Universidad de Alcalá
COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2016/17

DOCTORANDO: **DRAKE RODRÍGUEZ-CASANOVA, MARÍA DEL PILAR**

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D420- CIENCIAS DE LA SALUD**
DEPARTAMENTO DE: **CIRUGÍA, CIENCIAS MÉDICAS Y SOCIALES**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 27/06/17, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **MIGUEL ÁNGEL TESUS GUEZALA // .**

Sobre el siguiente tema: *ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA CELULAR CORNEAL DE LA QUERATECTOMÍA SUBEPITELIAL ASISTIDA MEDIANTE LÁSER EXCIMER CON MITOMICINA C*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL[5] de (**no apto, aprobado, notable y sobresaliente**): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 27 de JUNIO de 2017

EL PRESIDENTE

Fdo.: .....

EL SECRETARIO

Fdo.: .....

EL VOCAL

Fdo.: .....

Con fecha 24 de julio de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: .....

[5] La calificación podrá ser **"no apto" "aprobado" "notable"** y **"sobresaliente"**. El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

Universidad de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de julio, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *DRAKE RODRÍGUEZ-CASANOVA, MARÍA DEL PILAR*, el día 27 de junio de 2017, titulada *ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA CELULAR CORNEAL DE LA QUERATECTOMÍA SUBEPITELIAL ASISTIDA MEDIANTE LÁSER EXCIMER CON MITOMICINA C*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 27 julio de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO

Firmado digitalmente por VELASCO PEREZ JUAN RAMON - DNI 03087239H
Fecha: 2017.07.28 11:16:27 -06'00'

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:
Doctorando: DRAKE RODRÍGUEZ-CASANOVA, MARÍA DEL PILAR
Secretario del Tribunal: CÉSAR VILLAR COLLAR.
Director de Tesis: MIGUEL ÁNGEL TESUS GUEZALA

Universidad de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./Dª MARÍA DEL PILAR DRAKE RODRÍGUEZ-CASANOVA reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo presentado la misma en formato: ☒ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: 198 se procede, con fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a 19 de abril de 2017

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ SERVICIO DE ESTUDIOS OFICIALES DE POSGRADO

Emilia Rivero Antúnez

Fdo. El Funcionario

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA CELULAR CORNEAL DE LA QUERATECTOMÍA SUBEPITELIAL ASISTIDA MEDIANTE LÁSER EXCIMER CON MITOMICINA C

Tesis Doctoral

PILAR DRAKE RODRÍGUEZ-CASANOVA

2017

Universidad de Alcalá

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, CIENCIAS MÉDICAS Y SOCIALES
Campus Universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
E-28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Tel. 91 885 4881-4539
Fax: 91 885 4714
E-mail: dpto.cirumedsoc@uah.es

D. FERNANDO NOGUERALES FRAGUAS, Catedrático de Cirugía y Director del Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA

Que el trabajo presentado por **Dña. María del Pilar Drake Rodríguez-Casanova** titulado "ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA CELULAR CORNEAL DE LA QUERATECTOMÍA SUBEPITELIAL ASISTIDA MEDIANTE LÁSER EXCIMER CON MITOMICINA C" ha sido realizado en el Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales y reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos suficientes para poder ser presentado como tesis doctoral ante el tribunal que corresponda.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a veintiuno de marzo de dos mil diecisiete.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

Universidad de Alcalá

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, CIENCIAS MÉDICAS Y SOCIALES
Campus Universitario
Ctra. Madrid-Barcelona, Km. 33,600
E-28871 Alcalá de Henares (Madrid)
Tel. 91 885 4881-4539
Fax: 91 885 4714
E-mail: dpto.cirumedsoc@uah.es

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

D. MIGUEL ÁNGEL TEUS GUEZALA, Catedrático de Universidad del Departamento de Cirugía, Ciencias Médicas y Sociales de la Universidad de Alcalá

Como Director de la presente Tesis Doctoral,

CERTIFICA

Que el trabajo titulado "ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA CELULAR CORNEAL DE LA QUERATECTOMÍA SUBEPITELIAL ASISTIDA MEDIANTE LÁSER EXCIMER CON MITOMICINA C" realizado por **Dña. María del Pilar Drake Rodríguez-Casanova**, reúne los requisitos metodológicos y valor científico adecuados para ser presentado y defendido para optar al grado de Doctor por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Alcalá de Henares, a veintiuno de marzo de dos mil diecisiete.

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA BIOLOGÍA CELULAR CORNEAL DE LA QUERATECTOMÍA SUBEPITELIAL ASISTIDA MEDIANTE LÁSER EXCIMER CON MITOMICINA C

Tesis Doctoral presentada por
PILAR DRAKE RODRÍGUEZ-CASANOVA

Director:
Prof. Miguel Ángel Teus Guezala, Catedrático de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.

Alcalá de Henares, 2017

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Profesor Miguel Ángel Teus, por sembrar en mí la inquietud por la ciencia y la investigación y regarla con su ejemplo. Por confiar en mí y enseñarme tanto.

A todos mis compañeros en la oftalmología, esta especialidad tan bonita que compartimos. En especial todo el personal de las clínicas Novovision, Rementería y Vissum Madrid, porque esta tesis es fruto del trabajo en equipo, donde cada uno ha sido indispensable. A mis adjuntos y compañeros de residencia en el hospital Príncipe de Asturias, por todo lo aprendido y compartido. A mis compañeras del Hospital del Sureste por acompañarme en el crecimiento profesional y personal.

A mi familia y mis amigos, que tantísimo me han apoyado y animado a elaborar este trabajo. Han sido muchas las personas que me han ayudado tanto en el contenido como en la forma, aunque no puedo nombrarlas a todas, agradezco cada granito de arena.

A mis hermanos, por estar disponibles y atentos, por cuidarme con cariño, generosidad y paciencia.

A mis padres, a quienes debo todo lo que soy. En especial a mi padre por insistirme tanto en que hiciera la tesis, ha sido el empuje para superar las piedras en el camino.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la mitomicina C (MMC) en cirugía refractiva ha supuesto el resurgir de las técnicas de ablación de superficie para corregir miopía, sobre todo en aquellos pacientes con defectos refractivos altos, cuya principal complicación era pérdida de transparencia corneal secundaria a la cicatrización estromal, el también llamado *"haze"*. La MMC es un agente alquilante con efectos antimitóticos y citotóxicos, que aplicada sobre el estroma ablacionado produce una apoptosis de queratocitos, inhibe su proliferación y diferenciación en miofibroblastos, células que son la base fisiopatológica del *"haze"*. El uso de MMC en cirugía de glaucoma y pterigión se ha asociado con ciertas complicaciones tan devastadoras como la necrosis de tejido y la perforación ocular. El objetivo de esta tesis es estudiar la posible toxicidad del uso de MMC como coadyuvante a la Queratectomía Subepitelial Asistida Mediante Láser Excimer (LASEK), sobre las principales estirpes celulares corneales, haciendo uso de los métodos actuales de exploración corneal *in vivo*, dada la gran trascendencia que sus resultados podrían tener para la práctica clínica habitual.

MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos un estudio de la evolución postoperatoria de las diferentes capas corneales y sus principales estirpes celulares (epitelio, estroma y endotelio) en ojos intervenidos de LASEK con MMC como coadyuvante, y la comparamos con un grupo control formado por ojos intervenidos de LASEK sin MMC y ojos sanos no operados.

RESULTADOS

No hallamos diferencias entre los grupos en cuanto a la reepitelización, la paquimetría ni el recuento endotelial. El grosor epitelial central en los ojos intervenidos mostró un adelgazamiento inicial, para posteriormente volverse más grueso a los 3 meses y tender a la normalidad a los 6. Encontramos una diferencia entre el grosor epitelial central y periférico más acusada en los ojos operados comparado con controles. Observamos cierta reorganización queratocitos tras la cirugía, con un descenso inicial de su densidad

en el estroma anterior, compensado con un incremento en el estroma profundo, y una tendencia a la normalización de la misma con el paso del tiempo.

