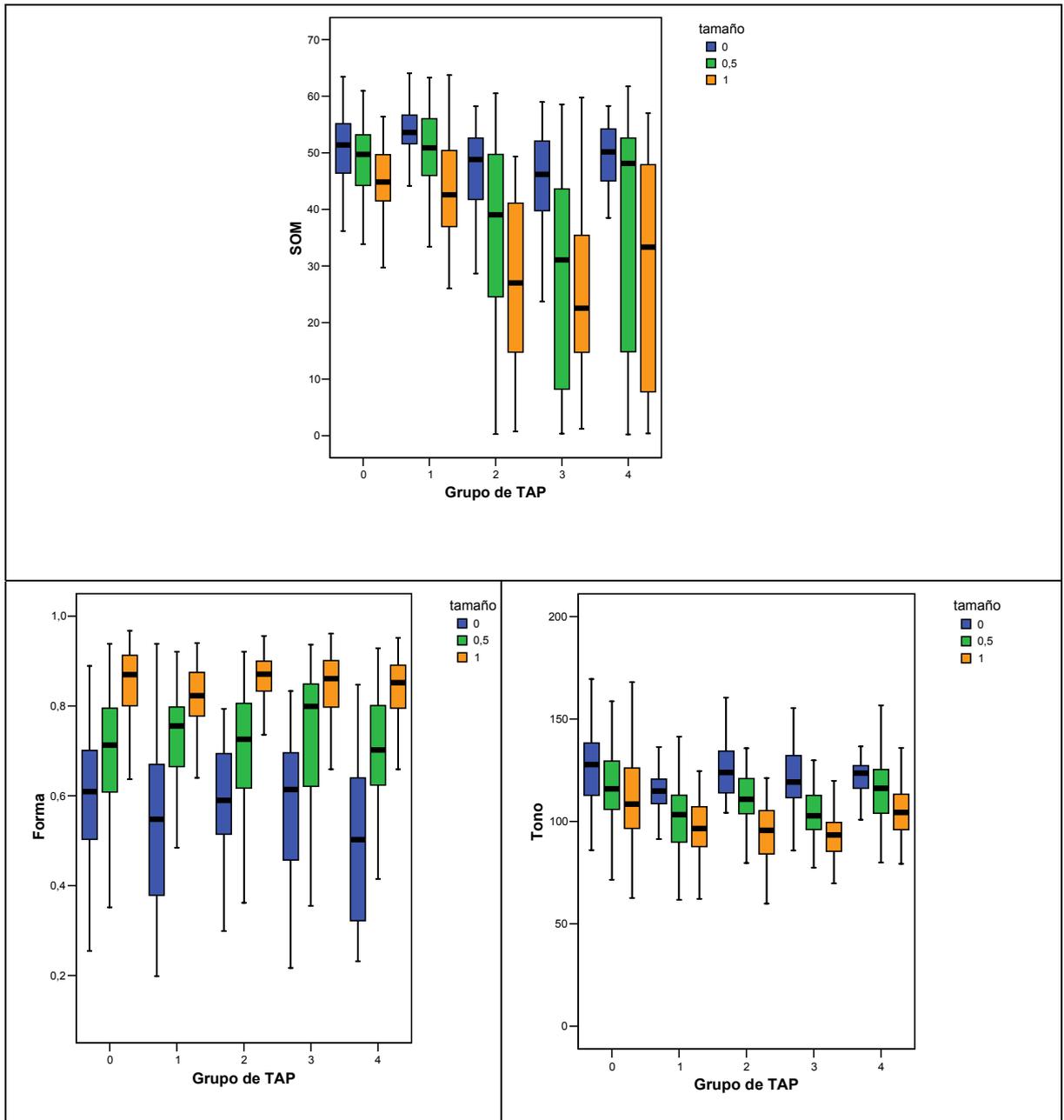


Figura 3.40. Gráficas de cajas del comportamiento de las variables *SOM*, *área*, *forma*, *tono* frente al TAP según los grupos de tamaño celular. (El tamaño cero se corresponde con las células pequeñas, el tamaño 0,5 con las células medianas y el tamaño 1 con las células grandes)

Para determinar la existencia de diferencias debidas a la acción del tiempo de apertura en los diferentes grupos de células (pequeñas, medianas y grandes) se ha contrastado la tendencia central de las variables principales.

Previamente, se ha analizado la normalidad en la distribución de cada una de las variables, en las tres muestras de tamaños, con el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov. Con los resultados de dicho test se ha rechazado la normalidad en el caso de las variables *SOM*, *holes* y *uniones intercelulares* en todos los tamaños y *forma* en las células medianas y grandes. No se ha rechazado la normalidad en el *tono* de los tres grupos de tamaño y en la *forma* de las células pequeñas.

Seguidamente las variables normales (*tono* en las células pequeñas, medianas y grandes y *forma* en las células pequeñas) se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) tomando como factor el tiempo de apertura palpebral, aplicando, también, el contraste de Scheffé para comparar los grupos por pares. Por su parte, las variables cuya distribución no es normal se han sometido al test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

La comparación de pares de grupos se ha realizado mediante el contraste de U-Mann-Whitney. Los resultados de las variables cuya tendencia central presenta alguna diferencia significativa aparecen en las tablas 3.30 (células pequeñas), 3.31 (células medianas) y 3.32 (células grandes)

Las variables con diferencias más frecuentes y más significativas son, de nuevo, la *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* y las *uniones intercelulares*, tanto en las células pequeñas como en las medianas y las grandes. En consecuencia, son las variables que mejor discriminan entre grupos de TAP.

De este modo, para comprobar el estado del epitelio parece conveniente analizar, básicamente, la densidad de microproyecciones y el estado de las uniones intercelulares.

| PEQUEÑAS | SOM | Holes | Uniones | Tono |
|--------------|---------|---------|---------|--------|
| TAP 0/ TAP 1 | 0.003** | ----- | ----- | 0.040* |
| TAP 0/ TAP 2 | ----- | ----- | 0.007** | ----- |
| TAP 0/ TAP 3 | 0.001** | 0.005** | 0.025* | ----- |
| TAP 0/ TAP 4 | ----- | ----- | 0.000** | ----- |
| TAP 1/ TAP 2 | 0.001** | ----- | 0.032* | 0.035* |
| TAP 1/ TAP 3 | 0.000** | ----- | ----- | ----- |
| TAP 1/ TAP 4 | 0.001** | ----- | 0.001** | ----- |
| TAP 2/ TAP 3 | ----- | 0.007** | ----- | ----- |
| TAP 2/ TAP 4 | ----- | ----- | ----- | ----- |
| TAP 3/ TAP 4 | ----- | 0.037* | 0.014* | ----- |

Tabla 3.30. Resultado de las comparaciones interTAP para las células de tamaño pequeño. ----- No hay diferencias significativas. **Nivel de significación de $p < 0,01$. *Nivel de significación de $p < 0,05$. SOM: superficie ocupada por microproyecciones. Las comparaciones por pares de grupos se han realizado mediante el test de Scheffé para las variables normales y el test de U-Mann-Whitney para las no normales. En la tabla sólo aparecen aquellas variables que presentan diferencias significativas al comparar las células pequeñas de dos TAP diferentes.

Respecto de la variable SOM, las células pequeñas son las que se modifican menos por efecto del TAP. En este caso, las diferencias significativas aparecen entre el TAP 0 y el TAP 1 (nivel de significación de $p < 0,01$) el TAP 0 y el TAP 3 (nivel de significación de $p < 0,01$) y, finalmente, entre el TAP 1 y los TAP 2, 3 y 4 (nivel de significación de $p < 0,01$).

En las células medianas las diferencias significativas de la variable SOM aparecen entre todos los pares de TAP excepto los pares TAP 0 / TAP1 y TAP 2 / TAP 4. Por último, las células grandes son las que muestran un patrón de diferencias más claro ya que presentan diferencias significativas (nivel de significación de $p < 0,01$) sólo para los pares frente al TAP 0 y al TAP 1 excepto el par TAP 0 / TAP1. De este modo, los cambios en la tendencia central de las microproyecciones por acción del tiempo de apertura palpebral son más

frecuentes en las células medianas y en las grandes que en las células pequeñas.

| MEDIANAS | SOM | Holes | Uniones | Tono |
|--------------|---------|----------|---------|---------|
| TAP 0/ TAP 1 | ----- | 0.000*** | ----- | 0.000** |
| TAP 0/ TAP 2 | 0.000** | ----- | 0.000** | ----- |
| TAP 0/ TAP 3 | 0.000** | ----- | 0.000** | 0.010** |
| TAP 0/ TAP 4 | 0.012* | ----- | 0.000** | ----- |
| TAP 1/ TAP 2 | 0.000** | 0.000** | 0.001** | 0.013* |
| TAP 1/ TAP 3 | 0.000** | 0.003** | 0.000** | ----- |
| TAP 1/ TAP 4 | 0.001** | 0.001** | 0.000** | 0.006** |
| TAP 2/ TAP 3 | 0.009** | ----- | ----- | ----- |
| TAP 2/ TAP 4 | ----- | ----- | 0.035* | ----- |
| TAP 3/ TAP 4 | 0.001** | ----- | ----- | ----- |

Tabla 3.31. Resultado de las comparaciones interTAP para las células de tamaño mediano. ----- No hay diferencias significativas. **Nivel de significación de $p < 0,01$. *Nivel de significación de $p < 0,05$. SOM: superficie ocupada por microproyecciones Las comparaciones por pares de grupos se han realizado mediante el test de Scheffé para las variables normales y el test de U-Mann-Whitney para las no normales. En la tabla sólo aparecen aquellas variables que presentan diferencias significativas al comparar las células medianas de dos TAP diferentes.

Por su parte, las diferencias estadísticamente significativas en las *uniones intercelulares* de las células pequeñas aparecen entre TAP 0 / TAP 2; TAP 0 / TAP 3; TAP 0 / TAP 4; TAP 1 / TAP 2; TAP 1 / TAP 4 y TAP 3/ TAP 4 con diversos niveles de significación (ver tabla 3.30). En las células medianas estas diferencias se presentan entre el TAP 0 y el resto de TAP y el TAP 1 y el resto (todas con un nivel de significación de $p < 0,01$), excepto para el par TAP 0 / TAP 1 donde las uniones intercelulares no son estadísticamente diferentes. Además la comparación de la tendencia central de las uniones entre el TAP 2 y el TAP 4 demuestra que hay, también diferencias pero con un nivel de significación menor ($p < 0,05$). En la muestra de células grandes las uniones

sólo presentan diferencias significativas en todos los pares en los que aparece el TAP 4 (nivel de significación de $p < 0,01$)

| GRANDES | SOM | Forma | Holes | Uniones | Tono |
|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| TAP 0/TAP 1 | ----- | 0.010* | ----- | ----- | 0.000** |
| TAP 0/ TAP 2 | 0.000** | ----- | ----- | ----- | 0.000** |
| TAP 0/ TAP 3 | 0.000** | ----- | 0.047* | ----- | 0.000** |
| TAP 0/ TAP 4 | 0.000** | ----- | ----- | 0.000** | ----- |
| TAP 1/ TAP 2 | 0.000** | 0.000** | 0.000** | ----- | ----- |
| TAP 1/ TAP 3 | 0.000** | 0.006** | ----- | ----- | ----- |
| TAP 1/ TAP 4 | 0.002** | ----- | ----- | 0.000** | 0.040* |
| TAP 2/ TAP 3 | ----- | ----- | 0.000** | ----- | ----- |
| TAP 2/ TAP 4 | ----- | 0.048* | ----- | 0.000** | ----- |
| TAP 3/ TAP 4 | ----- | ----- | 0.027* | 0.001** | 0.003** |

Tabla 3.32. Resultado de las comparaciones interTAP para las células de tamaño grande. ----- No hay diferencias significativas. **Nivel de significación de $p < 0,01$. *Nivel de significación de $p < 0,05$. SOM: superficie ocupada por microproyecciones. Las comparaciones por pares de grupos se han realizado mediante el test de Scheffé para las variables normales y el test de U-Mann-Whitney para las no normales. En la tabla sólo aparecen aquellas variables que presentan diferencias significativas al comparar las células grandes de dos TAP diferentes.

De ello se deduce que las uniones intercelulares son, básicamente, diferentes para las combinaciones entre TAP bajos (TAP 0 y 1) y TAP altos (2,3 y 4), excepto para las células grandes donde las diferencias sólo aparecen entre el TAP 4 y el resto de TAP. Por lo tanto, podría decirse que las células grandes poseen mayor tendencia a conservar sus uniones intactas (parecidas al control) y sólo en el TAP más alto cambia esta tendencia y comienzan a deteriorarse. Por el contrario, las uniones de las células medianas son las que presentan una propensión más clara y precoz a la alteración.

El *tono* presenta pocas y esporádicas diferencias en los pares de TAP de los tres grupos de tamaño. Lo mismo sucede con la variable *holes*, aunque en el

caso de las células medianas, cabe resaltar que, la presencia o ausencia de los cráteres en el TAP 1 es estadísticamente diferente del resto de TAP.

En cuanto a la *forma*, esta sólo muestra diferencias significativas entre las células grandes. En concreto, las células del TAP 0 frente al 1, del TAP 1 frente al 2 y al 3 y el TAP 2 frente al TAP 4.

En definitiva, se podría decir que debido al exceso de evaporación de la lágrima se desencadena un proceso de deterioro común, cuya progresión es diferente según el tamaño de la célula. Este deterioro se manifiesta en las células grandes con una rápida tendencia a la disminución del número de sus microproyecciones (a partir del TAP 2), cierta propensión a un aumento del área celular (a partir del TAP 3) y algunas variaciones en la forma mientras que las uniones intercelulares se alteran, por término medio, más tardíamente (en el TAP 4) por lo que, en general, mantienen la adhesión entre células más tiempo que el resto de grupos de tamaño.

Por su parte, una excesiva evaporación de la lágrima (producida por un aumento del tiempo de apertura palpebral) desencadena una disminución más gradual y progresiva de las microproyecciones en las células medianas. Sin embargo, son el grupo de células que muestra una más clara y rápida tendencia a la alteración de las uniones intercelulares.

Por último, las células pequeñas tienen menor tendencia a perder sus microproyecciones que el resto de grupos de tamaño. También presentan cierta propensión a la alteración de las uniones intercelulares pero esta es moderada pues sus uniones no son las que se pierden con más facilidad ni las que se mantienen más tiempo.

Predicción del tiempo de apertura palpebral en base a la morfología celular

Para establecer la capacidad de predicción del TAP en función de las diferentes variables morfológicas celulares, se han calculado cuatro modelos estadísticos predictivos. Con ellos se pretende pronosticar el TAP de una córnea en base a las características morfológicas de una de sus células.

Estos modelos se han confeccionado mediante una regresión logística tomando como categorías dependientes los tiempos de apertura palpebral y como covariables a las diferentes variables previamente descritas. De este modo, se ha calculado dos modelos predictivos con las variables principales (uno con cinco categorías de TAP y otro con dos categorías) y, análogamente, dos con las variables subordinadas. El objetivo de estos modelos es establecer la probabilidad de que una célula pertenezca a una córnea sometida a un TAP concreto. El pronóstico recaerá en el TAP que tenga asignada una probabilidad más alta.

Modelo predictivo con las variables celulares principales y cinco categorías de TAP

El primer modelo se ha calculado en base a las variables principales, tomando como categorías dependientes a las cinco categorías del tiempo de apertura palpebral, véase, TAP 0, TAP 1, TAP 2, TAP 3 y TAP 4. Dicho modelo presenta un ajuste adecuado ($\chi^2_{24} = 472.775$ con un nivel de significación de 0,000) aunque sólo predice correctamente el TAP en el 43,2% de las células. El tiempo de apertura palpebral que aparece mejor pronosticado es el TAP 0 y el peor es el TAP 2. (Ver tabla 3.33)

Las variables incluidas en la ecuación que define el modelo son: *SOM*, *área*, *tono*, *holes* y *uniones intercelulares* (en la tabla 3.34 aparecen con su nivel de significación). La *forma* no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$) por lo que su influencia en el modelo es despreciable.

| Observado | Pronosticado | | | | | Porcentaje correcto |
|-------------------|--------------|-------|------|-------|-------|---------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 0 | 155 | 36 | 10 | 18 | 14 | 66.5% |
| 1 | 62 | 71 | 3 | 16 | 16 | 42.3% |
| 2 | 60 | 18 | 32 | 44 | 37 | 16.8% |
| 3 | 33 | 25 | 21 | 95 | 31 | 46.3% |
| 4 | 56 | 18 | 8 | 35 | 74 | 38.7% |
| Porcentaje global | 37.0% | 17.0% | 7.5% | 21.1% | 17.4% | 43.2% |

Tabla 3.33. Resultados del pronóstico realizado por el modelo para cinco TAP

Las estimaciones de los parámetros para cada tiempo de apertura se presentan agrupadas en la tabla 3.35 (la categoría de referencia es TAP 0). Como puede observarse, las variables *SOM* y *uniones intercelulares* son significativas en todas las categorías de TAP.