DISCUSIÓN

A pesar de que la MMC es un fármaco antiproliferativo y citotóxico, su uso se ha extendido como coadyuvante a la ablación de superficie para prevenir la aparición de *"haze"*, con el temor de las posibles consecuencias que su toxicidad podría tener sobre la córnea. En nuestro trabajo no hemos encontrado un retraso en el cierre de la herida epitelial, ni tampoco una pérdida queratocitaria ni endotelial significativa asociada al uso de MMC. Tampoco hallamos que la MMC produzca cambios cualitativos en el recrecimiento corneal total ni en el grosor epitelial central tras cirugía LASEK. Encontramos ciertas variaciones en el perfil de grosor epitelial, siendo más acusada la diferencia centro-periferia en los ojos operados, pudiendo ser una de las causas de regresión refractiva. Asimismo, hallamos una redistribución de los queratocitos en los ojos intervenidos, reduciéndose en el estroma anterior e incrementándose en las capas más profundas del estroma, que tiende a normalizarse con el paso de los años.

CONCLUSIÓN

La aplicación intraoperatoria de MMC como coadyuvante a la cirugía LASEK no parece tener un efecto nocivo clínicamente relevante sobre la biología celular corneal.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN 1
1.LA CÓRNEA 3
1.1.Embriología 3
1.2.Anatomía y función 4
1.2.1.Película lagrimal 5
1.2.2.Epitelio 6
1.2.2.1.Células del epitelio corneal 6
1.2.2.2.Mantenimiento del epitelio 7
1.2.3.Membrana basal epitelial 8
1.2.4.Capa de bowman 8
1.2.5.Estroma 9
1.2.5.1.Componentes celulares: los queratocitos 9
1.2.5.2.Componentes inertes del estroma 10
1.2.5.3.Mantenimiento del estroma 11
1.2.5.4.Interacción epitelio-estroma 11
1.2.6.Membrana de descemet 12
1.2.7.Endotelio 12
1.2.8.Aporte nervioso 13
1.2.9.Aporte de oxígeno y nutrientes 15
2.MÉTODOS ACTUALES DE EXPLORACIÓN CORNEAL "IN VIVO" 15
2.1.Paquimetría corneal 15
2.1.1.Paquimetría ultrasónica 16
2.1.2.Biomicroscopía ultrasónica 17
2.1.3.Microscopía confocal 17
2.1.4.Paquimetría óptica 17
2.1.5.Tomografía de coherencia óptica 18
2.1.5.1.Principios técnicos y dispositivos 18
2.1.5.2.Aplicaciones en oftalmología y cirugía refractiva 21
2.1.5.3.Estudio del grosor epitelial medido con OCT 23
2.1.6.Otros métodos de no contacto 24
2.2.Microscopía confocal 25
2.2.1.Historia 25
2.2.2.Principios ópticos y diseños 26
2.2.3.Estudio de las diferentes capas corneales 27
2.2.3.1.Epitelio 28
2.2.3.2.Plexo nervioso subbasal y subepitelial 29
2.2.3.3.Capa de bowman 29
2.2.3.4.Estroma 30
2.2.3.5.Endotelio 31
2.2.4.Aplicaciones en oftalmología y cirugía refractiva 32
2.2.5.Estudio de la densidad queratocitaria con microscopía confocal 32
2.3.Microscopía especular 33
3.CIRUGÍA REFRACTIVA 35
3.1.Recuerdo histórico y evolución de las técnicas 35
3.1.1.Procedimientos sobre la longitud axial del ojo 36
3.1.2.Procedimientos intraoculares 36
3.1.2.1.Extracción de cristalino transparente 36

3.1.2.2. Implante de lentes intraoculares fáquicas 36
3.1.3. Procedimientos sobre la córnea 37
3.1.3.1. La cirugía incisional 37
3.1.3.2. La cirugía térmica 38
3.1.3.3. Procedimientos lamelares 38
3.1.3.4. El láser excimer 39
3.2. Queractectomía fotorrefractiva 41
3.3. Queratomileusis in situ con láser excimer 42
3.4. Láser de femtosegundo 43
4. LASEK 44
4.1. Técnica quirúrgica 45
4.2. Respuesta celular 45
4.3. Indicaciones 49
4.4. Complicaciones 50
5. MITOMICINA C 51
5.1. Qué es 51
5.2. Usos en oftalmología 51
5.3. Haze 52
5.3.1. Fisiopatología 52
5.3.2. Profilaxis y tratamiento 54
5.4. Efectos de la MMC sobre la córnea 54
5.5. Dosis y tiempo de aplicación 55
5.6. Efectos adversos de la MMC en la córnea 57
5.6.1. Epitelio 57
5.6.2. Estroma 61
5.6.3. Endotelio 62

JUSTIFICACIÓN 65

HIPÓTESIS 69

OBJETIVOS 73

MATERIAL Y MÉTODOS 77
1. POBLACIÓN MUESTRAL 79
1.1. Ámbito 79
1.2. Criterios de exclusión generales 79
1.3. Controles sanos 79
2. EXAMEN PREOPERATORIO 80
3. TÉCNICA QUIRÚRGICA 80
4. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO 84
5. DATOS GENERALES DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO 84
6. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS 85
6.1. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la reepitelización corneal 85
6.2. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el patrón de grosor epitelial corneal 86
6.3. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el grosor corneal total 88

6.4. Efecto a medio, corto y largo plazo del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la densidad queratocitaria corneal 89
6.4.1. Microscopio confocal "*in vivo*" 89
6.4.2. Montaje del microscopio 90
6.4.3. Procedimiento de toma de imágenes en los pacientes 91
6.4.4. Medida de la densidad de queratocitos 92
6.4.5. Profundidades a las que medimos la densidad de queratocitos 93
6.5. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el endotelio corneal 94

RESULTADOS 97
1. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la reepitelización corneal 99
2. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el patrón de grosor epitelial corneal 100
3. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el grosor corneal total 103
4. Efecto a medio, corto y largo plazo del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la densidad queratocitaria corneal 104
5. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el endotelio corneal 108

DISCUSIÓN 111
1. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la reepitelización corneal 113
2. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el patrón de grosor epitelial corneal 117
3. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el grosor corneal total 122
4. Efecto a medio, corto y largo plazo del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la densidad queratocitaria corneal 125
5. Efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el endotelio corneal 131

CONCLUSIONES 137

BIBLIOGRAFÍA 141

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Formación de las vesículas ópticas a partir de las evaginaciones del cerebro anterior (Sadler y Langman, 2006).
- **Figura 2.** Histología de la córnea.
- **Figura 3.** Representación gráfica de los 3 ejes descritos en la hipótesis de Thoft.
- **Figura 4.** Imágenes del plexo nervioso subbasal (izquierda) y subepitelial (derecha).
- **Figura 5.** Tomografía de Coherencia Óptica de dominio temporal (Río Torres 2009).
- **Figura 6.** Tomografía de Coherencia Óptica de dominio espectral (Río Torres 2009).
- **Figura 7.** Imagen del segmento anterior con OCT-SA.
- **Figura 8.** Imagen de las mediciones del grosor epitelial y estromal con Visante® OCT-SA.
- **Figura 9.** Microscopio confocal Heidelberg junto con el módulo de córnea *Rostock.*
- **Figura 10.** Imagen del epitelio superficial con microscopio confocal.
- **Figura 11.** Imagen del epitelio basal con microscopio confocal.
- **Figura 12.** Imagen del plexo nervioso subepitelial con microscopio confocal.
- **Figura 13.** Imágenes del estroma anterior (izquierda) y medio (derecha) con microscopio confocal.
- **Figura 14.** Imagen del endotelio con microscopio confocal.
- **Figura 15.** Imagen de las células endoteliales con microscopía especular.
- **Figura 16.** Primeros pasos de la cicatrización corneal tras ablación de superficie.
- **Figura 17.** Colocación de paño estéril, blefarostato y marcador centrado en la pupila con dilución de etanol al 20% en contacto con el epitelio.
- **Figura 18.** Delimitación de los bordes creados por el marcador con una hemosteta seca.
- **Figura 19.** Una cuchilla tipo crescent permite levantar el epitelio desde el borde delimitado y crear el flap epitelial que queda replegado, unido a la córnea por una bisagra a las 12 horas.