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|------------------------|-----------------------------|
| SOM | 0,000** |
| Área | 0,000** |
| Forma | 0,080 |
| Tono | 0,000** |
| Holes | 0,000** |
| Uniones intercelulares | 0,000** |

Tabla 3.34. Variables en la ecuación que describe el modelo para cinco TAP. ** Nivel de significación de $p < 0,01$; RV: razón de verosimilitud.

Las predicciones acertadas con una elevada probabilidad (ver ejemplos en la tabla 3.36) aparecen en células con características morfológicas que el modelo considera típicas de un TAP determinado, motivo por el cual les ha asignado esa alta probabilidad (ver los valores de las variables de estas células en la tabla 3.37).

| Grupo de TAP(a) | VARIABLES en la ecuación | B | Sig. (Wald) |
|-----------------|--------------------------|--------|-------------|
| TAP 1 | Intersección | 6.308 | 0.000** |
| | SOM | 0.026 | 0.031* |
| | Area | 0.000 | 0.776 |
| | Forma | -1.079 | 0.197 |
| | Tono | -.049 | 0.000** |
| | Holes | 0.897 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -2.303 | 0.001** |
| TAP 2 | Intersección | 4.244 | 0.000** |
| | SOM | -.059 | 0.000** |
| | Area | 0.001 | 0.153 |
| | Forma | 0.157 | 0.854 |
| | Tono | -0.001 | 0.882 |
| | Holes | 0.410 | 0.065 |
| | Uniones intercelulares | -2.718 | 0.000** |
| TAP 3 | Intersección | 6.174 | 0.000** |
| | SOM | -0.084 | 0.000** |
| | Area | 0.000 | 0.738 |
| | Forma | -0.478 | 0.578 |
| | Tono | -0.009 | 0.161 |
| | Holes | 1.454 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -2.350 | 0.000** |
| TAP 4 | Intersección | 5.620 | 0.000** |
| | SOM | -0.039 | 0.000** |
| | Area | 0.002 | 0.000** |
| | Forma | -1.975 | 0.019* |
| | Tono | 0.002 | 0.764 |
| | Holes | 0.959 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -5.002 | 0.000** |

Tabla 3.35. Estimaciones de los parámetros para cada categoría de TAP en el modelo de células con variables principales. (a). La categoría de referencia es: TAP 0. * Nivel de significación de $p < 0,05$; **Nivel de significación de $p < 0,01$; SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

Estudiando estos casos se ha podido describir las características morfológicas de las células típicas de cada tiempo de apertura, según este modelo. Para ello, se ha seguido el mismo criterio en todos los modelos (criterio que está en concordancia con los utilizados para definir las categorías de las variables principales de carácter subjetivo y las variables subordinadas) que establece diferentes categorías según el valor que muestran las variables de las células en cada TAP.

En concreto, se ha considerado que una célula posee una elevada densidad de microproyecciones si el valor de SOM es superior al 40%. Un valor inferior a 30% se correspondería con una densidad baja e inferior al 10% sería muy baja. Por su parte, un área grande se ha considerado mayor que $600\mu\text{m}^2$ y un área pequeña menor de $200\mu\text{m}^2$. La forma se ha identificado como poligonal si el valor de la variable es menor que 0,8 y circular si es mayor que 0,9. En cuanto al tono, se considerará claro si es mayor que 179 y oscuro si es menor que 179. Las uniones intercelulares se han identificado como intactas o casi intactas si su categoría es de 1 ó 0,8; alteradas si su categoría es de 0,5; muy alteradas si es de 0,2 e inexistentes si es de 0.

| Célula | TAP | PTAP 0 | PTAP 1 | PTAP 2 | PTAP 3 | PTAP 4 | Grupo Asignado |
|---------------------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| C0i2_6 ^a | 0 | 0.69 | 0.04 | 0.15 | 0.06 | 0.06 | 0 |
| C01d2_1 | 0 | 0.65 | 0.05 | 0.15 | 0.06 | 0.08 | 0 |
| C01d27_20 | 0 | 0.61 | 0.05 | 0.14 | 0.08 | 0.13 | 0 |
| C12d4_1 | 1 | 0.08 | 0.83 | 0.04 | 0.04 | 0.01 | 1 |
| C12i2_1 | 1 | 0.03 | 0.70 | 0.07 | 0.11 | 0.09 | 1 |
| C12i25_17 | 1 | 0.05 | 0.79 | 0.03 | 0.07 | 0.07 | 1 |
| C13i8_5 | 2 | 0.05 | 0.01 | 0.43 | 0.39 | 0.13 | 2 |
| C13i16_9 | 2 | 0.04 | 0.02 | 0.42 | 0.38 | 0.14 | 2 |
| C13i22_17 | 2 | 0.11 | 0.06 | 0.41 | 0.28 | 0.15 | 2 |
| C14d6_5 | 3 | 0.02 | 0.01 | 0.22 | 0.68 | 0.08 | 3 |
| C14i33_8a | 3 | 0.02 | 0.01 | 0.23 | 0.65 | 0.09 | 3 |
| C14i35_8a | 3 | 0.03 | 0.02 | 0.24 | 0.62 | 0.10 | 3 |
| C20d10_5 | 4 | 0.02 | 0.03 | 0.08 | 0.03 | 0.83 | 4 |
| C20i12_12 | 4 | 0.01 | 0.03 | 0.20 | 0.08 | 0.68 | 4 |
| C20i22_20 | 4 | 0.02 | 0.04 | 0.08 | 0.07 | 0.78 | 4 |

Tabla 3.36. Ejemplos de pronósticos acertados con elevada probabilidad en la regresión logística celular con cinco categorías de TAP. TAP: tiempo de apertura palpebral. PTAP: probabilidad pronosticada para un TAP determinado

De este modo, las células típicas del TAP 0 son células con una elevada densidad de microproyecciones (*SOM* alta), área pequeña, forma poligonal, tono intermedio, sin *holes* y con uniones intercelulares intactas. Los resultados muestran también que una típica célula de TAP 1 posee un nivel alto de *SOM*,

área pequeña, forma poligonal o pseudopoligonal, tono intermedio u oscuro, con o sin holes y con uniones intercelulares de tipo 1 ó 0,8.

En cuanto a las células típicas del TAP 2, poseen un nivel de SOM muy bajo, un tamaño grande, son pseudopoligonales o circulares, de tono intermedio, sin holes y con uniones intactas. Cabe resaltar que, si se compara la probabilidad adjudicada a las células más típicas de cada uno de los TAP (ver tabla 3.36 y 3.37) el TAP 2 es el que presenta los valores relativamente más bajos. Ello concuerda con el hecho de que este es el TAP que peor pronostica el modelo (menor porcentaje de aciertos). Para el TAP 3 la regresión logística adjudica claramente células con bajas SOM, tamaño y forma variable, tono intermedio, con holes y con uniones intercelulares intactas o casi intactas.

| Células | PTAP | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|-----------------------|---------------|------|-------|-------|------|-------|-------------------|
| TAP 0 | PTAP 0 | | | | | | |
| C0i2_6a | 0.69 | 53,3 | 113 | 0,769 | 149 | 0 | 1 |
| C01d2_1 | 0.65 | 52,9 | 200 | 0,660 | 146 | 0 | 1 |
| C01d27_20 | 0.61 | 50,6 | 54,9 | 0,300 | 153 | 0 | 1 |
| TAP 1 | PTAP 1 | | | | | | |
| C12d4_1 | 0.83 | 44,1 | 195 | 0,681 | 43,5 | 0 | 1 |
| C12i2_1 | 0.70 | 54,6 | 104,4 | 0,275 | 76,2 | 1 | 0,8 |
| C12i25_17 | 0.79 | 57,9 | 86,9 | 0,809 | 87,4 | 1 | 0.8 |
| TAP 2 | PTAP 2 | | | | | | |
| C13i8_5 | 0.43 | 2,02 | 1084 | 0,901 | 98,4 | 0 | 1 |
| C13i16_9 | 0.42 | 1,60 | 1213 | 0,886 | 84,1 | 0 | 1 |
| C13i22_17 | 0.41 | 17,3 | 1074 | 0,916 | 84.1 | 0 | 1 |
| TAP 3 | PTAP 3 | | | | | | |
| C14d6_5 | 0.68 | 3,50 | 780 | 0,920 | 99,8 | 1 | 1 |
| C14i33_8 ^a | 0.65 | 12,0 | 373 | 0,878 | 104 | 1 | 0,8 |
| C14i35_8 ^a | 0.62 | 19,5 | 161 | 0,589 | 104 | 1 | 1 |
| TAP 4 | PTAP 4 | | | | | | |
| C20d10_5 | 0.83 | 46,0 | 529 | 0,239 | 130 | 0 | 0,2 |
| C20i12_12 | 0.68 | 50,2 | 553 | 0,587 | 133 | 1 | 0,2 |
| C20i22_20 | 0.78 | 50,2 | 278 | 0,774 | 157 | 1 | 0,2 |

Tabla 3.37. Valores de las variables principales en las células típicas de cada TAP según la regresión logística celular con cinco categorías de TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones. PTAP: probabilidad pronosticada a un TAP determinado.

Por último, las células más típicas del TAP 4, según los resultados de la regresión logística, son células con una *SOM* alta, de tamaño medio, forma poligonal, tono intermedio, con o sin holes pero con uniones intercelulares muy alteradas. En la tabla 3.38 aparecen expuestas las características morfológicas más relevantes de las células típicas de cada TAP.

| TAP | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercelulares |
|--------------|-----------------|-------------|--------------------------------|---------------------|-----------------|-------------------------------|
| TAP 0 | Elevada | Pequeña | Poligonal | Intermedio | Sin holes | Intactas |
| TAP 1 | Elevada | Pequeña | Poligonal o pseudopoligonal | Intermedio u oscuro | Con o sin holes | Intactas o casi intactas |
| TAP 2 | Baja o muy baja | Grande | Pseudopoligonales o circulares | Intermedio | Sin holes | Intactas |
| TAP 3 | Baja o muy baja | Variable | Variable | Intermedio | Con holes | Intactas o casi intactas |
| TAP 4 | Elevada | Media | Poligonal | Intermedio | Con o sin holes | Muy alteradas |

Tabla 3.38. Características morfológicas de las células típicas de cada TAP según la regresión logística con cinco TAP.

Como puede observarse, las características de las células típicas de cada tiempo de apertura palpebral, propuestas por este modelo predictivo, concuerdan, en líneas generales, con los resultados obtenidos hasta ahora. Las variables que más claramente parecen modificarse por acción del TAP son la variable *SOM* y la variable *uniones intercelulares*. En general, la *SOM* muestra signos de cambio que se inician, de forma masiva, mucho más rápidamente que las alteraciones en las uniones, hecho que, también, se había comentado en resultados anteriores.

Los pronósticos erróneos, con una elevada probabilidad asignada, también proporcionan información valiosa para interpretar el modelo. Estos casos ponen en evidencia la extremada variabilidad celular ya que son células con

características morfológicas claramente diferentes a las típicas de su propio TAP.

Por otro lado, la elevada probabilidad asignada indica que los rasgos de dichas células son muy parecidos a los de las células típicas de otro TAP. De este modo, el análisis de estos pronósticos erróneos permite confirmar el criterio discriminatorio utilizado por el modelo para diferenciar los diferentes TAP entre sí, o sea, las características morfológicas celulares que parecen cambian más claramente con el tiempo de apertura palpebral. En la tabla 3.39 aparecen algunos ejemplos de clasificación errónea cuyas variables se exponen en la tabla 3.40.

| <i>Célula</i> | <i>TAP</i> | <i>PTAP 0</i> | <i>PTAP 1</i> | <i>PTAP 2</i> | <i>PTAP 3</i> | <i>PTAP 4</i> | <i>Grupo Asignado</i> |
|---------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| C0i1_6 ^a | 0 | 0.04 | 0.08 | 0.14 | 0.15 | 0.59 | 4 |
| C04d15_10 | 0 | 0.08 | 0.12 | 0.17 | 0.23 | 0.40 | 4 |
| C04d16_10 | 0 | 0.13 | 0.05 | 0.29 | 0.08 | 0.44 | 4 |
| C12d15_13 | 1 | 0.03 | 0.02 | 0.31 | 0.58 | 0.06 | 3 |
| C12d14_13 | 1 | 0.03 | 0.04 | 0.30 | 0.53 | 0.11 | 3 |
| C12i29_13 | 1 | 0.02 | 0.02 | 0.12 | 0.10 | 0.73 | 4 |
| C13i2_1 | 2 | 0.02 | 0.02 | 0.21 | 0.68 | 0.07 | 3 |
| C13i3_1 | 2 | 0.27 | 0.61 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 1 |
| C17d16_17 | 2 | 0.60 | 0.02 | 0.16 | 0.06 | 0.16 | 0 |
| C14d22_13 | 3 | 0.27 | 0.60 | 0.07 | 0.02 | 0.04 | 1 |
| C15d40_8a | 3 | 0.02 | 0.00 | 0.23 | 0.16 | 0.59 | 4 |
| C16d16_13 | 3 | 0.02 | 0.00 | 0.23 | 0.16 | 0.59 | 4 |
| C19d17_9 | 4 | 0.57 | 0.14 | 0.16 | 0.08 | 0.05 | 0 |
| C20d24_17 | 4 | 0.53 | 0.17 | 0.13 | 0.04 | 0.12 | 0 |
| C21d35_1a | 4 | 0.00 | 0.01 | 0.12 | 0.60 | 0.27 | 3 |

Tabla 3.39. Ejemplos de pronósticos erróneos con elevada probabilidad en la regresión logística celular con cinco categorías de TAP. TAP: tiempo de apertura palpebral. PTAP: probabilidad pronosticada para un TAP determinado.

Las características celulares de estas células atípicas (células con un TAP pronosticado erróneo y una elevada probabilidad asignada) se han establecido en base a los datos de las variables siguiendo los mismos criterios utilizados para definir la morfología de las células típicas de cada TAP (expuestos anteriormente)

De este modo, el TAP 0 muestra errores con elevada probabilidad asignada en células de SOM alta, área mediana o grande, forma poligonal o pseudopoligonal, tono intermedio, con holes o sin y con uniones intercelulares algo dañadas. Generalmente, el modelo les asigna un TAP 4. (Ver tablas 3.39 y 3.40)

Por su parte, las células del TAP 1 que presentan pronósticos erróneos suelen ser células a las que se les asigna el TAP 3 porque presentan, básicamente, una densidad de microproyecciones muy baja y unas uniones casi perfectas. También hay células que siendo del TAP 1 este modelo les atribuye un TAP 4 porque a pesar de poseer una elevada SOM sus uniones intercelulares están muy alteradas.

| Células | Grupo asignado | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|---------------------|-----------------------|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------------------|
| TAP 0 | | | | | | | |
| C0i1_6 ^a | 4 | 43,2 | 696 | 0,637 | 118 | 1 | 0,5 |
| C04d15_10 | 4 | 45,6 | 228 | 0,667 | 123 | 1 | 0,5 |
| C04d16_10 | 4 | 43,9 | 675 | 0,860 | 129 | 0 | 0,5 |
| TAP 1 | | | | | | | |
| C12d15_13 | 3 | 2,08 | 341 | 0,915 | 81,4 | 0 | 0,8 |
| C12d14_13 | 3 | 1,23 | 469 | 0,725 | 75,5 | 0 | 1 |
| C12i29_13 | 4 | 46,7 | 385 | 0,687 | 149 | 1 | 0,2 |
| TAP 2 | | | | | | | |
| C13i2_1 | 3 | 5,27 | 828 | 0,947 | 81,6 | 1 | 1 |
| C13i3_1 | 1 | 69,6 | 137 | 0,603 | 106 | 1 | 1 |
| C17d16_17 | 0 | 58,0 | 281 | 0,621 | 119 | 0 | 1 |
| TAP 3 | | | | | | | |
| C14d22_13 | 1 | 59,8 | 719 | 0,873 | 79,2 | 0 | 1 |
| C15d40_8a | 4 | 23,7 | 169 | 0,496 | 155 | 0 | 0,2 |
| C16d16_13 | 4 | 17,7 | 621 | 0,942 | 94,9 | 1 | 0 |
| TAP 4 | | | | | | | |
| C19d17_9 | 0 | 50,6 | 172 | 0,847 | 117 | 0 | 1 |
| C20d24_17 | 0 | 52,4 | 270 | 0,701 | 117 | 0 | 1 |
| C21d35_1a | 3 | 5,06 | 692 | 0,758 | 81,0 | 1 | 0,5 |

Tabla 3.40. Valores de las variables principales en las células cuyo pronóstico es erróneo con elevada probabilidad asignada en la regresión logística con cinco categorías de TAP. SOM : superficie ocupada por microproyecciones.

Los errores que se cometen con las células del TAP 2 son muy variados ya que el modelo puede asignarles claramente un TAP 0, 1 ó 3. La asignación errónea

a uno de los dos primeros TAP aparece en aquellas células del TAP 2 cuya SOM es muy alta mientras que asigna un TAP 3 a células con SOM muy baja. En los dos tipos de error las uniones intercelulares suelen estar intactas.