- **Figura 20.** Tras la ablación, se aplica cuidadosamente MMC al 0,02% sobre el lecho estromal.
- **Figura 21**. Después de la aplicación de MMC, se lava con abundante BBS el lecho estromal.
- **Figura 22.** Con la misma cánula de irrigación se recoloca el flap epitelial para que cubra el área ablacionada.
- **Figura 23.** Finalmente se coloca una lente de contacto terapéutica.
- **Figura 24.** OCT-SA Visante®.
- **Figura 25.** Imagen de la medida del epitelio con OCT-SA Visante®.
- **Figura 26.** Paquímetro ultrasónico de contacto (Ocuscan Rxp, Alcon laboratories).
- **Figura 27.** Imagen del microscopio confocal *Heidelberg Retina Tomograph II* junto con el módulo de córnea *Rostock.*
- **Figura 28.** Gel "*viscotears"* aplicado en la superficie de la lente del módulo de córnea *Rostock* (izquierda). Lente del módulo de córnea *Rostock* con el gel aplicado y el capuchón (derecha).
- **Figura 29.** Método de selección manual de células para obtener la densidad de queratocitos a una profundidad determinada.
- **Figura 30.** Microscopio especular (Topcon SP-2000P, Topcon Corp.).
- **Figura 31.** Comparación de la medida del grosor epitelial con OCT visante® entre el grupo control y en el grupo tratado con LASEK + MMC a los 3 y 6 meses
- **Figura 32.** Densidad queratocitaria en el grupo control y en el grupo tratado con LASEK + MMC a los 3 meses, 15 meses y 3 años.
- **Figura 33.** Comparación de la densidad queratocitaria entre el grupo control y a los 3 años tras LASEK + MMC. La medida del estroma anterior se calculó con la media a 25 y 75 µm de profundidad. *Diferencia estadísticamente significativa.

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1**. Comparaciones entre la paquimetría (GCC) medida con ultrasonido (US) y con OCT Visante® en postoperatorio de los pacientes intervenidos con LASEK + MMC. Las medidas se muestran como media ± desviación estándar.

- **Tabla 2.** Medida del grosor epitelial en micras (µm) con OCT Visante® en el grupo control y el grupo LASEK + MMC a la semana, 1 mes, 3 meses y 6 meses. Las medidas se muestran como media ± desviación estándar.

- **Tabla 3.** Grosor corneal central (GCC) en los dos grupos tratados con LASEK para corregir miopía. Los datos se muestran como media ± desviación estándar.

- **Tabla 4.** Comparación de la densidad queratocitaria (células/mm^3) entre el grupo control y el grupo LASEK + MMC a los 3 meses, 15 meses y 3 años. Los datos se muestran como media ± desviación estándar y rango entre paréntesis.

- **Tabla 5.** Comparación de la densidad queratocitaria (células/mm^3) del estroma anterior (medido a 25 y 75 µm de profundidad) entre controles y el grupo tratado con LASEK + MMC a los 3 años. Los datos se muestran como media ± desviación estándar y rango entre paréntesis.

- **Tabla 6.** Grosor corneal central (GCC) en micras (µm) de ambos grupos. Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

- **Tabla 7.** Densidad endotelial (células/mm^2) antes y 3 meses tras la cirugía. Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

- **Tabla 8.** Estudios del efecto de la MMC sobre los queratocitos del estroma corneal.

- **Tabla 9.** Estudios clínicos del efecto de la MMC sobre el endotelio corneal en ablación de superficie.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **GAG** Glucosaminoglicano
- **Mm** Milímetro
- **µm** Micra
- **D** Dioptría
- **µL** Microlitro
- **mOsm** Miliosmol
- **Nm** Nanómetro
- **TGFβ** *Transforming Growth Factor Beta* (Factor de Crecimiento Transformante Beta)
- **US** Ultrasonido
- **MHz** Megahercio
- **BMU** Biomicroscopía Ultrasónica
- **CMTF** *Confocal Microscopy Through Focusing* (Microscopía Confocal Cuantitativa de Enfoque Completo)
- **OCT** *Optical Coherence Tomography* (Tomografía de Coherencia Óptica)
- **TD-OCT** *Time Domain OCT* (OCT de Dominio Temporal)
- **Seg** Segundo
- **SD-OCT** *Spectral Domain OCT* (OCT de Dominio Espectral)
- **FD-OCT** *Fourier Domain OCT* (OCT de Dominio Fourier)
- **UHR-OCT** *Ultra-High Resolution OCT* (OCT de muy alta resolución)
- **SS-OCT** *Swept-Source OCT*
- **OCT-SA** OCT de Segmento Anterior
- **SL-OCT** *Slit Lamp OCT* (OCT adaptada a lámpara de hendidura)
- **MCBT** Microscopio Confocal de Barrido en Tándem
- **HRT** *Heidelberg Retina Tomograph* (Tomógrafo retiniano de Heidelberg)
- **MCR** Módulo de Córnea Rostock
- **RK** *Radial Keratotomy* (Queratotomía Radial)
- **AK** *Astigmatic Keratotomy* (Queratotomía Astigmática)
- **ALK** *Automated Lamellar Keratoplasty* (Queratoplastia Lamelar Automatizada)
- **LVC** *Laser Vision Correction* (Corrección visual con láser)
- **PRK** *Photorefractive Keratectomy* (Queratectomía Fotorrefractiva)

- **LASEK** *Laser Assisted Subepithelial Keratectomy* (Queratectomía Subepitelial Asistida mediante Láser Excimer)
- **LASIK** *Laser Assisted In Situ Keratomileusis* (Queratomileusis In Situ con Láser Excimer)
- **FS** Femtosegundo
- **AINES** Antiinflamatorios No Esteroideos
- **TLSS** *Transient Light Sensitivity Syndrome* (Síndrome de Sensibilidad Transitoria a la Luz)
- **SMILE** *Small Incision Lenticule Extraction* (Extracción Lenticular de Pequeña Incisión)
- **FLEx** *Femtosecond Lenticule Extraction* (Extracción Lenticular con Femtosegundo)
- **MMC** Mitomicina C
- **IL-1** Interleuquina 1
- **TNFα** *Tumoral Necrosis Factor Alpha* (Factor de Necrosis Tumoral Alfa)
- **PDGF** *Platelet Derived Growth Factor* (Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas)
- **ADN** Ácido Desoxirribonucleico
- **Min** Minuto
- **µg/ml** Microgramo / Mililitro
- **BSS** *Balanced Salt Solution* (Solución Salina Balanceada)
- **AVsc** Agudeza Visual Sin Corrección
- **AVcc** Agudeza Visual Con Corrección
- **GCC** Grosor Corneal Central
- **Mg** Milígramo

INTRODUCCIÓN

1. LA CÓRNEA

1.1. EMBRIOLOGÍA

El desarrollo de la córnea comienza aproximadamente el día 22 de gestación con la aparición de dos surcos a cada lado del cerebro anterior, que el día 25, con el cierre del tubo neural, dan lugar a unas evaginaciones llamadas vesículas o primordios ópticos **(Figura 1).** La migración de células de la cresta neural alrededor de la vesícula el día 28 de gestación, induce la formación de la placoda cristaliniana. Estas células mesenquimales y del ectodermo que rodean la vesícula óptica, forman dos capas epiteliales que asientan sobre una membrana basal, y darán lugar al epitelio corneal y conjuntival [1].