Este modelo de regresión logística para cinco categorías de TAP confunde ciertas células del TAP 3 con células del TAP 1 ó 4. Las asignadas al TAP 1, con probabilidad alta, poseen una SOM elevada u unas uniones intercelulares intactas y las asignadas al TAP 4 muestran un bajo nivel de SOM y unas uniones muy alteradas.

Finalmente, a algunas de las células del TAP 4 se las cataloga erróneamente dentro del TAP 0, sobre todo, si poseen una SOM muy elevada acompañada de unas uniones intercelulares intactas. El modelo también se equivoca en su asignación si las células del TAP 4 poseen muy pocas microproyecciones y sus uniones están alteradas. A dichas células se les asigna el TAP 3.

En consecuencia, podría afirmarse que todos los TAP muestran una elevada variabilidad de características morfológicas celulares. Sin embargo, las células control (TAP 0), según este modelo, son las que presentan una uniformidad relativamente mayor, en aquellas variables esenciales para la diferenciación interTAP.

En la tabla 3.41 se exponen, a modo de resumen, las principales características morfológicas de las células con asignación de TAP errónea y alta probabilidad así como el TAP concreto al que han sido asignadas. En dicha tabla puede observarse que el TAP 2 es el tiempo de apertura palpebral que presenta asignaciones erróneas más variadas. Si a este hecho se le suma su más baja proporción de pronósticos correctos se podría afirmar que es el TAP cuya diferenciación presenta más dificultades.

| TAP observado | TAP erróneo asignado y características celulares diferenciales | | | | |
|---------------|--|------------------------------|-------|------------------------------|---------------------------------|
| | TAP 0 | TAP 1 | TAP 2 | TAP 3 | TAP 4 |
| TAP 0 | | | | | SOM elevada UI alteradas |
| TAP 1 | | | | SOM baja UI casi intactas | SOM elevada UI muy alteradas |
| TAP 2 | SOM muy altas UI intactas | SOM muy altas UI intactas | | SOM muy bajas UI intactas | |
| TAP 3 | | SOM altas UI intactas | | | SOM bajas UI muy alteradas |
| TAP 4 | SOM alta UI intactas | | | SOM baja UI alteradas | |

Tabla 3.41. Principales características morfológicas de las células con errónea asignación de TAP con el modelo de regresión logística para cinco categorías de TAP. SOM: superficie ocupada por las microproyecciones. UI: uniones intercelulares.

Por el contrario, este modelo presenta pronósticos erróneos en, relativamente, pocas células del TAP 0 a las que les asigna, mayoritariamente, el TAP 4. Estas células podrían ser células en proceso de descamación porque poseen unas uniones intercelulares alteradas frente a las uniones intactas típicas de las células control.

De este modo, podría afirmarse que ciertas células del TAP 0 y del TAP 4 poseen similitudes morfológicas. Este hecho parece paradójico ya que son los

dos tiempos de apertura palpebral más alejados. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la capacidad regenerativa del tejido epitelial permanece intacta en el modelo de ojo seco utilizado. Por lo tanto, las células epiteliales del TAP 4 que se parecen a las típicas del TAP 0 podrían ser células de las capas epiteliales subyacentes. Estas habrían sido descubiertas por una descamación masiva, desencadenada por la excesiva evaporación de lágrima, después de más de tres horas de tiempo de apertura palpebral (TAP 4). No obstante, debe tenerse en cuenta que el TAP 4 presenta, también, células de características similares a las de las células típicas del TAP 3 con baja *SOM* y *uniones intercelulares* algo alteradas.

Modelo predictivo con las variables celulares principales y dos categorías de TAP

Atendiendo a los resultados expuestos anteriormente, en los que se observaban ciertas similitudes entre algunos tiempos de apertura palpebral, se ha creído conveniente agrupar los TAP en dos categorías a las que se les ha nombrado como GTAP 0 y GTAP 1 (grupos de TAP 0 y grupos de TAP 1). Dentro del GTAP 0 se incluyen las células del TAP 0 y del TAP 1 y el GTAP 1 agrupa al TAP 2, 3 y 4. Con estas agrupaciones se ha calculado un nuevo modelo que, en consecuencia discrimina entre dos categorías de tiempo de apertura palpebral: GTAP 0 y GTAP 1.

El nuevo modelo presenta un ajuste adecuado ($\chi^2_6 = 280.362$ con un nivel de significación de 0,000) y predice correctamente el TAP en el 70,5% de los casos, mejorando ostensiblemente el pronóstico realizado por el primer modelo (con pronósticos correctos en el 43,2% de los casos). La categoría que aparece mejor pronosticada es el GTAP 1. (Ver tabla 3.42)

| Observado | Pronosticado | | |
|-------------------|--------------|--------|---------------------|
| | GTAP 0 | GTAP 1 | Porcentaje correcto |
| GTAP 0 | 261 | 140 | 65.1% |
| GTAP 1 | 151 | 436 | 74.3% |
| Porcentaje global | | | 70.5% |

Tabla 3.42. Resultados del pronóstico realizado por el modelo para dos categorías de TAP

Las variables incluidas en la ecuación son las mismas que se incluían en el modelo anterior, véase, la *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)*, *área*, *tono*, *holes* y las *uniones intercelulares*. Estas aparecen en la tabla 3.43 con su nivel de significación. La *forma* no es estadísticamente significativa por lo que su influencia en el modelo es despreciable ($p > 0,05$).

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|--|-----------------------------|
| Superficie ocupada por las microproyecciones | 0,000** |
| Área | 0,044* |
| Forma | 0,677 |
| Tono | 0,000** |
| Holes | 0,000** |
| Uniones intercelulares | 0,000** |

Tabla 3.43. Variables en la ecuación que describe el modelo para dos GTAP. * Nivel de significación de $p < 0,01$; * Nivel de significación de $p < 0.05$ RV: razón de verosimilitud.

Para establecer las características morfológicas de las células más típicas de cada GTAP se han estudiado, igual que se hizo con el modelo anterior y siguiendo los mismos criterios, aquellas predicciones acertadas a las que el modelo asigna una elevada probabilidad (ver tabla 3.44).

Según estos datos, las células típicas del GTAP 0 poseen una elevadísima densidad de microproyecciones, áreas de tamaños variados, formas

poligonales y tonos intermedios. Además, no presentan *holes* y sus uniones intercelulares están intactas.

A su vez, este modelo describe a las células típicas del GTAP1 como células con una densidad de microproyecciones (*SOM*) muy baja, áreas medianas o pequeñas, formas poligonales o pseudopoligonales, tonos intermedios cercanos a los tonos oscuros, sin *holes* y con las uniones intercelulares completamente destruidas o muy alteradas.

| Célula | GTAP | PGTAP | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|-----------|------|-------|------|------|-------|------|-------|-------------------|
| C22i13_11 | 0 | 0,87 | 60,0 | 603 | 0,645 | 102 | 0 | 1 |
| C22i15_15 | 0 | 0,86 | 61,4 | 158 | 0,694 | 101 | 0 | 1 |
| C22i21_19 | 0 | 0,87 | 62,5 | 213 | 0,444 | 96,9 | 0 | 1 |
| C11d21_4 | 1 | 0,99 | 1,30 | 319 | 0,834 | 102 | 0 | 0,2 |
| C15i11_9 | 1 | 0,99 | 1,31 | 301 | 0,676 | 77,4 | 0 | 0 |
| C21d26_17 | 1 | 0,99 | 7,68 | 141 | 0,528 | 111 | 0 | 0 |

Tabla 3.44. Ejemplos de pronósticos acertados con elevada probabilidad en la regresión logística por células con dos categorías de TAP. GTAP: grupo de TAP (el GTAP 0 incluye los TAP 0 y 1 mientras que el GTAP 2 incluye los TAP2, 3 y 4). PGTAP: probabilidad pronosticada para un GTAP determinado.

En cuanto a las predicciones erróneas con una elevada probabilidad asignada (ver tabla 3.45), se presentan tanto en el GATP 0 como en el GATP 1. En el primer caso estos fallos en el pronóstico aparecen en células de baja o muy baja densidad de microproyecciones, áreas de tamaño mediano o grande, forma pseudopoligonal o poligonal, tono intermedio oscuro, sin *holes* y con uniones intercelulares alteradas o muy alteradas.

Las células del GTAP 1 que este modelo predice clara pero erróneamente son, básicamente, células de muy elevada densidad de microproyecciones, áreas pequeñas o grandes, formas diversas y tonos intermedio-oscuros. Además, pueden presentar *holes* o no presentarlos pero sus uniones permanecen intactas. En la tabla 3.46 se exponen, a modo de resumen, las características

básicas de las células típicas de cada TAP y de las células atípicas (con pronóstico erróneo y alta probabilidad)

| Célula | GTAP | PGTAP | Grupo Asignado | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|-----------|------|-------|-------------------|-------|------|-------|------|-------|----------------------|
| C22i20_19 | 0 | 0,99 | 1 | 1,96 | 772 | 0,819 | 91,2 | 0 | 0,2 |
| C22i16_15 | 0 | 0,97 | 1 | 0,962 | 675 | 0,813 | 81,3 | 0 | 0,5 |
| C22i18_15 | 0 | 0,93 | 1 | 25,1 | 366 | 0,580 | 92,0 | 0 | 0,2 |
| C13i3_1 | 1 | 0,87 | 0 | 69,6 | 137 | 0,603 | 106 | 1 | 1 |
| C14d22_13 | 1 | 0,86 | 0 | 60,0 | 719 | 0,873 | 79,2 | 0 | 1 |
| C14d25_17 | 1 | 0,83 | 0 | 58,0 | 748 | 0,946 | 88,0 | 0 | 1 |

Tabla 3.45. Ejemplos de pronósticos erróneos con elevada probabilidad en la regresión logística por células con dos categorías de TAP. GTAP: grupo de TAP (el GTAP 0 incluye los TAP 0 y 1 mientras que el GTAP 2 incluye los TAP 2, 3 y 4). PGTAP: probabilidad pronosticada para un GTAP determinado.

En dicha tabla puede observarse como, también con este modelo, las características morfológicas que más claramente discriminan entre los dos grupos de TAP son la *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* y las *uniones intercelulares*. Además, en la tabla 3.46 se evidencia la coherencia del modelo ya que las células atípicas del GTAP 1 poseen muchas características análogas a las células típicas del GTAP 0 y viceversa.

Modelos predictivos con las variables celulares subordinadas

Con el fin de comprobar la capacidad de las variables subordinadas para pronosticar el tiempo de apertura palpebral, se han calculado, de forma análoga a lo realizado anteriormente con las variables principales, dos modelos predictivos; uno con las cinco categorías de TAP y otro con los dos GTAP. La predicción se ha llevado a cabo en base a las variables subordinadas (originadas a partir de la agrupación subjetiva por categorías de las variables principales de carácter objetivo), a los *holes* y las *uniones intercelulares*. Estas dos variables principales se han añadido como covariables en el modelo ya que para ellas no se ha establecido ninguna variable subordinada (*Holes* y *uniones intercelulares* poseen un carácter subjetivo y sus valores representan categorías) de modo que, si no se añadieran aquí, se perdería parte de la información.

| Células típicas | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercelulares. |
|-------------------------|-----------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------|--|
| GTAP 0 | Elevadísima | Variadas | Poligonal | Intermedio | Sin <i>holes</i> | Intactas |
| GTAP 1 | Muy baja | Medianas o pequeñas | Poligonal o pseudopoligonal | Intermedio u oscuro | Sin <i>holes</i> | Completamente destruidas o muy alteradas |
| Células atípicas | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercelulares |
| GTAP 0 | Baja o muy baja | Medianas o grandes | Poligonal o pseudopoligonal | Intermedio - oscuro | Sin <i>holes</i> | Alteradas o muy alteradas |
| GTAP 1 | Elevadísima | Pequeñas o grandes | Variadas | Intermedio u oscuro | Con o sin <i>holes</i> | Intactas |

Tabla 3.46. Características morfológicas de las células típicas y atípicas para cada categoría de GTAP. Las características de las células típicas se han obtenido analizando las células cuyo pronóstico ha sido acertado con una alta probabilidad mientras que las de las células atípicas se corresponden con las de aquellas células con pronóstico erróneo y alta probabilidad asignada.

Los dos modelos muestran ajustes adecuados. En el primero, las variables subordinadas pronostican los cinco tiempos de apertura palpebral con un valor de $\chi^2 = 444.148$ y un nivel de significación de 0,000 y en el segundo dichas variables pronostican los dos GTAP con un valor de $\chi^2_6 = 295.853$ y un nivel de significación de 0,000.

En las tablas 3.47 y 3.48 aparecen la proporción de pronósticos correctos en cada uno de los modelos. Como se desprende de dichas tablas la capacidad predictiva del modelo que discrimina entre GTAP 0 y GTAP 1 es mucho mayor (porcentaje global de aciertos del 70,4%) que la del modelo que discrimina entre las cinco categorías de TAP (porcentaje global de aciertos del 41.9%).

| Observado | Pronosticado | | | | | Porcentaje correcto |
|-------------------|--------------|-------|------|-------|-------|---------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 0 | 148 | 47 | 10 | 18 | 10 | 63.5% |
| 1 | 65 | 60 | 11 | 16 | 16 | 35.7% |
| 2 | 40 | 32 | 37 | 46 | 36 | 19.4% |
| 3 | 33 | 19 | 20 | 103 | 30 | 50.2% |
| 4 | 35 | 36 | 17 | 37 | 66 | 34.6% |
| Porcentaje global | 32.5% | 19.6% | 9.6% | 22.3% | 16,0% | 41.9% |

Tabla 3.47. Resultados del pronóstico realizado por el modelo predictivo celular con las variables subordinadas para cinco TAP

| Observado | Pronosticado | | Porcentaje correcto |
|-------------------|--------------|--------|---------------------|
| | GTAP 0 | GTAP 1 | |
| GTAP 0 | 246 | 155 | 61.3% |
| GTAP 1 | 137 | 450 | 76.7% |
| Porcentaje global | | | 70.4% |

Tabla 3.48. Resultados del pronóstico realizado por el modelo predictivo con las variables subordinadas para dos categorías de TAP

Además, estos resultados son muy parecidos a los obtenidos con los modelos predictivos basados en las variables principales (43.2% para el modelo con cinco TAP y 70.5% para el modelo con dos grupos de TAP) con lo que se podría afirmar que las variables subordinadas poseen una capacidad predictiva del TAP semejante a la de las variables principales.

Las variables incluidas en las ecuaciones son: *cat SOM*, *cat tamaño*, *cat tono*, *holes* y *uniones intercelulares* para la regresión logística con cinco TAP y las mismas, excepto *cat tamaño*, para el modelo con los dos GTAP. La variable *cat forma* no es estadísticamente significativa en ningún caso ($p < 0,05$). (Ver tablas 3.49 y 3.50)

Las estimaciones de los parámetros para cada tiempo de apertura palpebral en el modelo celular con los cinco TAP se exponen en la tabla 3.51 (la categoría de referencia es TAP 0).

De dicha tabla cabe resaltar que, las variables con significación en todos los TAP son *holes* y *uniones intercelulares*. La variables *cat SOM* no es significativa para el TAP1 respecto del TAP 0 por lo que puede considerarse como no discriminadora, para este modelo, entre estos dos TAP concretos, aunque con el resto de TAP si lo es.

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|------------------------|------------------------------------|
| Cat SOM | 0,000** |
| Cat tamaño | 0,000** |
| Cat forma | 0,282 |
| Cat Tono | 0,000** |
| Holes | 0,000** |
| Uniones intercelulares | 0,000** |

Tabla 3.49. Variables en la ecuación que describe el modelo para cinco TAP. ** Nivel de significación de $p < 0,01$; RV: razón de verosimilitud.

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|------------------------|------------------------------------|
| Cat SOM | 0,000** |
| Cat tamaño | 0,595 |
| Cat forma | 0,430 |
| Cat Tono | 0,000** |
| Holes | 0,000** |
| Uniones intercelulares | 0,000** |

Tabla 3.50. Variables en la ecuación que describe el modelo para dos GTAP. ** Nivel de significación de $p < 0,01$; RV: razón de verosimilitud.

| Grupo de TAP(a) | VARIABLES en la ecuación | B | Sig. (Wald) |
|-----------------|--------------------------|--------|-------------|
| TAP 1 | Intersección | 0.974 | 0.220 |
| | Cat SOM | -0.073 | 0.887 |
| | Cat tamaño | 0.739 | 0.034* |
| | Cat forma | -0.512 | 0.215 |
| | Cat Tono | -0.625 | 0.510 |
| | Holes | 0.893 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -1.759 | 0.011* |
| TAP 2 | Intersección | 2.524 | 0.001** |
| | Cat SOM | -3.134 | 0.000** |
| | Cat tamaño | 0.683 | 0.057 |
| | Cat forma | -0.058 | 0.881 |
| | Cat Tono | 2.840 | 0.008** |
| | Holes | 0.504 | 0.026* |
| | Uniones intercelulares | -2.655 | 0.000** |
| TAP 3 | Intersección | 2.387 | 0.003** |
| | Cat SOM | -4.619 | 0.000** |
| | Cat tamaño | -0.439 | 0.236 |
| | Cat forma | 0.326 | 0.414 |
| | Cat Tono | 4.392 | 0.000** |
| | Holes | 1.612 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -2.353 | 0.000** |
| TAP 4 | Intersección | 1.736 | 0.085 |
| | Cat SOM | -1.782 | 0.000** |
| | Cat tamaño | 1.079 | 0.004** |
| | Cat forma | -0.307 | 0.450 |
| | Cat Tono | 5.581 | 0.001** |
| | Holes | 0.967 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -5.006 | 0.000** |

Tabla 3.51. Estimaciones de los parámetros en cada una de las categorías de TAP en el modelo predictivo con las variables subordinadas y cinco TAP. En (a) la categoría de referencia es: TAP 0. * Nivel de significación de $p < 0,05$; **Nivel de significación de $p < 0,01$

Para los modelos con variables subordinadas no se han analizado los aciertos ni los errores con elevada probabilidad ya que en este caso no se pretende establecer los criterios discriminativos que utiliza el modelo sino sólo la

capacidad predictiva de las variables para poder valorar su uso en la práctica clínica.

De estos resultados se desprende que las variables subordinadas poseen una capacidad muy semejante a las variables principales para predecir el tiempo de apertura palpebral. (Los modelos con variables principales muestran un porcentaje global de aciertos de 43,2% para cinco categorías de TAP y de 70,5% para dos GTAP mientras que los modelos con variables subordinadas poseen un porcentaje global de aciertos de 41,9% para cinco TAP y 70,4% para dos GATP)

En conclusión, en la práctica clínica se podría diagnosticar si un epitelio corneal está alterado o no (dos categorías de TAP) en base a una categorización subjetiva de los datos morfológicos de visu de las variables utilizadas en esta tesis doctoral. Sin embargo, la proporción relativamente baja de aciertos globales obtenida en estos modelos celulares para las cinco categorías de TAP hace muy difícil el establecimiento de cinco estadios en la progresión de las alteraciones, aún utilizando datos morfométricos.

Cabe recordar aquí que, el objetivo de estos modelos es predecir el tiempo de apertura palpebral en base a las características morfológicas de una sola célula. Dicho objetivo es de extrema dificultad si se tiene en cuenta la elevadísima variabilidad que presentan las células del epitelio a medida que aumenta el TAP. Es más, desde un punto de vista clínico no tendría mucho sentido establecer un diagnóstico en base a la observación de una única célula.

En consecuencia, aplicando estos criterios clínicos, se ha realizado un estudio zonal que, además, permite disminuir la variabilidad de la muestra y mejorar, así, los resultados de las predicciones, tal y como se expone en el siguiente subapartado.

3.2.3. Zonas en función del tiempo de apertura palpebral (TAP)

Para establecer una visión más global de los cambios morfológicos que sufre el epitelio, se han analizado los datos agrupándolos en base a la zona de la córnea central a la que pertenecen. Se entiende por zona aquel conjunto de células que están incluidas en el centro de un campo de visión a 500x. (Ver capítulo de material y método.)

De este modo, cada dato de una variable zonal es el resultado de promediar los valores obtenidos en las células incluidas en una de las zonas estudiadas. Por ejemplo, cada dato de la variable zonal *forma* se obtiene calculando la forma media de las células incluidas en una zona concreta. En la tabla 3.52 aparece un listado del número de zonas analizadas en cada córnea.

Para establecer los cambios morfológicos que sufren las zonas de la superficie central del epitelio corneal se ha analizado los valores obtenidos para las diferentes variables zonales en cada uno de los tiempos de apertura palpebral.

| TAP | Córneas (número de zonas) |
|---------------------------------------|---|
| TAP 0 (control) | C0i (2); C01i (6); C01d (6); C02d (5); C02i (6); C03d (5); C03i (6); C04d (6); C04i (5) |
| TAP 1 (menor de una hora) | C12d (5); C12i (5); C18d (5); C18i (5); C22d (5); C22i (5) |
| TAP 2 (entre 1 y dos horas) | C11d (6); C11i (7); C13d (5); C13i (7); C17d (7); C17i (8) |
| TAP 3 (entre dos y tres horas) | C14d (7); C14i (7); C15d (7); C15i (5); C16d (8); C16i (7); |
| TAP 4 (más de tres horas) | C19d (6); C19i (6); C20d (6); C20i (6); C21d (7); C21i (5) |

Tabla 3.52. Número de zonas estudiadas en cada córnea.

Con esta intención, se han estudiado los estadísticos descriptivos de las variables principales y subordinadas, estableciendo, también, las posibles relaciones entre ellas. Además, para determinar las diferencias según el TAP se ha comparado la tendencia central de las variables principales.

Una vez conseguida la caracterización morfológica de los cambios zonales se ha calculado un modelo estadístico que pronostica el tiempo de apertura palpebral en base a los datos morfológicos de una zona. Este nuevo análisis se ha llevado a cabo con la intención de establecer que características morfológicas, de entre todas las descritas, son esenciales para definir los cambios acontecidos en cada TAP. Seguidamente, se han comparado estos resultados con los obtenidos en la predicción con datos morfológicos celulares para comprobar cuales son más satisfactorios, o sea, como se predice mejor el TAP con datos celulares o zonales.

Estudio de los estadísticos descriptivos de las variables zonales en función del TAP

Con el fin de discriminar los cambios morfológicos de las zonas por acción del TAP, se han calculado primero los estadísticos descriptivos de todas las variables principales, que aparecen expuestos en la tabla 3.53.

Los resultados, como era de esperar, son análogos a los observados con las células. Las variables cuyo comportamiento frente al TAP es más evidente son, de nuevo, *uniones intercelulares* y *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* cuyas medias descienden claramente, aunque en el caso de la variable *SOM* existe cierta recuperación en el TAP 4.

La dispersión de los datos, para estas dos variables zonales, aumenta con el TAP pero, como sucede con las variables celulares, las *uniones intercelulares* lo hacen de forma progresiva mientras que en *SOM* el aumento es brusco a partir del TAP 1. El *tono* también desciende respecto del control pero no lo hace tan claramente. Lo que si es evidente es la disminución de la dispersión del tono en las zonas a medida que aumenta el tiempo de apertura palpebral.

| Variables zonales | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. Var. |
|-------------------------------|----------|---------------|---------------|--------------|-------------------|-------------------|
| SOM | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 38.29 | 56.41 | 48.04 | 4.11 | 8.54 |
| TAP 1 | 30 | 21.92 | 59.45 | 47.60 | 7.72 | 16.23 |
| TAP 2 | 40 | 11.28 | 51.48 | 32.85 | 11.59 | 35.29 |
| TAP 3 | 41 | 1.43 | 52.52 | 29.42 | 13.51 | 45.92 |
| TAP 4 | 36 | 1.85 | 54.46 | 36.22 | 13.04 | 35.99 |
| Area | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 121.23 | 838.40 | 368.31 | 182.02 | 49.42 |
| TAP 1 | 30 | 237.80 | 715.65 | 429.16 | 133.45 | 31.09 |
| TAP 2 | 40 | 288.67 | 716.50 | 508.78 | 114.03 | 22.41 |
| TAP 3 | 41 | 238.09 | 812.21 | 520.05 | 157.16 | 30.22 |
| TAP 4 | 36 | 245.45 | 1265.81 | 496.42 | 190.05 | 38.29 |
| Forma | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 0.51 | 0.89 | 0.68 | 0.07 | 10.80 |
| TAP 1 | 30 | 0.56 | 0.86 | 0.70 | 0.07 | 9.92 |
| TAP 2 | 40 | 0.61 | 0.86 | 0.75 | 0.07 | 8.75 |
| TAP 3 | 41 | 0.63 | 0.86 | 0.75 | 0.07 | 9.07 |
| TAP 4 | 36 | 0.53 | 0.83 | 0.71 | 0.07 | 9.65 |
| Tono | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 63.36 | 166.38 | 118.71 | 16.40 | 13.82 |
| TAP 1 | 30 | 89.44 | 119.52 | 103.43 | 7.88 | 7.62 |
| TAP 2 | 40 | 84.46 | 137.34 | 108.65 | 9.53 | 8.77 |
| TAP 3 | 41 | 80.00 | 133.39 | 103.22 | 11.68 | 11.31 |
| TAP 4 | 36 | 92.09 | 134.92 | 112.97 | 9.17 | 8.11 |
| Holes | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 0.00 | 0.80 | 0.38 | 0.26 | 66.73 |
| TAP 1 | 30 | 0.00 | 1.00 | 0.58 | 0.35 | 60.20 |
| TAP 2 | 40 | 0.00 | 0.80 | 0.34 | 0.30 | 86.72 |
| TAP 3 | 41 | 0.00 | 1.00 | 0.58 | 0.38 | 65.66 |
| TAP 4 | 36 | 0.00 | 1.00 | 0.44 | 0.33 | 76.55 |
| Uniones intercelulares | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 0.50 | 1.00 | 0.93 | 0.10 | 10.90 |
| TAP 1 | 30 | 0.58 | 1.00 | 0.90 | 0.11 | 12.48 |
| TAP 2 | 40 | 0.20 | 1.00 | 0.76 | 0.27 | 35.78 |
| TAP 3 | 41 | 0.08 | 1.00 | 0.81 | 0.26 | 32.15 |
| TAP 4 | 36 | 0.12 | 1.00 | 0.65 | 0.31 | 48.41 |

Tabla 3.53. Estadísticos descriptivos de las variables zonales principales. SOM: superficie ocupada por microproyecciones. N: número de zonas. Des. típ.: desviación típica. Coef. var.: coeficiente de variación.

Por su parte, la *forma* muestra un comportamiento diferente del resto de variables pues inician un ligero aumento (mayor tendencia a la circularidad de

las células en la media de las zonas) en los primeros TAP y luego parecen estabilizarse. La dispersión de esta variable se mantiene, aproximadamente, constante.

En cuanto a la variable *área*, los valores de su media aumentan a medida que aumenta el TAP, excepto en el TAP 4 donde disminuyen sin llegar a recuperar los valores del control. La dispersión es siempre menor que en el control. Su descenso es claro hasta llegar al TAP 2 pero en los siguientes tiempos de apertura aumenta ligeramente.

De nuevo, la variable *holes*, es la que presenta un comportamiento más errático pues, según estos resultados, no sigue un patrón definido.

Para ilustrar estas afirmaciones se presentan en las figuras 3.41 y 3.42 los gráficos de las variables principales de carácter objetivo y los de la variable *uniones intercelulares*.

Tanto en las gráficas de la figura 3.41 como en las de la figura 3.42, se puede observar como en el TAP 1 las variables se comportan de forma muy semejante al control. Sin embargo, en los TAP 2 y 3 inician un cambio que en el TAP 4 parece invertirse ligeramente, excepto para el caso de la variable *uniones intercelulares* cuyos valores se dispersan aún más y, por término medio, siguen disminuyendo.

En cuanto a los estadísticos descriptivos de las variables zonales subordinadas (ver tabla 3.54) muestran, en general, un claro paralelismo con los de sus variables principales correspondientes.

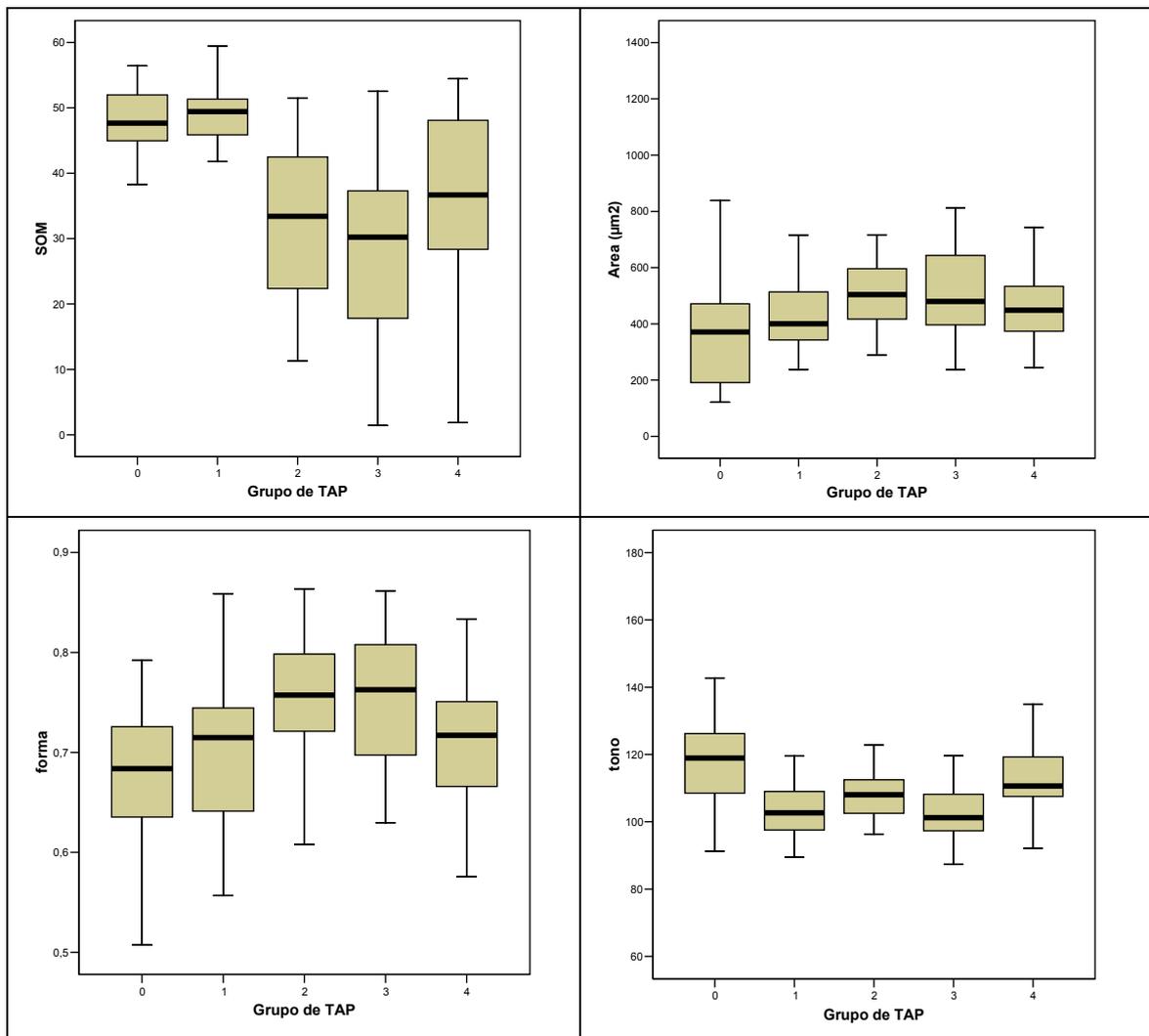


Figura 3.41. Gráficos de caja del comportamiento de las variables zonales SOM, área, forma y tono según el TAP.

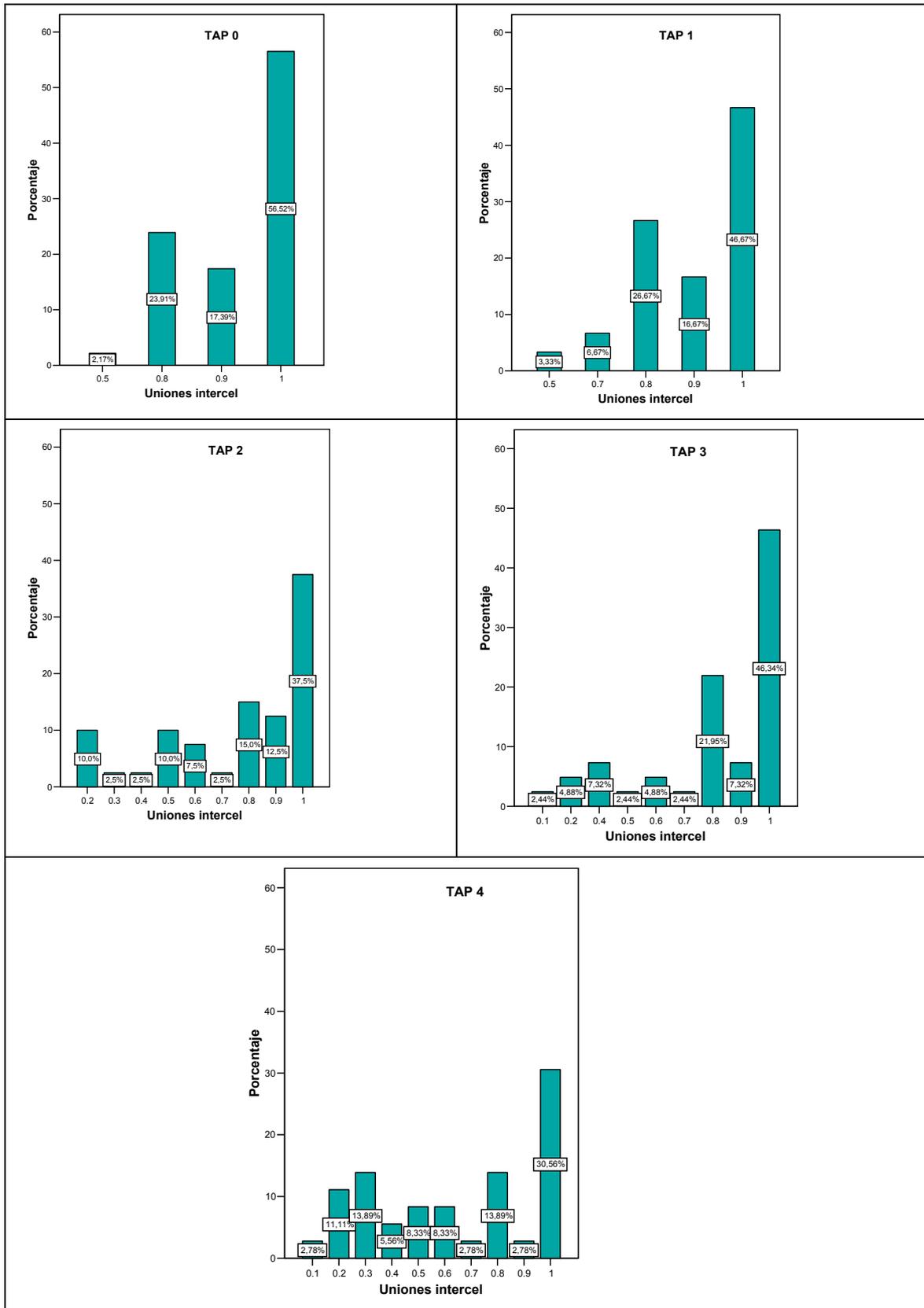


Figura 3.42a. Histogramas y gráficas de sectores de la variable zonal uniones intercelulares.