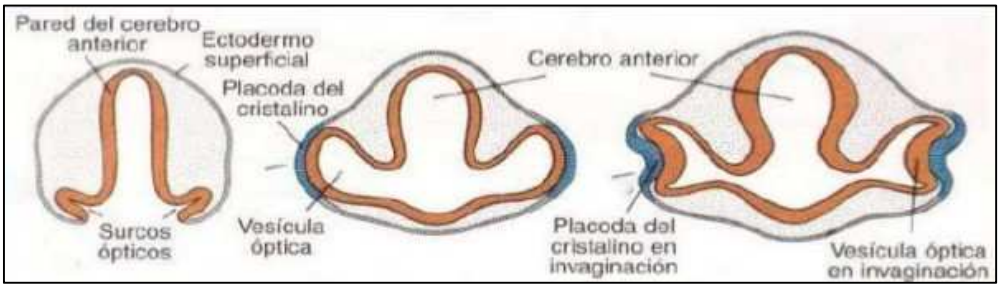

Figura 1. Formación de las vesículas ópticas a partir de las evaginaciones del cerebro anterior (Sadler y Langman, 2006)

La capa basal de células epiteliales secreta fibras de colágeno y glucosaminoglicanos (GAG) que constituyen el estroma primario. Las células mesenquimales que migran hasta la superficie posterior del estroma primario, dan lugar al endotelio corneal. Existe posteriormente en la sexta semana de gestación, una segunda migración de células mesenquimales, que originarán el iris y la membrana pupilar. Y en la séptima semana, se produce una tercera oleada celular hacia el estroma, cuya diferenciación en queratocitos que secretan fibrillas de colágeno tipo I, generará la matriz del estroma secundario o maduro. En el tercer mes de gestación se forma la membrana de Descemet como una membrana basal discontinua y el cuarto mes la capa de Bowman como una zona acelular del estroma anterior. El endotelio corneal se origina de las células de la cresta neural que cubren la superficie posterior de la membrana de Descemet.

La córnea a las 12 semanas tiene un diámetro de 2 milímetros (mm) y va creciendo hasta alcanzar los 9.3 mm a las 35 semanas de gestación [2]. Igualmente el grosor corneal va aumentando hasta alcanzar valores de 576 a 616 micras (µm) en recién nacidos [3].

1.2. ANATOMÍA Y FUNCIÓN

La córnea es un tejido altamente diferenciado, que constituye una excelente unidad estructural y funcional, esencial para permitir la transmisión y refracción de la luz, así como la protección del contenido intraocular [4]. Es una lente cóncavo-convexa, con un diámetro horizontal de 11-12 mm y vertical de 9-11 mm, y un índice de refracción de 1,376. La media del espesor corneal central es de 535-550 µm aproximadamente [5], engrosándose en la periferia, sobre todo en el área nasal, encontrándose mayor asimetría a mayor distancia del ápex corneal [6].

La córnea es más curva y esférica en el centro que en la periferia y tiene un poder dióptrico de 40-44 dioptrías (D), casi dos tercios del poder refractivo del ojo [4]. Debe sus propiedades ópticas a su transparencia, la uniformidad en su superficie y su índice de refracción. De este modo, es capaz de transmitir la luz y proyectarla sobre la retina con la ayuda del enfoque cristaliniano [7].

La córnea está formada por las siguientes capas, de más externa a interna: epitelio, membrana basal epitelial, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio **(Figura 2)**. Se encuentra bañada en su porción anterior por la película lagrimal y en su porción posterior por el humor acuoso. En condiciones normales carece de vasos sanguíneos y linfáticos.

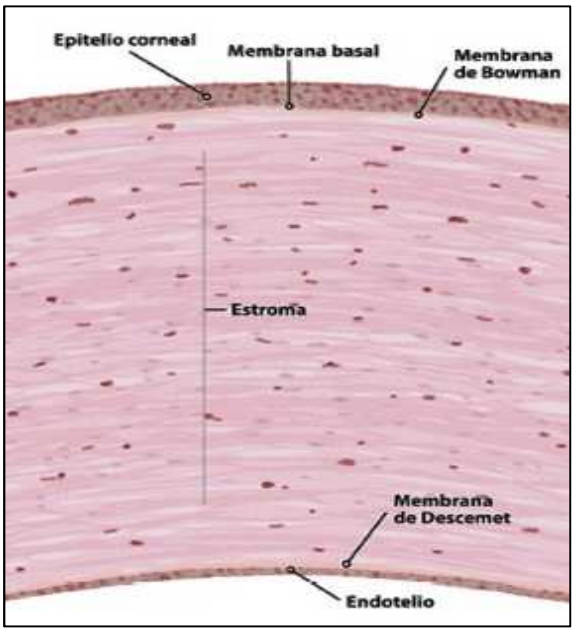

Figura 2. Histología de la córnea

1.2.1. PELÍCULA LAGRIMAL

La película lagrimal tiene un espesor de unas 7 µm, un volumen del 6-9 microlitros (µL), siendo un 98% agua. Tiene un pH que varía entre 6,5 y 7,6; y una osmolaridad entre 290-310 miliosmoles (mOsm). Son múltiples las funciones de la película lagrimal, entre las que destacan: proteger la superficie ocular, aportar al epitelio oxígeno y factores de crecimiento, proporcionar una superficie de gran calidad óptica en la interfase aire-ojo y ser medio para la eliminación de material de desecho. También contiene abundantes agentes antimicrobianos, lubrica la interfase entre la córnea y los párpados, y evita la desecación de la superficie ocular [2].

Anteriormente se dividía la película lagrimal en 3 capas (lipídica, acuosa y mucosa), pero actualmente es considerada como un medio continuo en el que las diferentes capas se entremezclan:

- La **capa lipídica**, de disposición más anterior, es una fina capa compuesta por lípidos hidrofóbicos e hidrofílicos, que son secretados por las glándulas de Meibomio y de Zeiss del párpado. Sus funciones son: evitar la evaporación y el rebosamiento de la lágrima al mantener una barrera hidrófoba que aumenta la

tensión superficial y contribuir a las propiedades ópticas de la película lagrimal [8].

- El **componente acuoso** es el que mayor volumen da a la película lagrimal, y está compuesto por electrolitos, proteínas y agua, secretados por las glándulas lagrimales principal y accesorias, así como por los epitelios corneal y conjuntival. Sus principales funciones son: aportar oxígeno, mantener constante la concentración de electrolitos del epitelio corneal, lavar desechos y de defensa antimicrobiana dado que contiene inmunoglobulina IgA, lisozima, interferón, citoquinas y factores de crecimiento [2].

- La **porción mucosa** es un gel que se localiza más internamente, compuesto por el glicocálix de las células epiteliales superficiales y el mucus de las células caliciformes, siendo la mucina el principal componente glicoproteico. Promueve una mayor estabilidad de la película lagrimal al disminuir su tensión superficial y favorecer su distribución sobre la superficie ocular durante el parpadeo [8].