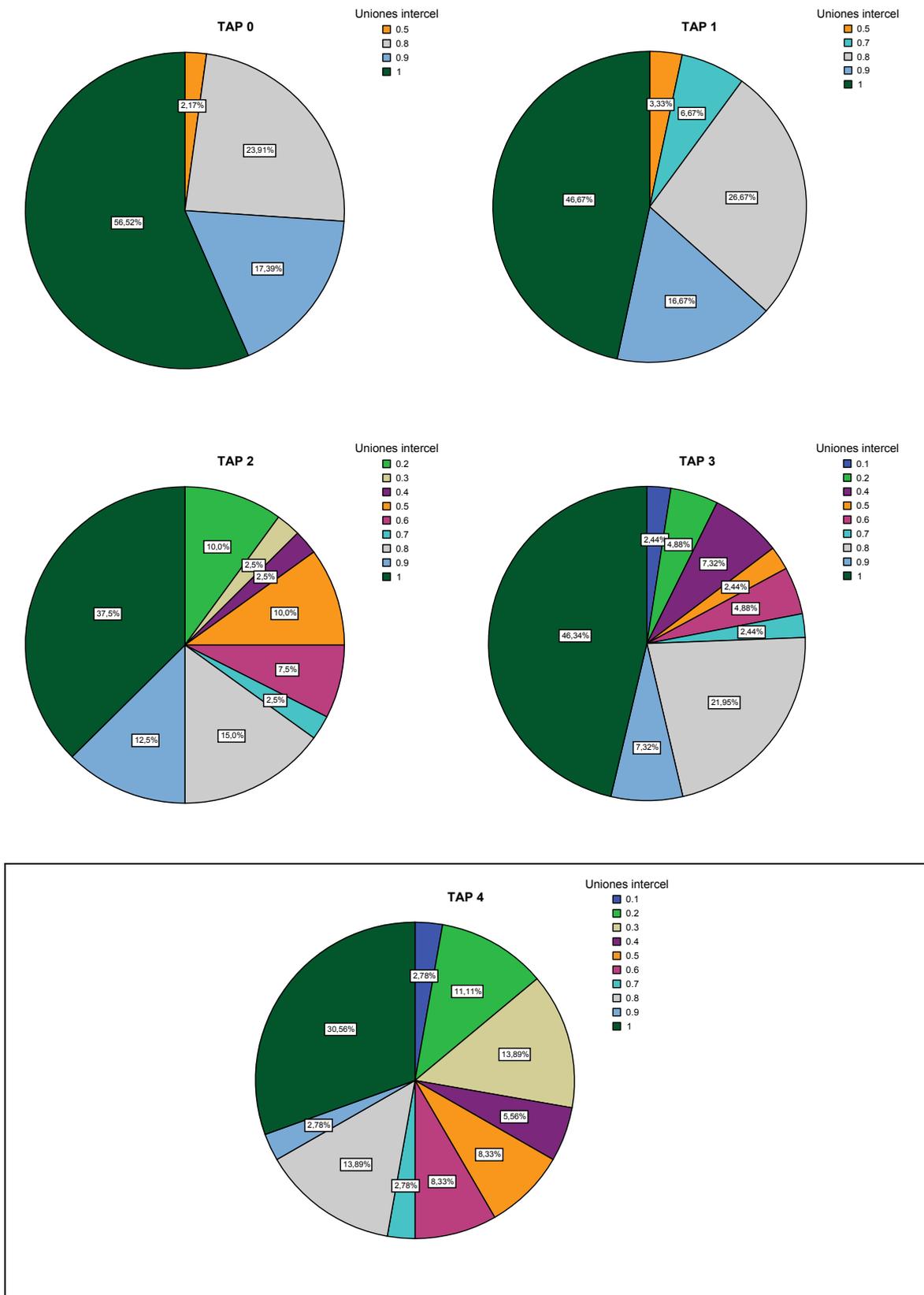


Figura 3.42b. Histogramas y gráficas de sectores de la variable zonal uniones intercelulares.

| | N | Mínimo | Máximo | Media | Desv. típ. | Coef. Var. |
|-------------------|----|--------|--------|-------|------------|------------|
| Cat SOM | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 0.60 | 1.00 | 0.84 | 0.10 | 11.73 |
| TAP 1 | 30 | 0.40 | 1.00 | 0.82 | 0.15 | 18.77 |
| TAP 2 | 40 | 0.08 | 0.93 | 0.50 | 0.25 | 50.87 |
| TAP 3 | 41 | 0.00 | 0.93 | 0.44 | 0.26 | 60.25 |
| TAP 4 | 36 | 0.00 | 1.00 | 0.62 | 0.26 | 41.79 |
| Cat tamaño | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 0.00 | 2.00 | 0.70 | 0.63 | 90.25 |
| TAP 1 | 30 | 0.00 | 2.00 | 0.93 | 0.58 | 62.50 |
| TAP 2 | 40 | 0.00 | 2.00 | 1.20 | 0.46 | 38.67 |
| TAP 3 | 41 | 0.00 | 2.00 | 1.22 | 0.61 | 50.26 |
| TAP 4 | 36 | 0.00 | 2.00 | 1.14 | 0.49 | 42.77 |
| Cat forma | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 0.00 | 0.50 | 0.18 | 0.15 | 82.95 |
| TAP 1 | 30 | 0.00 | 0.63 | 0.19 | 0.13 | 66.22 |
| TAP 2 | 40 | 0.00 | 0.67 | 0.29 | 0.17 | 57.93 |
| TAP 3 | 41 | 0.08 | 0.60 | 0.33 | 0.15 | 45.61 |
| TAP 4 | 36 | 0.00 | 0.50 | 0.23 | 0.12 | 52.45 |
| Cat tono | | | | | | |
| TAP 0 | 46 | 0.10 | 0.60 | 0.47 | 0.08 | 16.24 |
| TAP 1 | 30 | 0.30 | 0.50 | 0.46 | 0.07 | 14.29 |
| TAP 2 | 40 | 0.25 | 0.50 | 0.47 | 0.06 | 12.23 |
| TAP 3 | 41 | 0.25 | 0.50 | 0.48 | 0.06 | 13.06 |
| TAP 4 | 36 | 0.42 | 0.50 | 0.50 | 0.01 | 2.79 |

Tabla 3.54. Estadísticos descriptivos de las variables zonales subordinadas.

No obstante, existen algunas diferencias. Por ejemplo, *Cat tono* presenta una media casi constante mientras que la variable *tono* desciende, aunque no de forma clara, como ya se ha comentado (ver tabla 3.53). Sin embargo, la dispersión siempre muestra una importante tendencia a disminuir, tanto en la variable zonal principal como en la subordinada. Otra pequeña diferencia aparece en la variable *cat forma* que presenta una menor dispersión de los datos a medida que aumenta el TAP frente a una dispersión constante de la variable principal de la que depende.

Estudio de las relaciones entre variables zonales en función del TAP

Para establecer las posibles relaciones entre estas variables, se ha realizado un análisis de la correlación. Los resultados del mismo aparecen en las tablas 3.55 y 3.56.

| <i>Variables</i> | <i>SOM</i> | <i>Area</i> | <i>Forma</i> | <i>Tono</i> | <i>Uniones intercelulares</i> |
|-------------------------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------------------------------|
| SOM | 1 | | | | |
| Area | - 0,286** | 1 | | | |
| Forma | - 0,193** | 0,326** | 1 | | |
| Tono | 0,190** | - 0,162* | - 0,224** | 1 | |
| Uniones intercelulares | 0,280** | ----- | ----- | ----- | 1 |

Tabla 3.55. Correlaciones entre las variables zonales principales. SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

Las correlaciones entre pares de variables zonales principales, expuestas en la tabla 3.55 son, de nuevo, análogas a las observadas con la muestra de todas las células. Sin embargo, todas las correlaciones significativas poseen coeficientes más bajos que los hallados entre las células.

Debido al carácter binario de la variable *holes* celular (el valor de la variable *holes* zonal se calcula promediando los valores de la variable *holes* de cada una de las células integrantes de una zona), es necesario establecer un método que permita determinar las posibles relaciones no lineales entre esta variable, el TAP y el resto de variables zonales principales.

Con este fin se ha calculado un modelo predictivo (basado en una regresión logística), como ya se hizo anteriormente con las variables celulares, con el que se puede establecer si el tiempo de apertura palpebral y las alteraciones que este produce en las características morfológicas de una zona tienen relación con el hecho de que esta presente un valor determinado en la variable *holes*.

Los resultados de la regresión logística de la variable zonal *holes* contra el TAP y el resto de variables principales muestran un modelo con ajuste adecuado ($\chi^2_{120}=225.562$ con un nivel de significación de 0.000). Las variables en la ecuación son: TAP (nivel de significación de 0.000), *SOM* (nivel de significación de 0.004) y *uniones intercelulares* (nivel de significación de 0.002). Las variables *tono*, *área* y *forma* no son estadísticamente significativas por lo que su influencia en el modelo es despreciable ($p>0,05$).

De estos resultados se desprende que la variable zonal *holes* posee cierta relación con el TAP y con aquellas variables que mejor describen el tiempo de apertura palpebral, como son *SOM* y *uniones intercelulares* (ver más adelante la tabla 3.58). Por todo ello, parece que la proporción de células con *holes* o sin *holes* que presenta una zona podría ser un factor determinante para establecer el estado del epitelio, como ya se comentó en el caso de las células.

En cuanto a la relación entre las variables zonales principales y las subordinadas, igual que en las células, el coeficiente más alto aparece entre *cat SOM* y *SOM* (ver tabla 3.56) y el más bajo entre *cat tono* y *tono*. Los coeficientes son siempre más bajos que en los datos celulares, aunque la correlación entre todos los pares de variables es significativa ($p<0,01$).

Por su parte las variables subordinadas muestran unas correlaciones (ver tabla 3.57) análogas a las observadas entre las variables principales de las que derivan, excepto para el caso de *cat tono* que no presenta ninguna correlación significativa con el resto de variables.

| Cat SOM/SOM | Cat tamaño/area | Cat forma/forma | Cat tono/tono |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------|
| 0,982** | 0,612** | 0,672** | 0,410** |

Tabla 3.56. Correlaciones entre variables zonales principales y subordinadas. ** Nivel de significación de 0,01. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

| <i>Variables</i> | <i>Cat SOM</i> | <i>Cat tamaño</i> | <i>Cat forma</i> | <i>Cat tono</i> |
|-------------------|----------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Cat SOM | 1 | | | |
| Cat tamaño | - 0,271** | 1 | | |
| Cat forma | - 0,167* | 0,435** | 1 | |
| Cat tono | ----- | ----- | ----- | 1 |

Tabla 3.57. Correlaciones entre variables subordinadas de todos los TAP.** Nivel de significación de 0,01. * Nivel de significación de 0,05. SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

Además, los coeficientes de las correlaciones estadísticamente significativas son más bajos entre las variables subordinadas que entre las principales, menos para la correlación *cat forma* frente a *cat tamaño* (*cat forma / cat tamaño* posee un coeficiente de 0,435 y en *forma / área* es de 0,326, al comparan los datos de la tabla 3.55 con la 3.57).

Este comportamiento descrito para las variables subordinadas zonales presenta, a su vez, cierto paralelismo con el comportamiento de dichas variables en la muestra de células, comentado en el subapartado anterior. Las diferencias aparecen sobre todo en la variable *cat tono* (contrariamente a su variable zonal, la variable *cat tono* celular sí posee correlaciones significativas con *cat SOM*, *cat tamaño* y *cat forma*) y en los coeficientes de correlación que son más bajos en las zonas.

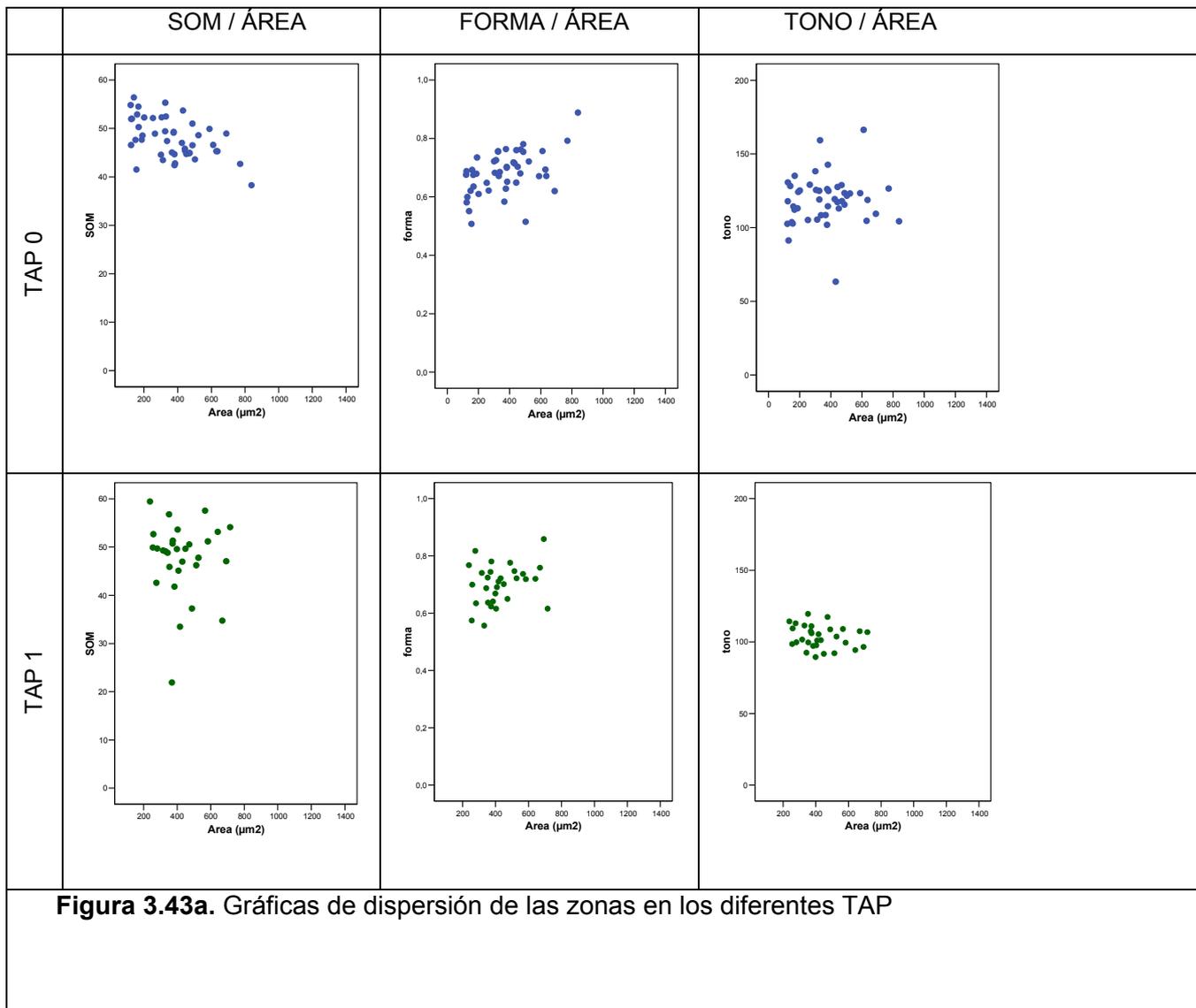
En cuanto a las correlaciones entre el TAP y las variables zonales principales (expuestas en la tabla 3.58), se muestran significativas para todos los pares.

| | SOM | Area | Forma | Tono | Uniones intercelulares |
|------------|------------|-------------|--------------|-------------|-------------------------------|
| TAP | - 0,468** | 0,310** | 0,216** | - 0,185* | -0,380** |

Tabla 3.58. Correlaciones entre las variables zonales principales y el tiempo de apertura palpebral. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Estos resultados coinciden con los obtenidos entre las variables celulares y el TAP pero los valores absolutos de los coeficientes son algo más altos al comparar zonas.