1.2.2. EPITELIO

1.2.2.1. Células del epitelio corneal

El epitelio corneal es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado, compuesto de 5 a 7 capas de células. Tiene un grosor central aproximado de 50-60 µm engrosándose hacia la periferia, representando un 10% del espesor total de la córnea [9]. Existen dos estirpes celulares: epiteliales (que se adhieren a la membrana basal por hemidesmosomas y tonofilamentos) y no epiteliales (linfocitos, células de Langerhans y melanocitos) [10].

Las células epiteliales están organizadas en 3 zonas:

- **Superficial:** formada por dos o tres capas de células diferenciadas, alargadas y aplanadas, en contacto con la película lagrimal. Las más superficiales, son células maduras, sin núcleo que forman una barrera. La membrana

citoplasmática de estas células, tiene en su parte apical microvellosidades que sirven de anclaje a la capa mucinosa de la película lagrimal. Mientras que en sus caras basal y lateral destacan complejos de unión intercelulares tipo: desmosomas, uniones estrechas (*"tight junctions"*) y uniones comunicantes (*"gap junctions"*), que proporcionan impermeabilidad a la capa más externa del epitelio [8].

- **Intermedia**: donde se encuentran las células alares, de aspecto poligonal con numerosos desmosomas en su membrana que unen firmemente estás células entre sí, además de con las células basales y superficiales [11].

- **Basal**: formada por una monocapa de células columnares asentadas sobre una membrana basal, sirviendo de separación entre el epitelio y la membrana de Bowman. Estas células que se originan de las células madre del limbo esclerocorneal, tienen una capacidad mitótica importante y son responsables de la regeneración y renovación del epitelio [12]. Las células columnares migran hacia la superficie para formar el resto de células del epitelio corneal, así pasan a transformarse en alares y luego en superficiales que se descaman hacia la lágrima; estimándose un recambio total cada 7-14 días [4]. Poseen un citoesqueleto con abundantes filamentos de actina, importantes para la migración celular. Se encuentran unidas entre sí por desmosomas, y a la membrana basal por hemidesmosomas [13]. También poseen uniones comunicantes en sus caras laterales y apicales [14].

1.2.2.2. Mantenimiento del epitelio

Las células epiteliales están constantemente renovándose para mantener una estructura epitelial normal. Existe un balance entre la proliferación de las células limbares, la migración y proliferación de las células basales, su diferenciación en células superficiales y la descamación de estas últimas. Este concepto fue denominado por Thoft, la **hipótesis XYZ** [**X** (proliferación de células basales epiteliales) **+ Y** (proliferación de células limbares y migración centrípeta) = **Z** (pérdida de las células epiteliales superficiales), que representa cómo para mantener el epitelio corneal, la pérdida celular debe estar en equilibrio con el reemplazo celular [15] **(Figura 3)**.

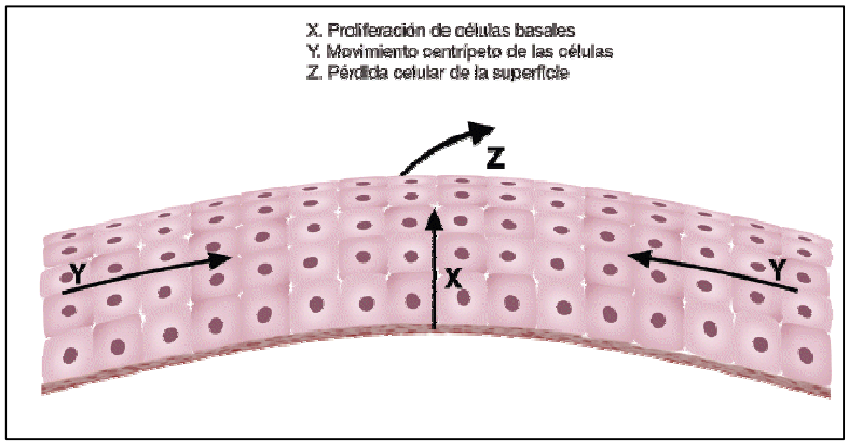

Figura 3. Representación gráfica de los 3 ejes descritos en la hipótesis de Thoft. El mantenimiento del epitelio corneal, por tanto, puede definirse por medio de la ecuación: X + Y = Z

Ante una lesión epitelial, las células madre limbares, se diferencian en células epiteliales que proliferan y migran para restaurar la estructura estratificada epitelial [16]. Otro factor importante para la reparación epitelial, es la inervación corneal y su pérdida conlleva a la rotura de la integridad normal de la córnea con cambios tróficos de la misma [15].

1.2.3. MEMBRANA BASAL EPITELIAL

Es una matriz extracelular especializada, producida por las células basales epiteliales, cuyos principales componentes son: colágeno tipo IV, perlecano, laminina, fibronectina, nidógeno 1 y 2. La membrana basal tiene la función de ser soporte para la adhesión celular, guía para la migración celular y barrera [17].

La membrana basal del epitelio mide unos 75-100 nanómetros (nm) y en ella se distinguen una lámina lúcida superficial y una lámina densa más profunda, que a través de una compleja red de colágeno, conecta con la capa de Bowman [8].

1.2.4. CAPA DE BOWMAN

La capa de Bowman es una capa acelular resistente, de unas 8-12 µm, compuesta por fibras de colágeno tipo I, III, V y VII; dispuestas de manera aleatoria, en una sustancia

fundamental constituida por mucoproteínas similares a las del estroma [18]. Su principal función es de anclaje, aunque también protege al estroma de traumatismos y es una barrera frente a invasión de microorganismos y células tumorales. No se restaura tras su lesión, siendo sustituida por tejido cicatricial [19].

La cara anterior de la capa de Bowman es la superficie de contacto con la lámina densa de la membrana basal epitelial y tiene poros a través de los que pasan los axones de los nervios corneales en su camino hacia el epitelio. En la zona posterior de la capa de Bowman, hay haces de colágeno grandes con origen en el estroma medio, lo que le confiere a esta membrana una gran adhesión con el estroma [7].

1.2.5. ESTROMA

Constituye el 90% del espesor corneal, cuyo contenido es un 78% agua, el resto está formado por fibras de colágeno, sustancia fundamental y los elementos celulares. Tiene un espesor central de entre 500-540 µm, alcanzando valores en periferia de hasta 700 µm [4].

Las principales funciones de la córnea: estabilidad, resistencia y transparencia; son atribuidas a las propiedades bioquímicas y anatómicas del estroma. La constante producción y degradación de las fibras de colágeno, así como su organizada disposición, son fundamentales para la transparencia corneal [7].

1.2.5.1. Componentes celulares: los queratocitos

Los queratocitos son las células predominantes en el estroma que derivan de la cresta neural y funcionan como fibroblastos modificados, formando y manteniendo la matriz extracelular. Tienen forma fusiforme, son grandes y planos, con prolongaciones que se extienden por fuera del cuerpo celular. Son células con abundantes mitocondrias y organelas, debido a la alta actividad en la síntesis de colágeno y matriz extracelular. Los queratocitos se distribuyen entre las lamelas del estroma y tiene uniones "*gap junction*" entre sus prolongaciones [13]. La córnea posee aproximadamente 2.4 millones de

queratocitos, encontrándose en mayor cuantía en el estroma anterior. Constituyen tan sólo el 5% del volumen estromal [10].

1.2.5.2. Componentes inertes del estroma

- Las **fibras de colágeno** se disponen en láminas de 200 a 300 de orientación oblicua en el estroma anterior y paralelas en los dos tercios posteriores. Las láminas discurren paralelas entre sí y a la superficie corneal. El colágeno es una proteína estructural insoluble en agua que se encuentra organizada a modo de plataforma inextensible encargada de formar la estructura de los tejidos conectivos. En la córnea humana el colágeno está poco ordenado en la capa de Bowman, mientras que presenta una estructura altamente organizada a nivel del estroma. Los distintos tipos de colágeno corneales son importantes funcionalmente para establecer la transparencia del tejido y la resistencia tensil. A través de métodos bioquímicos e inmunohistológicos se ha observado que el estroma corneal está compuesto predominantemente de colágeno tipo I, pero también por cantidades menores de colágeno tipo III, V y VI [2,4].

- La **sustancia fundamental** rodea las fibrillas de colágeno y está compuesta fundamentalmente por proteoglicanos que modulan la síntesis del colágeno. Los proteoglicanos están formados por una proteína central a la que se une covalentemente un polisacárido que es el GAG. El GAG más abundante es el queratán sulfato (65%), también encontramos condroitín sulfato y dermatán sulfato. Los GAG al ser muy polares, tienen la capacidad de retener grandes cantidades de agua y producir la tumefacción del estroma [20]. Las proteínas de la sustancia fundamental son: queratocán, lumicán, decorina, mimecán y biglicán [4]. La función primaria de los proteoglicanos es proporcionar volumen tisular, mantener el orden espacial de las fibras de colágeno y resistir las fuerzas compresivas. El agua, el colágeno, los proteoglicanos y los queratocitos trabajan juntos para establecer y mantener la córnea transparente, creando una estructura dura y resistente que mantiene intacta la integridad ocular y una forma estable.

1.2.5.3. Mantenimiento del estroma

La homeostasis estructural y bioquímica del estroma corneal se mantiene por el equilibrio entre la síntesis realizada por los queratocitos y la degradación de los componentes de la matriz extracelular. Los queratocitos se encuentran normalmente inactivos, pero ante agresiones proliferan y se transforman en miofibroblastos producen componentes de la matriz extracelular y reparan el estroma [21]. También existen en el estroma células del sistema inmune (linfocitos, neutrófilos y macrófagos), que responden ante el daño corneal. Ambas estirpes celulares secretan citoquinas y factores de crecimiento, que regulan la expresión de genes que contribuyen a la respuesta inflamatoria [13,22,23].

El factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) que es producido por células epiteliales, queratocitos y células inflamatorias, es un potente estimulador de la formación de tejido conectivo durante el proceso de cicatrización tisular. También estimula la proliferación y migración celular, y en el estroma activa a los queratocitos induciendo su transformación fenotípica a miofibroblastos [23]. Actualmente se conoce que los miofibroblastos que aparecen en la córnea tras una agresión, no sólo provienen de los queratocitos activados producidos por las células madre limbares, sino también de precursores de la médula ósea [24]. La función de los miofibroblastos es producir matriz extracelular, pero lo hace con una composición diferente y una disposición alterada de sus fibras de colágeno, provocando una reducción en la transparencia corneal [22].

1.2.5.4. Interacción epitelio-estroma

La relación entre el epitelio y el estroma es esencial para la regeneración estromal, dado que el epitelio ante una lesión produce citoquinas y factores de crecimiento, que actúan sobre los queratocitos y su transformación en miofibroblastos [4].

La respuesta inicial tras el daño epitelial, es la liberación de citoquinas que producen la apoptosis de los queratocitos. Posteriormente, se produce una proliferación, migración y activación de los queratocitos circundantes para repoblar el área dañada. EL TGFβ y

otros mediadores inducen su diferenciación hacia miofibroblastos, que remodelan el tejido corneal estromal. Cuando se regenera la lesión epitelial, esta cascada inflamatoria desaparece y se reduce el número de miofibroblastos. Esta respuesta se puede observar en cirugía refractiva, tras la aplicación de laser excimer, tanto en las ablaciones de superficie, como en las cirugías bajo flap e incluso en la creación de túneles para la inserción de anillos intraestromales [25–31].

1.2.6. MEMBRANA DE DESCEMET

Es una membrana basal verdadera producida por el endotelio, cuyo grosor cambia de las 3 µm en el recién nacido a las 8-10 µm en adultos. Tiene colágeno tipo IV, VII, laminina y fibronectina. Está formada por una zona anterior en bandas o estriada y otra posterior más homogénea. En la periferia pueden aparecer engrosamientos localizados de esta membrana que se llaman cuerpos de Hassall-Henle, relacionados con el envejecimiento [32].

La función principal de la membrana es estructural, formando una dura barrera resistente a la perforación corneal. En los casos de ulceración severa del estroma corneal, la presión del humor acuoso fuerza a la membrana hacia delante a través de la ulceración, dando lugar a un descematocele que puede protruir incluso por delante de la superficie anterior de la córnea sin romperse, demostrando así la elasticidad y la resistencia de esta membrana. Al no encontrarse la membrana fuertemente adherida al estroma puede ser quirúrgicamente diseccionada como si se tratara de una sábana. Otra característica de la membrana de Descemet es que se regenera rápidamente tras una lesión a partir de las células endoteliales [33].

1.2.7. ENDOTELIO

Está compuesto por una única capa de células planas poligonales, hexagonales la mayoría, en forma de mosaico bien organizado, que se encuentran en contacto directo con el humor acuoso de la cámara anterior [13]. Al nacer, estas células tienen forma cuboidea y unas 10 micras de altura, pero se van aplanando hasta tener una altura de 4

micras en el adulto. Su densidad en el recién nacido es de unas 4.000-5.000 células/mm^2 y se va reduciendo hasta los valores adultos (3.000-3.500 células/mm^2) [4].

Las células endoteliales tienen núcleos de gran tamaño, abundantes mitocondrias, grandes retículos endoplasmáticos y un aparato de Golgi bien desarrollado; lo que implica una gran actividad metabólica [11].

Las uniones de estas células forman una barrera al agua e iones del humor acuoso, que sin embargo deja pasar pequeñas moléculas y electrolitos entre ellas [4]. El endotelio es una barrera débil y la difusión a su través mantiene una hidratación corneal constante. En el endotelio también existe un transporte activo de iones hacia el humor acuoso, que crea un gradiente osmótico y por tanto, el paso de agua del estroma al humor acuoso. Ésta es la principal función endotelial, de bomba para mantener la córnea parcialmente deshidratada. Cuando se dañan las células endoteliales, se produce una entrada de agua en el estroma ocasionando una alteración en la disposición de las fibras de colágeno, que conlleva a pérdida de la transparencia corneal. Si el edema se dispone bajo el epitelio corneal, se desarrollarán microbullas. Este edema será probablemente irreversible si el recuento endotelial es menor de 500 células/mm^2 [2].

Las células endoteliales se encuentran detenidas en la fase G1 del ciclo celular por un mecanismo de inhibición por contacto y por la presencia en el humor acuoso de factores inhibitorios, como altos niveles de TGF-β2 [34–36]. Históricamente se consideraba que el endotelio era un tejido estático, incapaz de proliferar. Pero actualmente se conoce que la córnea puede generar nuevas células endoteliales por mitosis, pero lo hace de un modo tan lento que anteriormente no se detectaba [37]. De las tres líneas celulares de la córnea, el endotelio es la que menor actividad proliferativa presenta [36] y su pérdida conlleva tanto la regeneración, como el alargamiento y migración de las células circundantes para cubrir el defecto [38,39].

1.2.8. APORTE NERVIOSO

La córnea es la estructura más densamente inervada del cuerpo humano debido a que los axones periféricos tienen una gran cantidad de ramificaciones, lo que le proporciona una

gran sensibilidad, siendo 300 o 400 veces mayor que la piel. Este descubrimiento fue llevado a cabo por Schlemm en 1831, hasta entonces se pensaba que la córnea no tenía ningún nervio [40].