En la figura 3.43 se presentan diferentes gráficas de dispersión que ilustran las correlaciones entre las variables zonales numéricas y el TAP. En ella puede observarse como a medida que el TAP aumenta *SOM* tiene tendencia a disminuir (coeficiente de correlación de *SOM* frente a TAP de $-0,468$ según la tabla 3.58) y hay un incremento de zonas con células cuya media de tamaño es grande en detrimento de las zonas con media de tamaño celular pequeño (coeficiente de correlación de *área* frente a TAP de $0,310$ según la tabla 3.58).



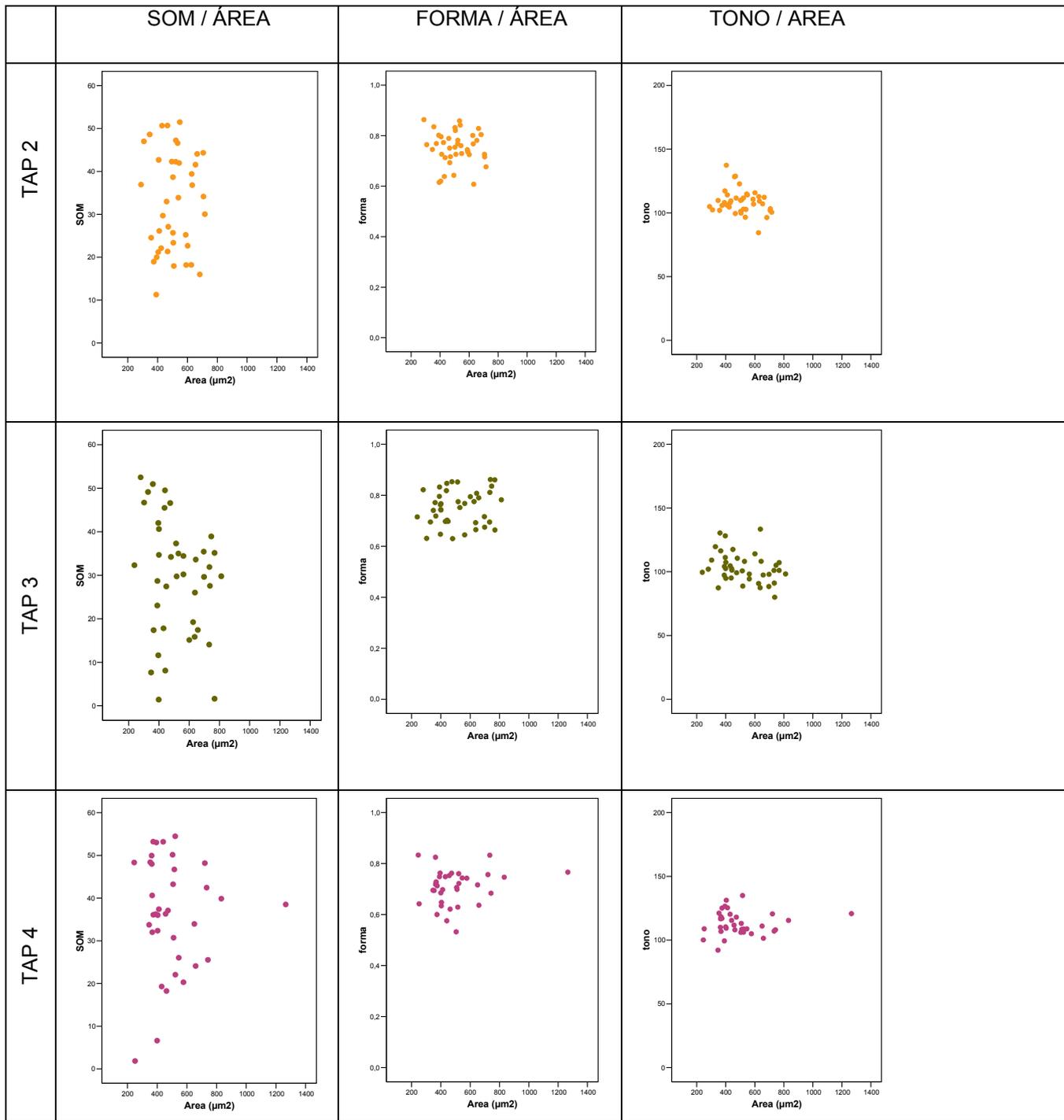


Figura 3.43b. Gráficas de dispersión de las zonas en los diferentes TAP

En cuanto a la media de las formas celulares en las zonas, existe un ligero aumento de zonas con células más redondeadas (valores de *forma* más altos) en los tiempos de apertura palpebral más largos (coeficiente de correlación entre *forma* y TAP de 0,216 según la tabla 3.58).

Por último, el tono de las zonas se hace más uniforme y presenta una ligera tendencia hacia los valores oscuros (más bajos) a partir del TAP 1 (coeficiente de correlación entre tono y TAP de -0,185 según la tabla 3.58)

Por su parte, las correlaciones entre el tiempo de apertura palpebral y las variables zonales subordinadas (ver tabla 3.59) muestran coeficientes con valores absolutos más bajos que los hallados para las variables principales, excepto en el caso de la variable *cat forma*. Además, la variable *cat tono* no se correlaciona significativamente con el TAP.

| | <i>Cat SOM</i> | <i>Cat tamaño</i> | <i>Cat forma</i> | <i>Cat tono</i> |
|-----|----------------|-------------------|------------------|-----------------|
| TAP | - 0,457** | 0,295** | 0,239** | ----- |

Tabla 3.59. Correlaciones entre las variables zonales subordinadas y el TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Si comparamos los datos zonales con los obtenidos en las células, los valores absolutos de los coeficientes de las correlaciones entre variables subordinadas y el TAP son más altos que los que presentan estas mismas variables en la muestra de células, como en el caso de las variables principales. Por lo tanto, podríamos decir que, en general, las correlaciones respecto al TAP mejoran si los datos son zonales.

Estudio de la tendencia central de las variables zonales principales en función del TAP

De nuevo, para comparar la tendencia central de las variables zonales principales se ha utilizado, primero, el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov, analizando, así, la normalidad de la distribución de dichas variables. Gracias a este test se ha rechazado la normalidad en la distribución de *SOM*, *holes* y *uniones intercelulares*.

Con los valores del resto de las variables (variables con distribución normal) se ha llevado a cabo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), tomando como factor el TAP. El ANOVA ha establecido la existencia de diferencias significativas para todos los grupos de TAP en todas las variables (ver tabla 3.60).

| | Area | Forma | Tono |
|----------------------|-------|-------|--------|
| | 6,944 | 8,399 | 12,835 |
| Significación | 0,000 | 0,000 | 0,000 |

Tabla 3.60. Resultados del ANOVA para el factor TAP en la muestra de zonas.

Con el test de Scaffé (tabla 3.61) se han determinado diferencias significativas en la tendencia central del área de las zonas control y el resto de TAP, excepto entre el control y el TAP 1. Parece, pues, que el área celular aumenta rápidamente entre el TAP 0 y el 2 y se mantiene sin cambios significativos. Para la *forma* sólo hay diferencias significativas entre el TAP cero y el 2 y el cero y el tres. Por lo tanto, el TAP más alto no posee una tendencia central en la forma estadísticamente diferente del control.

| Grupos | Area | Forma | Tono |
|--------------|---------|---------|---------|
| TAP 0/ TAP 1 | ----- | ----- | 0.000** |
| TAP 0/ TAP 2 | 0.003** | 0.001** | 0.004** |
| TAP 0/ TAP 3 | 0.001** | 0.000** | 0.000* |
| TAP 0/ TAP 4 | 0.013* | ----- | ----- |
| TAP 1/ TAP 2 | ----- | ----- | ----- |
| TAP 1/ TAP 3 | ----- | ----- | ----- |
| TAP 1/ TAP 4 | ----- | ----- | 0.032* |
| TAP 2/ TAP 3 | ----- | ----- | ----- |
| TAP 2/ TAP 4 | ----- | ----- | ----- |
| TAP 3/ TAP 4 | ----- | ----- | 0.012* |

Tabla 3.61. Resultados del test de Scheffé para la comparación interTAP de las variables de distribución normal. ----- No hay diferencias significativas *Nivel de significación de $p < 0,05$; **Nivel de significación de $p < 0,01$.

En cuanto al *tono*, existen diferencias significativas en todos los TAP frente al control, excepto el TAP 4. Además, el TAP 1 frente al 4 y el TAP 3 frente al 4 poseen, también, zonas de tonos estadísticamente diferentes. De este modo, el tono medio de las zonas presenta un patrón de diferencias más irregular.

Por su parte, las variables zonales cuya distribución no es normal han sido sometidas al test de Kruskal-Wallis. Los resultados de dicho test indican que hay diferencias significativas en la tendencia central de todas las variables no normales (*SOM, holes y uniones intercelulares*) según el TAP.

Las comparaciones de pares de grupos realizadas mediante el test de U-Mann-Whitney (ver tabla 3.62) muestran diferencias muy significativas (nivel de significación de $p < 0.01$) en la variable *SOM* al comparar grupos de TAP bajos (TAP 0 y TAP 1) con grupos de TAP altos (2,3 y 4) y diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el TAP 3 y el 4. Por su parte la variable *uniones intercelulares* muestra diferencias significativas (con diferentes niveles de significación) entre los TAP más extremadamente alejados (al comparar el TAP cero y los TAP 2,3 y 4 y entre el TAP 1 y el 4) y también entre el TAP 3 y el 4. A la vista de estos datos podríamos afirmar que las uniones celulares se deterioran más lentamente que las microproyecciones aunque las dos variables sufren cambios entre los dos TAP más altos (TAP 3 y TAP 4).

Los *holes* muestran, como siempre, un comportamiento bastante errático con alternancia de diferencias significativas y no significativas entre los pares de TAP por lo que no parecen seguir un patrón concreto.

Reagrupando los resultados de las tablas 3.61 y 3.62 podríamos decir que, por zonas, el TAP con más diferencias significativas respecto del control es el TAP 3. Por su parte el TAP 4 sólo presenta diferencias estadísticamente significativas frente al control en *SOM, área y uniones intercelulares*. El TAP más parecido al control es, como cabía esperar, el TAP 1.

| Grupos | SOM | Holes | Uniones intercelulares |
|--------------|---------|---------|------------------------|
| TAP 0/ TAP 1 | ----- | 0.008** | ----- |
| TAP 0/ TAP 2 | 0.000** | ----- | 0.002** |
| TAP 0/ TAP 3 | 0.000** | 0.006** | 0.031* |
| TAP 0/ TAP 4 | 0.000** | ----- | 0.000** |
| TAP 1/ TAP 2 | 0.000** | 0.004** | ----- |
| TAP 1/ TAP 3 | 0.000** | ----- | ----- |
| TAP 1/ TAP 4 | 0.000** | ----- | 0.001** |
| TAP 2/ TAP 3 | ----- | 0.003** | ----- |
| TAP 2/ TAP 4 | ----- | ----- | ----- |
| TAP 3/ TAP 4 | 0.016* | ----- | 0.020* |

Tabla 3.62. Resultados del test de U-Mann-Whitney para la comparación interTAP de las variables con distribución no normal. ----- No hay diferencias significativas. **Nivel de significación de $p < 0,01$. *Nivel de significación de $p < 0,05$. SOM: superficie ocupada por microproyecciones

Los tiempos de apertura más altos (TAP 2, 3 y 4) presentan tendencias centrales con muy pocas diferencias significativas. En cuanto al TAP 1, parece diferenciarse de los TAP superiores, básicamente, en la *superficie ocupada por microproyecciones*, aunque frente al TAP 4 muestra también diferencias significativas en las *uniones intercelulares*.

En definitiva, el análisis estadístico muestra como, de forma análoga a las células, el tiempo de apertura palpebral provoca un deterioro de las diferentes zonas del epitelio corneal central. Dicha alteración se basa, sobre todo, en una rápida disminución de la densidad de las microproyecciones celulares y en una, relativamente, más lenta pérdida de las uniones intercelulares. Además el área celular parece que va aumentando hasta llegar al TAP 2, a partir del cual se mantiene alta. El tono y la forma también cambian pero con un patrón poco definido.

Predicción del tiempo de apertura palpebral en base a la morfología zonal

Para establecer la capacidad de predicción del TAP en función de las diferentes variables zonales, se han calculado, como se hizo con los datos celulares, cuatro modelos estadísticos predictivos. Con ellos se pretende pronosticar el TAP de una córnea en base a las características morfológicas de una zona concreta.

Estos modelos se han confeccionado mediante una regresión logística tomando como categorías dependientes los tiempos de apertura palpebral y como covariables a las diferentes variables previamente descritas. De este modo, se han calculado dos modelos predictivos con las variables principales (uno con cinco categorías de TAP y otro con dos) y, análogamente, dos con las variables subordinadas. El objetivo de estos modelos es establecer la probabilidad de que una zona haya sido sometida a un TAP determinado. El pronóstico recaerá en el TAP que tenga asignada una probabilidad más alta.

Las características morfológicas de las zonas, en los diferentes modelos que se expondrán a continuación, se han descrito basándose en el mismo criterio que ya se utilizó en los modelos predictivos celulares. Este, establece una serie de categorías según el valor que muestran las variables zonales en cada caso. (Dicho criterio está en concordancia con los utilizados para definir las categorías de las variables principales de carácter subjetivo y las variables subordinadas)

De este modo, se ha considerado que una zona con un valor de SOM superior al 40% posee una elevada densidad de microproyecciones, un valor inferior a 30% es una densidad baja e inferior al 10% es muy baja. Un área zonal grande se ha considerado mayor que $600\mu\text{m}^2$ y un área pequeña menor que $200\mu\text{m}^2$. La forma se ha identificado como poligonal si el valor de la variable es menor que 0,8 y circular si es mayor que 0,9. En cuanto al tono, se considerará claro si es mayor que 179 y oscuro si es menor que 179. Las uniones intercelulares estarán intactas o casi intactas si su categoría es de 1, 0,8 ó 0.7; alteradas si

su categoría es menor que 0.6; muy alteradas si es de 0,2 e inexistentes si es de 0.

Modelo predictivo con las variables zonales principales y cinco categorías de TAP

El primer modelo con los datos zonales se ha calculado en base a las variables principales, tomando como categorías dependientes a los cinco tiempos de apertura palpebral, véase, TAP 0, TAP 1, TAP 2, TAP 3 y TAP 4. Dicho modelo presenta un ajuste adecuado ($\chi^2_{24} = 193.997$ con un nivel de significación de 0,000) y predice correctamente el TAP en el 60.1% de las zonas. El tiempo de apertura palpebral que aparece mejor pronosticado es el TAP 0 y los peores son el TAP 2 y el TAP 4. (Ver tabla 3.63)

| Observado | Pronosticado | | | | | Porcentaje correcto |
|-------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|---------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 0 | 36 | 5 | 3 | 1 | 1 | 78.3% |
| 1 | 4 | 20 | 3 | 1 | 2 | 66.7% |
| 2 | 5 | 3 | 18 | 8 | 6 | 45.0% |
| 3 | 1 | 3 | 5 | 26 | 6 | 63.4% |
| 4 | 6 | 2 | 7 | 5 | 16 | 44.4% |
| Porcentaje global | 26.9% | 17.1% | 18.7% | 21.2% | 16.1% | 60.1% |

Tabla 3.63. Resultados del pronostico realizado por el modelo zonal para cinco TAP

Las variables incluidas en la ecuación son: *SOM*, *tono*, *holes* y *uniones intercelulares* aparecen en la tabla 3.64 con su nivel de significación. El *área* y la *forma* no son estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por lo que su influencia en el modelo es despreciable.

Las estimaciones de los parámetros para cada tiempo de apertura se presentan agrupadas en la tabla 3.65 (la categoría de referencia es TAP 0). Como puede observarse, ninguna de las variables es significativa en todos los TAP. La *superficie ocupada por microproyecciones (SOM)* es significativa en todos los TAP excepto en el TAP 1 y *uniones intercelulares* sólo es significativa en el TAP 4. De ello se deduce que las uniones intercelulares se alteran más lentamente que la densidad de microproyecciones.