La inervación sensitiva del globo ocular corre a cargo de la rama oftálmica del nervio trigémino. El nervio oftálmico se origina en el ganglio de Gasser y se divide en tres ramas terminales: los nervios lagrimal, frontal y nasociliar. Un primer grupo de ramas del nervio nasociliar alcanzan el ganglio ciliar y dan lugar a los nervios ciliares cortos y el segundo grupo forman los nervios ciliares largos que alcanzan el polo posterior del ojo sin atravesar dicho ganglio. Éstos atraviesan la esclera cerca del canal del nervio óptico y avanzan agrupados en 20-30 troncos nerviosos por el espacio subaracnoideo. Cerca del músculo ciliar forman un plexo nervioso circular que proporciona inervación a la esclera anterior, la epiesclera, el ángulo camerular, el área irido-ciliar y la conjuntiva. Algunas de estas fibras se unen para formar un plexo próximo al limbo cuyas fibras penetran profundamente en el estroma periférico de forma radial y originan el plexo estromal. En general los filamentos nerviosos, no pierden su vaina de mielina hasta atravesar al menos 1 mm de la córnea, antes de llegar al limbo esclero-corneal dónde se recubren de células de Schwann con el objetivo de mantener la transparencia corneal. Del plexo estromal salen ramas hacia la superficie para formar el plexo subepitelial bajo la capa de Bowman, aunque la mayor parte de estas fibras atraviesan perpendicularmente la capa de Bowman y ascienden a las capas más superficiales del epitelio corneal para formar el plexo subbasal situado entre la membrana basal epitelial y la parte anterior de la capa de Bowman [40–42] **(Figura 4)**.

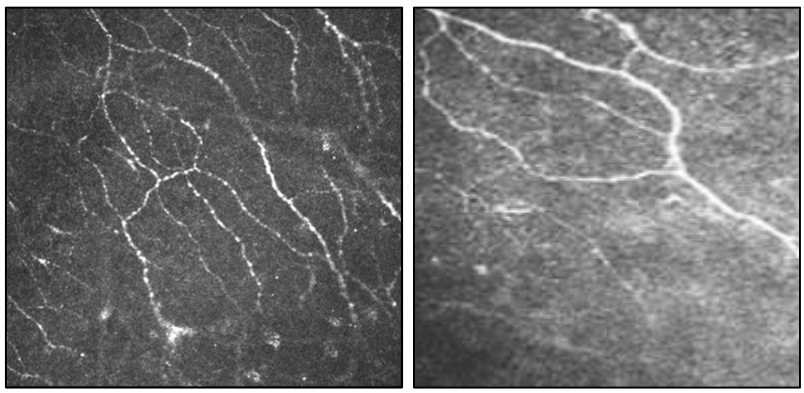

Figura 4. Imágenes del plexo nervioso subbasal (izquierda) y subepitelial (derecha)

1.2.9. APORTE DE OXÍGENO Y NUTRIENTES

La córnea es uno de los pocos tejidos avasculares del organismo. Así mismo, tanto el epitelio como el endotelio, poseen células metabólicamente activas que necesitan oxígeno y glucosa para mantener un normal funcionamiento. Los líquidos que rodean la córnea son los máximos responsables de mantener sus requerimientos fisiológicos, fundamentalmente aportando oxígeno y glucosa. La cara anterior se encuentra en contacto íntimo con la película lagrimal precorneal, a través de la cual difunde el oxígeno. Su cara posterior está bañada por el humor acuoso, desde el que difunden glucosa, aminoácidos y vitaminas [8]. Además, la córnea periférica se oxigena a partir de la circulación limbal, proveniente de las arterias ciliares anteriores [43].

2. MÉTODOS ACTUALES DE EXPLORACIÓN CORNEAL *"IN VIVO"*

Debido al constante desarrollo de la tecnología, en la actualidad disponemos de una gran variedad de instrumentos para el detallado estudio de la córnea. Podemos analizar el grosor y la disposición de sus capas e incluso obtener imágenes de las distintas estirpes celulares "*in vivo*", aportando información de gran utilidad en la para evaluar sus cambios tras cualquier procedimiento quirúrgico, como la cirugía refractiva.

2.1. PAQUIMETRÍA CORNEAL

La paquimetría es la medida del espesor corneal. Es importante conocerla a la hora del diagnóstico y seguimiento de alteraciones en cualquiera de las capas corneales comentadas anteriormente. También es de utilidad en el glaucoma y la hipertensión ocular, puesto que el grosor corneal afecta a la medida de la presión intraocular [44].

La cirugía refractiva mediante laser excimer se fundamenta en el tallado de la córnea con fines ópticos. Esto requiere el conocimiento del espesor corneal con gran precisión,

dado que es imprescindible para una correcta selección de pacientes, la indicación de la técnica más adecuada y el seguimiento postoperatorio [45].

El primer instrumento óptico para la medida del espesor corneal fue descrito por Von Bahr en 1948; superponiendo una imagen especular del endotelio con la imagen especular del epitelio mediante la rotación de unos platos y cuando las imágenes estaban adecuadamente alineadas se podía determinar el grosor corneal gracias a la angulación de los platos, la mayoría de los paquímetros ópticos son una variación de este dispositivo [46].

En la actualidad existen múltiples tecnologías para medir el espesor corneal que podemos dividir según requieran o no del contacto con la córnea: paquimetría de contacto (paquimetría ultrasónica, biomicroscopía ultrasónica y microscopía confocal) y paquimetría de no contacto (paquimetría óptica, tomografía de coherencia óptica y otros).

2.1.1. PAQUIMETRÍA ULTRASÓNICA

La paquimetría ultrasónica (US) se considera el "*Gold Standard*" o patrón oro, y es la técnica más utilizada clásicamente, puesto que se considera un método fiable y válido [47]. Emite una onda de 10-20 megahercios (MHz) que atraviesa la córnea, se refleja en la interfase endotelio-acuoso y vuelve al terminal del paquímetro. El tiempo que tarda esa onda en volver al terminal del paquímetro es usado para calcular el grosor corneal. Esta medida es relativamente exacta porque se desconoce el lugar exacto en la parte posterior de la córnea en el que se refleja. El paquímetro ofrece un valor promedio de las medidas realizadas. La exactitud de la medida depende de la perpendicularidad entre la sonda y la córnea, y la reproducibilidad, de la correcta colocación de la sonda en el centro corneal [48]. El método de obtención de la medida se considera una de sus principales desventajas, dado que requiere la instilación de colirio anestésico y contacto con la córnea, que aumenta el riesgo de daño epitelial e infección [49]. A pesar de ser la técnica de referencia, no aporta datos sobre las diferentes capas corneales [50] y sólo permite conocer la paquimetría en un punto concreto de la córnea [51].

2.1.2. BIOMICROSCOPÍA ULTRASÓNICA

La biomicroscopía ultrasónica (BMU) es una ecografía de alta resolución del segmento anterior. Emite ultrasonidos a 50 MHz que proporciona gran detalle de las estructuras del segmento anterior: córnea, cámara anterior, iris, cuerpo ciliar y cristalino. Es una técnica de inmersión, en la que la sonda se mueve lineal y oscilatoriamente sobre un medio acuoso-gel, emitiendo así multitud de ultrasonidos dando lugar a una imagen de gran calidad y resolución [48].

2.1.3. MICROSCOPÍA CONFOCAL

Aunque se comentarán los principios y aplicaciones de la microscopía confocal más adelante, esta técnica permite realizar un barrido continuo a través del eje z en todo el espesor de la córnea en un punto concreto del plano sagital, comenzando desde el epitelio llegando hasta el endotelio. Obtiene perfiles de intensidad luminosa de las imágenes grabadas y los representa en una gráfica bidimensional donde el eje horizontal representa el grosor corneal. Es lo que se denomina Microscopía Confocal Cuantitativa de Enfoque Completo *("Confocal Microscopy Through Focusing Analysis"* -CMTF-). Permite calcular las distancias entre subcapas corneales de forma precisa, por lo que podemos obtener datos paquimétricos, así como medidas del espesor epitelial [52–54].