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|------------------------|-----------------------------|
| SOM | 0,000** |
| Área | 0,190 |
| Forma | 0,227 |
| Tono | 0,000** |
| Holes | 0,000** |
| Uniones intercelulares | 0,000** |

Tabla 3.64. Variables en la ecuación que describe el modelo zonal para cinco TAP. ** Nivel de significación de $p < 0,01$; RV: razón de verosimilitud. SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

Las predicciones acertadas con una elevada probabilidad (ver ejemplos en la tabla 3.66) aparecen en zonas con características morfológicas que el modelo considera típicas de un TAP determinado, motivo por el cual les ha asignado esa alta probabilidad (ver los valores de las variables de estas zonas en la tabla 3.67). Estudiando estos casos se han podido establecer las características típicas de cada tiempo de apertura, según el modelo.

Las zonas típicas del TAP 0 poseen una elevada densidad de microproyecciones, área celular media de tamaño intermedio, forma celular media poligonal, tono medio, células con y sin *holes* en proporción parecida y uniones intercelulares intactas.

En cuanto a las zonas del TAP 1 son zonas con una densidad de microproyecciones elevada, área celular media de tamaño mediano a grande, forma celular media poligonal, tono intermedio (algo más oscuro que en las zonas del TAP 0), con las uniones intercelulares casi intactas y con zonas donde predominan claramente las células con *holes* y otras donde lo hacen las células sin *holes*.

| Grupo de TAP(a) | VARIABLES en la ecuación | B | Sig. (Wald) |
|-----------------|--------------------------|--------|-------------|
| TAP 1 | Intersección | 12.955 | 0.009** |
| | SOM | 0.039 | 0.458 |
| | Area | 0.002 | 0.264 |
| | Forma | 0.546 | 0.901 |
| | Tono | -0.122 | 0.000** |
| | Holes | 2.133 | 0.042* |
| | Uniones intercelulares | -4.423 | 0.071 |
| TAP 2 | Intersección | 6.536 | 0.174 |
| | SOM | -0.152 | 0.001** |
| | Area | 0.002 | 0.249 |
| | Forma | 7.032 | 0.135 |
| | Tono | -0.036 | 0.150 |
| | Holes | 2.228 | 0.039* |
| | Uniones intercelulares | -3.618 | 0.098 |
| TAP 3 | Intersección | 13.270 | 0.012* |
| | SOM | -0.211 | 0.000** |
| | Area | 0.001 | 0.611 |
| | Forma | 4.564 | 0.362 |
| | Tono | -0.074 | 0.012* |
| | Holes | 5.201 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -3.234 | 0.163 |
| TAP 4 | Intersección | 10.269 | 0.029* |
| | SOM | -0.116 | 0.013* |
| | Area | 0.005 | 0.035* |
| | Forma | -1.906 | 0.687 |
| | Tono | -0.016 | 0.507 |
| | Holes | 4.141 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -7.289 | 0.001** |

Tabla 3.65. Estimaciones de los parámetros zonales para cada categoría de TAP. (a). La categoría de referencia es: TAP 0. * Nivel de significación de $p < 0,05$; **Nivel de significación de $p < 0,01$. SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

Por su parte, una típica zona del TAP 2 queda definida como un área epitelial con una densidad de microproyecciones baja, área celular media de tamaño mediano, forma celular media pseudopoligonal, tono intermedio, sin *holes* y con uniones intercelulares intactas o ligeramente dañadas.

| <i>Célula</i> | <i>TAP</i> | <i>PTAP 0</i> | <i>PTAP 1</i> | <i>PTAP 2</i> | <i>PTAP 3</i> | <i>PTAP 4</i> | <i>Grupo Asignado</i> |
|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| C02i_6 | 0 | 0.94 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.02 | 0 |
| C02i_22 | 0 | 0.96 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.02 | 0 |
| C03d_5 | 0 | 0.92 | 0.02 | 0.04 | 0.00 | 0.02 | 0 |
| C12i_17 | 1 | 0.05 | 0.79 | 0.04 | 0.08 | 0.03 | 1 |
| C22i_3 | 1 | 0.02 | 0.87 | 0.02 | 0.03 | 0.06 | 1 |
| C22i_11 | 1 | 0.26 | 0.65 | 0.03 | 0.01 | 0.05 | 1 |
| C11i_1a | 2 | 0.06 | 0.02 | 0.65 | 0.26 | 0.02 | 2 |
| C11i_10 | 2 | 0.08 | 0.01 | 0.63 | 0.19 | 0.09 | 2 |
| C13d_E | 2 | 0.01 | 0.01 | 0.69 | 0.21 | 0.08 | 2 |
| C14i_8a | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 0.94 | 0.02 | 0 |
| C16i_10 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.89 | 0.04 | 0 |
| C16i_14 | 3 | 0.00 | 0.00 | 0.06 | 0.92 | 0.01 | 0 |
| C20d_5 | 4 | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.03 | 0.93 | 4 |
| C20i_12 | 4 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.01 | 0.96 | 4 |
| C21d_17 | 4 | 0.02 | 0.03 | 0.11 | 0.02 | 0.81 | 4 |

Tabla 3.66. Ejemplos de pronósticos acertados con elevada probabilidad en la regresión logística por zonas con cinco categorías de TAP. TAP: tiempo de apertura palpebral. PTAP: probabilidad pronosticada para un TAP determinado.

Las zonas características del TAP 3 poseen la densidad de microproyecciones más baja de todas las zonas tipo. Presentan, además, áreas celulares medias que podrían clasificarse como grandes o medianas-grandes. La forma de las células es poligonal o pseudopoligonal, tono intermedio-oscuro con *holes* y uniones intactas o casi intactas.

Por último, las zonas más típicas del TAP 4, según el modelo, muestran una densidad de microproyecciones intermedia, área mediana o grande, formas poligonales, tono intermedio (de media más alto que en los TAP anteriores), con valores diversificados en la variable *holes* y unas uniones intercelulares muy dañadas.

En la tabla 3.68 aparecen expuestas las características morfológicas más relevantes de las zonas más típicas de cada tiempo de apertura palpebral.

| Células | PTAP | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones I. |
|---------------------|---------------|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------------|
| TAP 0 | PTAP 0 | | | | | | |
| C02i_6 | 0.94 | 51.0 | 487 | 0.700 | 143 | 0.2 | 1.0 |
| C02i_22 | 0.96 | 55.3 | 327 | 0.672 | 159 | 0.5 | 1.0 |
| C03d_5 | 0.92 | 44.6 | 301 | 0.652 | 125 | 0.5 | 1.0 |
| TAP 1 | PTAP 1 | | | | | | |
| C12i_17 | 0.79 | 52.6 | 258 | 0.747 | 92.1 | 0.8 | 0.8 |
| C22i_3 | 0.87 | 53.1 | 642 | 0.669 | 89.4 | 0.8 | 0.9 |
| C22i_11 | 0.65 | 49.9 | 255 | 0.575 | 98.5 | 0.2 | 0.7 |
| TAP 2 | PTAP 2 | | | | | | |
| C11i_1 ^a | 0.65 | 25.7 | 503 | 0.832 | 101 | 0.0 | 1.0 |
| C11i_10 | 0.63 | 25.2 | 588 | 0.745 | 111 | 0.0 | 0.9 |
| C13d_E | 0.69 | 23.4 | 505 | 0.864 | 105 | 0.0 | 0.6 |
| TAP 3 | PTAP 3 | | | | | | |
| C14i_8a | 0.94 | 17.4 | 365 | 0.768 | 94.4 | 1.0 | 0.9 |
| C16i_10 | 0.89 | 17.4 | 657 | 0.790 | 97.4 | 1.0 | 0.9 |
| C16i_14 | 0.92 | 15.9 | 636 | 0.818 | 95.1 | 1.0 | 1.0 |
| TAP 4 | PTAP 4 | | | | | | |
| C20d_5 | 0.93 | 25.5 | 742 | 0.533 | 106 | 0.3 | 0.2 |
| C20i_12 | 0.96 | 36.3 | 457 | 0.629 | 135 | 0.7 | 0.2 |
| C21d_17 | 0.81 | 33.7 | 346 | 0.600 | 117 | 0.0 | 0.2 |

Tabla 3.67. Características de las zonas típicas de cada TAP según la regresión logística con cinco categorías de TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones. PTAP: probabilidad pronosticada para un TAP determinado.

Como puede observarse, las características de las zonas típicas de cada tiempo de apertura palpebral, propuestas por este modelo predictivo, concuerdan, en líneas generales, con los resultados obtenidos hasta ahora. Las variables que más claramente parecen modificarse por acción del TAP son, como en el caso de las células, la variable *SOM* y la variable *uniones intercelulares*.

Los pronósticos erróneos, con una elevada probabilidad asignada muestran la variabilidad entre zonas de un mismo TAP y confirman el criterio discriminatorio establecido por el modelo para diferenciar un TAP concreto del resto. En la tabla 3.69 aparecen algunos ejemplos cuyas variables se exponen en la tabla 3.70.

| TAP | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|--------------|-----------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------------|
| TAP 0 | Elevada | Mediana | Poligonal | Intermedio | Con y sin <i>holes</i> | Intactas |
| TAP 1 | Elevada | Mediana o grande | Poligonal | Intermedio - oscuro | Con o sin <i>holes</i> | Casi intactas |
| TAP 2 | Baja | Mediana | Pseudopoligonales | Intermedio | Sin <i>holes</i> | Intactas o ligeramente dañadas |
| TAP 3 | Baja o muy baja | Medianas o grandes | Poligonal o pseudopoligonal | Intermedio - oscuro | Con <i>holes</i> | Intactas o casi intactas |
| TAP 4 | Intermedia | Mediana o grande | Poligonal | Intermedio | Con o sin <i>holes</i> | Muy dañadas |

Tabla 3.68. Características morfológicas de las zonas en cada TAP según la regresión logística con cinco TAP.

Las zonas del TAP 0 cuya predicción es errónea con una alta probabilidad asignada son zonas de densidad de microproyecciones relativamente alta, áreas intermedias ó pequeñas, formas poligonales tonos medios u oscuros, con cierta tendencia a poseer más células con *holes* que sin y uniones intercelulares cerca de la normalidad o algo alteradas. A estas zonas se les asigna un TAP 1, siendo esta la asignación errónea más frecuente en el TAP 0.

Los errores más marcados en la predicción del TAP 1 aparecen en dos tipos de zonas, cuya principal diferencia es la densidad de las microproyecciones. El primer tipo muestra una densidad muy alta y el modelo las confunde con zonas del TAP 0. El segundo tipo de zonas posee una densidad intermedia a baja y se le asigna, de forma errónea, un TAP 2. Las uniones son, en los dos casos, perfectas o casi perfectas.

| <i>Célula</i> | <i>TAP</i> | <i>PTAP 0</i> | <i>PTAP 1</i> | <i>PTAP 2</i> | <i>PTAP 3</i> | <i>PTAP 4</i> | <i>Grupo Asignado</i> |
|----------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------------|
| C0i_17a | 0 | 0.00 | 0.91 | 0.01 | 0.07 | 0.01 | 1 |
| C04d_10 | 0 | 0.08 | 0.05 | 0.20 | 0.05 | 0.62 | 4 |
| C04i_18 | 0 | 0.24 | 0.71 | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 1 |
| C18d_17 ^a | 1 | 0.10 | 0.09 | 0.53 | 0.09 | 0.19 | 2 |
| C18i_9a | 1 | 0.90 | 0.08 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0 |
| C18i_13 ^a | 1 | 0.82 | 0.17 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0 |
| C11d_10 ^a | 2 | 0.00 | 0.01 | 0.09 | 0.16 | 0.73 | 4 |
| C13i_21 | 2 | 0.00 | 0.00 | 0.25 | 0.64 | 0.10 | 3 |
| C13i_82 | 2 | 0.64 | 0.03 | 0.06 | 0.01 | 0.26 | 0 |
| C14d_13 | 3 | 0.05 | 0.78 | 0.08 | 0.05 | 0.04 | 1 |
| C15d_8 | 3 | 0.01 | 0.11 | 0.25 | 0.10 | 0.53 | 4 |
| C16d_13 | 3 | 0.00 | 0.07 | 0.26 | 0.15 | 0.52 | 4 |
| C19d_9 | 4 | 0.56 | 0.20 | 0.12 | 0.05 | 0.08 | 0 |
| C19d_18 | 4 | 0.02 | 0.02 | 0.53 | 0.15 | 0.28 | 2 |
| C21d_21 | 4 | 0.00 | 0.00 | 0.28 | 0.62 | 0.09 | 3 |

Tabla 3.69. Ejemplos de pronósticos erróneos con elevada probabilidad en la regresión logística por zonas con cinco categorías de TAP. TAP: tiempo de apertura palpebral. PTAP: probabilidad pronosticada para un TAP determinado

Por lo que respecta a los fallos de predicción en el TAP 2, suelen aparecer en zonas con baja densidad de microproyecciones (*SOM*), tamaño intermedio, forma poligonal, tono medio, con una pequeña mayoría de células con *holes*. Las uniones intercelulares están deterioradas o muy deterioradas. A este tipo de zonas la regresión logística les asigna un TAP 3 ó 4. Además las zonas del TAP 2 también pueden confundirse con el TAP 0. En este caso son zonas que poseen una densidad de microproyecciones alta y mantienen intactas o casi intactas sus uniones.

Las zonas del TAP 3 cuya asignación ha sido errónea con una elevada probabilidad asignada, se pueden agrupar, como ya sucedía en el TAP 2, en dos grupos diferentes. El primero, básicamente, incluye zonas de densidad de microproyecciones intermedia-alta y uniones intercelulares casi intactas y el modelo les asigna un TAP 1. El segundo grupo de zonas poseen una densidad de microproyecciones intermedia-baja y unas uniones intercelulares bastante o muy alteradas. En este caso el modelo les asigna erróneamente el TAP 4.

Cabe puntualizar que la regresión logística asigna una probabilidad casi nula de pertenencia al TAP 0 en casi todas las zonas del TAP 3 y sólo en una ocasión los confunde. De este modo, el modelo parece diferenciar bastante bien estos dos TAP.

| Células | Grupo Asignado | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|----------------------|-----------------------|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|--------------------------|
| TAP 0 | | | | | | | |
| C0i_17 ^a | 1 | 47.0 | 425 | 0.714 | 63.4 | 0.8 | 0.8 |
| C04d_10 | 4 | 44.7 | 452 | 0.764 | 126 | 0.5 | 0.5 |
| C04i_18 | 1 | 53.1 | 129 | 0.600 | 91.3 | 0.8 | 0.9 |
| TAP 1 | | | | | | | |
| C18d_17 ^a | 2 | 34.7 | 669 | 0.759 | 107 | 0.2 | 0.9 |
| C18i_9 ^a | 0 | 56.8 | 352 | 0.650 | 117 | 0.0 | 0.8 |
| C18i_13 ^a | 0 | 59.5 | 238 | 0.557 | 111 | 0.0 | 1.0 |
| TAP 2 | | | | | | | |
| C11d_10a | 4 | 29.7 | 435 | 0.713 | 109 | 0.7 | 0.2 |
| C13i_21 | 3 | 18.18 | 591 | 0.842 | 103 | 0.6 | 0.6 |
| C13i_82 | 0 | 48.6 | 347 | 0.620 | 137 | 0.5 | 0.8 |
| TAP 3 | | | | | | | |
| C14d_13 | 1 | 46.6 | 475 | 0.741 | 87.4 | 0.3 | 0.8 |
| C15d_8 | 4 | 30.2 | 562 | 0.645 | 98.2 | 0.0 | 0.4 |
| C16d_13 | 4 | 34.7 | 400 | 0.852 | 101 | 0.4 | 0.1 |
| TAP 4 | | | | | | | |
| C19d_9 | 0 | 53.0 | 394 | 0.762 | 119 | 0.7 | 1.0 |
| C19d_18 | 2 | 26.0 | 545 | 0.743 | 109 | 0.0 | 0.5 |
| C21d_21 | 3 | 6.60 | 399 | 0.696 | 92.1 | 0.0 | 0.4 |

Tabla 3.70. Características de las zonas cuyo pronóstico es erróneo con elevada probabilidad en la regresión logística con cinco categorías de TAP. SOM: superficie ocupada por microproyecciones.

Finalmente, las zonas del TAP 4 con asignación de TAP incorrecta y elevada probabilidad poseen características diferentes según el TAP asignado. Básicamente, se podrían agrupar en dos tipos: las zonas que se confunden con el TAP 0 y las que erróneamente se asignan al TAP 2 ó al 3. En las primeras la densidad de microproyecciones es alta, el área media es intermedia, la forma es poligonal, las células presentan frecuentemente *holes* y las uniones intercelulares están intactas. El segundo tipo de zonas poseen una baja densidad de microproyecciones, el área celular media es mediana y la forma es

poligonal, el tono intermedio, hay ausencia de holes y las uniones intercelulares están alteradas.

En consecuencia, podría afirmarse que todos los TAP muestran una elevada variabilidad de características morfológicas zonales, aunque esta es menor que la variabilidad entre células. Las zonas control (TAP 0) son las que presentan una uniformidad relativamente mayor en las variables *SOM* y *uniones intercelulares*, variables esenciales para diferenciar un TAP de otro, según este modelo.

En la tabla 3.71 se exponen, a modo de resumen, las principales características morfológicas de las zonas con asignación de TAP errónea y alta probabilidad así como el TAP concreto al que han sido asignadas.

En dicha tabla puede observarse que el TAP 2 y el TAP 4 son los tiempos de apertura palpebral que presenta asignaciones erróneas más variadas. Si a este hecho se le suma su, relativamente, más baja proporción de pronósticos correctos (45.0% para el TAP 2 y 44.4% para el TAP 4 ver tabla 3.63) se podría afirmar que son los TAP cuya diferenciación presenta más dificultades.

Modelo predictivo con las variables zonales principales y dos categorías de TAP

Atendiendo a los resultados expuestos anteriormente, en los que se observaban ciertas similitudes entre algunos tiempos de apertura palpebral, se han agrupado los TAP en dos categorías a las que se les ha nombrado como GTAP 0 y GTAP 1 (grupos de TAP 0 y grupos de TAP 1). Dentro del GTAP 0 se incluyen las zonas del TAP 0 y del TAP 1 y el GTAP 1 agrupa al TAP 2, 3 y 4.

Con estas agrupaciones (GTAP 0 y GTAP 1) se ha calculado un nuevo modelo predictivo que presenta un ajuste adecuado ($\chi^2_6 = 106.087$ con un nivel de significación de 0,000) y predice correctamente el TAP en el 81,9% de los casos, mejorando ostensiblemente el pronóstico realizado en cualquiera de los

modelos analizados hasta ahora (incluyendo, también, los modelos celulares). La categoría que aparece mejor pronosticada es el GTAP 1. (Ver tabla 3.72)

| TAP observado | TAP erróneo asignado y características celulares diferenciales | | | | |
|---------------|--|--|---|-----------------------------------|---|
| | TAP 0 | TAP 1 | TAP 2 | TAP 3 | TAP 4 |
| TAP 0 | | SOM alta UI intactas o algo alteradas | | | |
| TAP 1 | SOM alta UI intactas o casi intactas | | SOM baja UI intactas o casi intactas | | |
| TAP 2 | SOM alta UI intactas o casi intactas | | | SOM baja UI dañadas | SOM baja UI muy dañadas |
| TAP 3 | | SOM intermedia cercana a los valores altos UI intactas o casi intactas | | | SOM intermedia cercana a los valores bajos UI muy dañadas |
| TAP 4 | SOM alta UI intactas | | SOM bajas UI algo alteradas | SOM bajas UI algo alteradas | |

Tabla 3.71. Principales características morfológicas de las zonas con errónea asignación de TAP con el modelo de regresión logística para cinco categorías de TAP. SOM: superficie ocupada por las microproyecciones. UI: uniones intercelulares.

| Observado | Pronosticado | | |
|-------------------|--------------|--------|---------------------|
| | GTAP 0 | GTAP 1 | Porcentaje correcto |
| GTAP 0 | 58 | 18 | 76.3 |
| GTAP 1 | 17 | 100 | 85.5 |
| Porcentaje global | | | 81.9 |

Tabla 3.72. Resultados del pronóstico realizado por el modelo para dos categorías de TAP

Las variables incluidas en la ecuación que define este modelo son: *SOM*, *holes* y *uniones intercelulares*. Estas aparecen en la tabla 3.73 con su nivel de significación. *Área*, *forma* y *tono* no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$) por lo que su influencia en el modelo es despreciable.

Para establecer las características morfológicas de las zonas típicas de cada GTAP se han estudiado, de nuevo, aquellas predicciones acertadas a las que el modelo asigna una elevada probabilidad (ver tabla 3.74).

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|--|-----------------------------|
| Superficie ocupada por las microproyecciones | 0,000** |
| Área | 0,257 |
| Forma | 0,397 |
| Tono | 0,438 |
| Holes | 0,001** |
| Uniones intercelulares | 0,048* |

Tabla 3.73. Variables en la ecuación que describe el modelo zonal para dos GTAP. ** Nivel de significación de $p < 0,01$; * Nivel de significación de $p < 0.05$. RV: razón de verosimilitud.

Según estos resultados las zonas típicas del GTAP 0 son zonas con elevada densidad de microproyecciones, área celular media de tamaño pequeño o mediano-pequeño, formas poligonales, tonos intermedios con pocos o sin cráteres (*holes*) y con uniones intercelulares intactas o casi intactas.

| Célula | GTAP | PGTAP | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|----------------------|------|-------|------|------|-------|------|-------|-------------------|
| C03i_21 | 0 | 0.97 | 52.3 | 201 | 0.685 | 108 | 0.0 | 1 |
| C04i_1 | 0 | 0.97 | 56.4 | 140 | 0.551 | 128 | 0.4 | 1 |
| C18i_13 ^a | 0 | 0.99 | 59.5 | 238 | 0.557 | 111 | 0.0 | 0.9 |
| C14i_1 | 1 | 0.99 | 7.66 | 348 | 0.702 | 101 | 0.0 | 0.2 |
| C14i_2a | 1 | 0.99 | 1.63 | 768 | 0.860 | 101 | 0.0 | 0.2 |
| C16i_18 | 1 | 0.99 | 15.1 | 601 | 0.794 | 114 | 0.8 | 0.8 |

Tabla 3.74. Ejemplos de pronósticos acertados con elevada probabilidad en la regresión logística por zonas con dos categorías de TAP. GTAP: grupo de TAP (el grupo 0 incluye los TAP 0 y 1 mientras que el grupo de TAP 2 incluye los TAP2, 3 y 4). PGTAP: probabilidad pronosticada para un GTAP determinado.

Por su parte, las zonas típicas del GTAP 1, según el modelo de regresión logística con dos categorías de TAP, poseen una densidad de microproyecciones baja o muy baja, un área celular media grande o mediana, una forma celular media poligonal o pseudopoligonal, un tono intermedio, a veces con mayoría y otras con minoría de holes y uniones intercelulares casi intactas o seriamente afectadas.

En cuanto a las predicciones erróneas con elevada probabilidad pronosticada (ver tabla 3.75), aparecen en zonas del GTAP 0 que presentan una densidad de microproyecciones intermedias, área celular media de tamaño grande o mediano, formas poligonales o pseudopoligonales, tono intermedio, con predominio de células sin holes o equiparadas a las células con holes y uniones intercelulares perfectas o algo alteradas.

En el caso del GATP 1 los errores aparecen, básicamente, en zonas con elevada densidad de microproyecciones, área celular media de tamaño mediano, formas poligonales o pseudopoligonales, tono intermedio, un número de células con *holes* casi igual o mayor que sin *holes* y unas uniones intercelulares intactas. En la tabla 3.76 se exponen, a modo de resumen, las características básicas de las zonas típicas de cada TAP y de las zonas atípicas (con pronóstico erróneo y alta probabilidad)

| Célula | GTAP | PGTAP | Grupo Asignado | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
|---------|------|-------|-------------------|------|------|-------|------|-------|----------------------|
| C02i_23 | 0 | 0.87 | 1 | 38.3 | 838 | 0.889 | 104 | 0.5 | 1 |
| C12d_13 | 0 | 0.96 | 1 | 21.9 | 369 | 0.781 | 106 | 0.2 | 0.9 |
| C12d_21 | 0 | 0.90 | 1 | 33.5 | 417 | 0.700 | 109 | 0.3 | 0.6 |
| C17d_13 | 1 | 0.88 | 0 | 51.5 | 548 | 0.608 | 109 | 0.4 | 1 |
| C14d_17 | 1 | 0.83 | 0 | 52.5 | 279 | 0.630 | 111 | 0.8 | 1 |
| C16d_9 | 1 | 0.84 | 0 | 50.9 | 360 | 0.853 | 99.2 | 0.4 | 1 |

Tabla 3.75. Ejemplos de pronósticos erróneos con elevada probabilidad en la regresión logística por zonas con dos categorías de TAP. GTAP: grupo de TAP (el grupo 0 incluye los TAP 0 y 1 mientras que el grupo de TAP 2 incluye los TAP2, 3 y 4) . PGTAP: probabilidad pronosticada para un GTAP determinado.

Además, en dicha tabla se evidencia la coherencia del modelo ya que las zonas atípicas del GTAP 1 poseen características análogas a las zonas típicas del GTAP 0 y viceversa. Sin embargo, las características entre un GTAP y el otro no son tan contrapuestas como en el modelo celular análogo a este (ver tabla 3.46). Estas diferencias más difusas en las zonas pueden ser debidas al hecho de que los valores de las variables zonales se obtienen promediando los valores celulares con lo que para conseguir un valor extremo (por ejemplo unas uniones intercelulares muy alteradas) es necesario que todos los valores de la variable celular en las células de la zona sean extremos.

Modelos predictivos con las variables zonales subordinadas

Con el fin de comprobar la capacidad de las variables subordinadas para pronosticar el tiempo de apertura palpebral de una zona, se han calculado, de forma análoga a lo realizado anteriormente con las células, dos modelos predictivos; uno con las cinco categorías de TAP y otro con los dos GTAP. La predicción se ha hecho en base a las variables subordinadas (originadas a partir de la agrupación subjetiva por categorías de las variables principales de carácter objetivo), a los *holes* y a las *uniones intercelulares*, ya que para estas dos últimas variables no se ha establecido ninguna variable subordinada. Si no se añadieran aquí, parte de la información se perdería, como ya se comentó en la regresión logística celular.

| Células típicas | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercelulares |
|-------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|-------------|-----------------------|--------------------------------------|
| GTAP 0 | Elevadísima | Pequeña o mediana-pequeña | Poligonal | Intermedio | Con pocos o sin holes | Intactas o casi intactas |
| GTAP 1 | Baja o muy baja | Medianas o grande | Poligonal o pseudopoligonal | Intermedio | Con o sin holes | Casi intactas o seriamente afectadas |
| Células atípicas | SOM | Área | Forma | Tono | Holes | Uniones intercel. |
| GTAP 0 | Intermedias | Medianas o grandes | Poligonal o pseudopoligonal | Intermedio | Con o sin holes | Intactas o algo alteradas |
| GTAP 1 | Elevadísima | Medianas | Poligonal o pseudopoligonal | Intermedio | Con y sin holes | Intactas |

Tabla 3.76. Características morfológicas de las zonas típicas y atípicas según el modelo para GTAP. Las características de las células típicas se han obtenido analizando las células cuyo pronóstico ha sido acertado con una alta probabilidad mientras que las de las células atípicas se corresponden con las de aquellas células con pronóstico erróneo y alta probabilidad asignada.

Los dos modelos zonales con las variables subordinadas muestran ajustes adecuados. En el primero, se pronostican los cinco tiempos de apertura palpebral con un valor de $\chi^2_{24} = 198.736$ y un nivel de significación de 0,000 y en el segundo las variables subordinadas pronostican los dos GTAP con un valor de $\chi^2_6 = 131.504$ y un nivel de significación de 0,000.

En las tablas 3.77 y 3.78 aparecen la proporción de pronósticos correctos en cada uno de los modelos.

| Observado | Pronosticado | | | | | Porcentaje correcto |
|-------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|---------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| 0 | 36 | 5 | 2 | 0 | 3 | 78.3 |
| 1 | 12 | 11 | 3 | 1 | 3 | 36.7 |
| 2 | 4 | 3 | 18 | 8 | 7 | 45.0 |
| 3 | 3 | 1 | 7 | 25 | 5 | 61.0 |
| 4 | 2 | 4 | 8 | 7 | 15 | 41.7 |
| Porcentaje global | 29.5% | 12.4% | 19.7% | 21.2% | 17.1% | 54.4 |

Tabla 3.77. Resultados del pronóstico realizado por el modelo predictivo zonal con las variables subordinadas para cinco TAP

Como se desprende de dichas tablas la capacidad predictiva del modelo que discrimina entre GTAP 0 y GTAP 1 es mucho mayor (porcentaje global de aciertos del 85.0%) que la del modelo que discrimina entre las cinco categorías de TAP (porcentaje global de aciertos del 54.4%). Además, estos resultados son muy parecidos a los obtenidos con los modelos predictivos zonales basados en las variables principales (81.9% para el modelo con dos GTAP y 60.1% para el modelo con cinco TAP) con lo que se podría afirmar que las variables subordinadas poseen una capacidad predictiva del TAP muy parecida a la de las variables principales.

| Observado | Pronosticado | | Porcentaje correcto |
|-------------------|--------------|--------|---------------------|
| | GTAP 0 | GTAP 1 | |
| GTAP 0 | 62 | 14 | 81.6 |
| GTAP 1 | 15 | 102 | 87.2 |
| Porcentaje global | | | 85.0 |

Tabla 3.78. Resultados del pronóstico realizado por el modelo predictivo zonal con las variables subordinadas para dos categorías de TAP

Las variables incluidas en las ecuaciones que definen los modelos son *cat SOM*, *cat forma*, *cat tono*, *holes* y *uniones intercelulares* tanto para el modelo con cinco TAP como para el de los dos GTAP. La variable *cat tamaño* no es estadísticamente significativa en ninguno de los dos casos ($p > 0,05$). (Ver tablas 3.79 y 3.80)

Las estimaciones de los parámetros para cada tiempo de apertura palpebral en el modelo zonal con los cinco TAP se exponen en la tabla 3.81. De dicha tabla cabe resaltar que la variable con significación en todos los TAP es *holes*. La variable *cat SOM* no es significativa para el TAP1 (respecto del TAP 0) por lo que puede considerarse como no discriminatoria entre estos dos TAP, aunque con el resto de TAP si lo es. La variable *uniones intercelulares* sólo es significativa para el TAP 4.

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|------------------------|-----------------------------|
| Cat SOM | 0,000** |
| Cat tamaño | 0,311 |
| Cat forma | 0,004** |
| Cat Tono | 0,001** |
| Holes | 0,000** |
| Uniones intercelulares | 0,000** |

Tabla 3.79. Variables en la ecuación que describe el modelo zonal para cinco TAP. ** Nivel de significación de $p < 0,01$; RV: razón de verosimilitud.

| Variables | Nivel de significación (RV) |
|------------------------|-----------------------------|
| Cat SOM | 0,000** |
| Cat tamaño | 0,601 |
| Cat forma | 0,001** |
| Cat Tono | 0,000** |
| Holes | 0,000** |
| Uniones intercelulares | 0,010** |

Tabla 3.80. Variables en la ecuación que describe el modelo para dos GTAP. ** Nivel de significación de $p < 0,01$. RV: razón de verosimilitud.

Para los modelos con variables subordinadas no se han analizado los aciertos ni los errores con elevada probabilidad ya que en este caso no se pretende establecer los criterios discriminantes que utiliza el modelo sino sólo la capacidad predictiva de las variables, para poder valorar su uso en la práctica

clínica. De estos resultados se desprende que las variables zonales subordinadas poseen una capacidad predictiva semejante a la de las principales, como sucedía con las células.

| Grupo de TAP(a) | VARIABLES en la ecuación | B | Sig. (Wald) |
|-----------------|--------------------------|---------|-------------|
| TAP 1 | Intersección | 1.882 | 0.493 |
| | Cat SOM | -1.972 | 0.407 |
| | Cat tamaño | 1.538 | 0.320 |
| | Cat forma | -.720 | 0.754 |
| | Cat Tono | 0.933 | 0.815 |
| | Holes | 3.094 | 0.005** |
| | Uniones intercelulares | -3.480 | 0.145 |
| TAP 2 | Intersección | 2.054 | 0.529 |
| | Cat SOM | -12.029 | 0.000** |
| | Cat tamaño | 0.234 | 0.891 |
| | Cat forma | 6.178 | 0.009** |
| | Cat Tono | 15.140 | 0.007** |
| | Holes | 4.170 | 0.001** |
| | Uniones intercelulares | -4.620 | 0.055 |
| TAP 3 | Intersección | 2.218 | 0.528 |
| | Cat SOM | -15.404 | 0.000** |
| | Cat tamaño | -2.101 | 0.260 |
| | Cat forma | 7.889 | 0.002** |
| | Cat Tono | 16.746 | 0.005** |
| | Holes | 7.190 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -4.348 | 0.085 |
| TAP 4 | Intersección | -2.302 | 0.623 |
| | Cat SOM | -8.649 | 0.001** |
| | Cat tamaño | 0.474 | 0.783 |
| | Cat forma | 4.597 | 0.056 |
| | Cat Tono | 24.882 | 0.007** |
| | Holes | 5.246 | 0.000** |
| | Uniones intercelulares | -8.288 | 0.001** |

Tabla 3.81. Estimaciones de los parámetros en cada una de las categorías de TAP en el modelo predictivo zonal con variables subordinadas y cinco TAP (a). La categoría de referencia es: TAP 0. * Nivel de significación de $p < 0,05$; **Nivel de significación de $p < 0,01$

En lo que a los modelos predictivos se refiere, con los datos zonales se han obtenido más altos porcentajes de aciertos globales que con los datos celulares, por lo que, a la hora de predecir el tiempo de apertura palpebral las zonas parecen proporcionar mejor información.