2.1.4. PAQUIMETRÍA ÓPTICA

La paquimetría óptica se utiliza para medir el espesor corneal y la profundidad de la cámara anterior. Obtiene una imagen que se duplica mediante un biprisma delante de los objetivos del microscopio, y al hacer coincidir la doble imagen, obtiene la medida real del grosor corneal. Puede ser adaptada a la lámpara de hendidura. Tiene como ventaja su gran sencillez y su bajo precio, además de poder medir casi cualquier zona de la córnea [55].

2.1.5. TOMOGRAFÍA DE COHERENCIA ÓPTICA

La tomografía de coherencia óptica, en inglés *"Optical Coherence Tomography (OCT)"* es una técnica de imagen diagnóstica no invasiva de no contacto, que permite obtener en tiempo real e *"in vivo"* imágenes de las diferentes estructuras oculares con una resolución axial y lateral de escala micrométrica. La primera referencia que se tiene de la OCT data del año 1989 cuando Huang y Fujimoto analizaron muestras de retina y arterias coronarias ex vivo consiguiendo resoluciones de 15 µm [56].

2.1.5.1. Principios técnicos y dispositivos

El funcionamiento de la OCT se basa en la medición de la latencia e intensidad de una onda lumínica reflejada tras hacerla incidir sobre un tejido. La velocidad de las ondas luminosas es mayor que la de los ultrasonidos, permitiendo representar una imagen en dos dimensiones con una alta resolución espacial. Al penetrar la onda en un tejido sufre variaciones que obtienen un registro axial llamado A-scan. Si se desplaza el haz sobre el tejido, obtenemos múltiples A-scans, consiguiendo así un corte transversal llamado B-scan. Del mismo modo, la obtención de varios B-scans en paralelo, genera un cubo tridimensional que contiene toda la información en profundidad del tejido analizado [57,58].

La OCT se basa en la interferometría de baja coherencia de Michelson, en la que se emite un haz de luz de baja coherencia con una longitud cercana al infrarrojo (820-840 nm) que es enviado a un espejo divisor de haces. Una parte del haz lumínico, el denominado haz de referencia, es enviado a un espejo de referencia situado a una distancia conocida y la otra, el haz de exploración, al tejido a estudiar que será reflejado con distinto retraso en función de la distancia, el grosor y la diferente reflectividad del tejido. Existe un detector que analiza las diferencias en cuanto a distancia y dispersión de los rayos reflejados, por lo que el tejido se puede definir con una alta precisión. Cada tejido tiene diferentes propiedades de reflectividad y la OCT las representa en una escala de grises o colores en la pantalla, de mayor a menor reflectividad: rojo o blanco, verde-amarillo o gris y por último negro o azul. La escala cromática permite un mayor espectro de representación, lo que proporciona una mayor capacidad para reconocer alteraciones pero también una mayor facilidad para generar artefactos; mientras que en

la escala de grises el espectro de representación es menor, pero la imagen obtenida es más fiel a la realidad y más intuitiva de interpretar [57,59,60].

Existen dos grandes tipos de dispositivos de OCT:

- **OCT de Dominio Temporal ("*Time Domain OCT*", TD-OCT):** en este dispositivo el espejo de referencia de interferómetro se mueve de modo que coincida con el retraso que sufra la señal de la muestra. En cada barrido axial el espejo debe moverse un ciclo completo, a una velocidad de 400 barridos por segundo (seg), lo que limita de forma sustancial la velocidad de obtención de las imágenes [57,58] **(Figura 5)**.

- **OCT de Dominio Espectral ("*Spectral Domain*", SD-OCT):** también llamado de dominio Fourier (FD-OCT). El espejo de referencia se mantiene fijo, lo que permite escanear todas las capas de tejido a estudio al mismo tiempo, aumentando así la velocidad de adquisición de imágenes de 50 a 100 veces en función del dispositivo (18.000 a 40.000 A-scans por seg) [61]. Se reducen los artefactos producidos por los movimientos involuntarios de ojo y permite obtener imágenes en tres dimensiones, frente a las bidimensionales del TD-OCT [61] **(Figura 6)**.

La resolución axial depende de las propiedades de la luz utilizada, en el TD-OCT es de 10 µm y en el SD-OCT de 5 µm [61]. Y la resolución transversal depende de la anchura del haz incidente, en el TD-OCT es de 20 µm y en el SD-OCT de entre 12-20 µm [62]. Aunque una mayor resolución permite una visualización más en detalle, el TD-OCT permite ver todas las estructuras del segmento anterior en una única imagen, mientras que el sistema FD-OCT procesa sólo una parte pequeña del mismo [63]. Además, la mayor longitud de onda de TD-OCT es mejor absorbida por la córnea y el vítreo, reduciendo la luz que llega a la retina, pudiéndose usar de manera más segura que sistemas con longitud de onda más corta como FD-OCT [58].

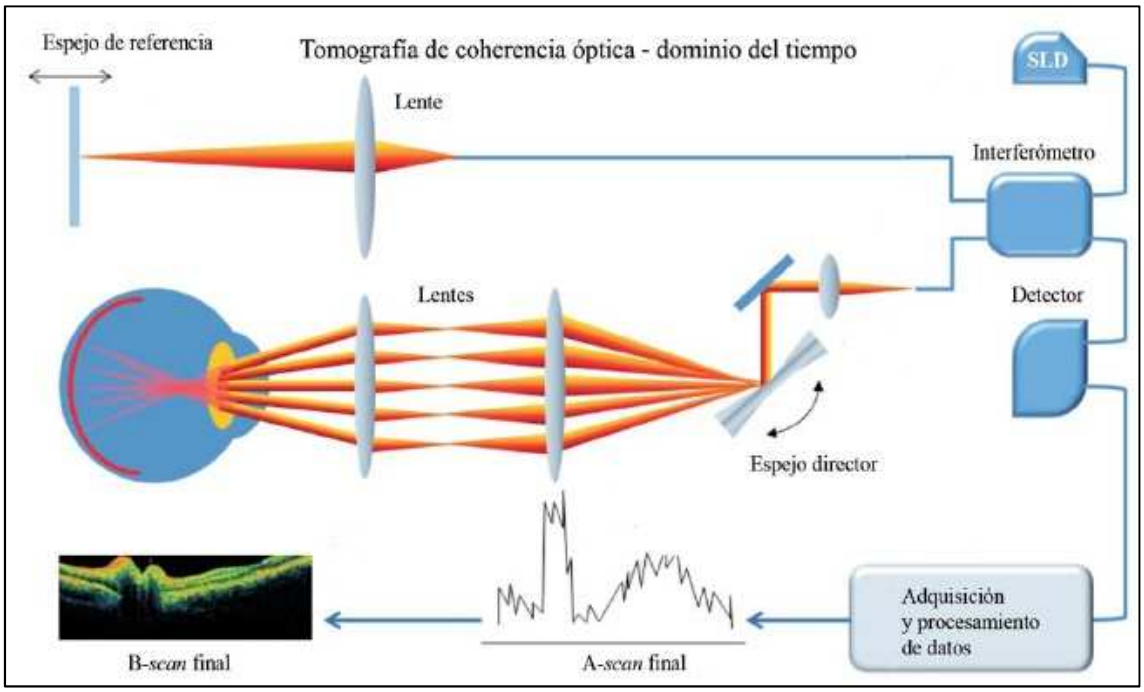

Figura 5. Tomografía de Coherencia Óptica de Dominio Temporal (Río Torres 2009)

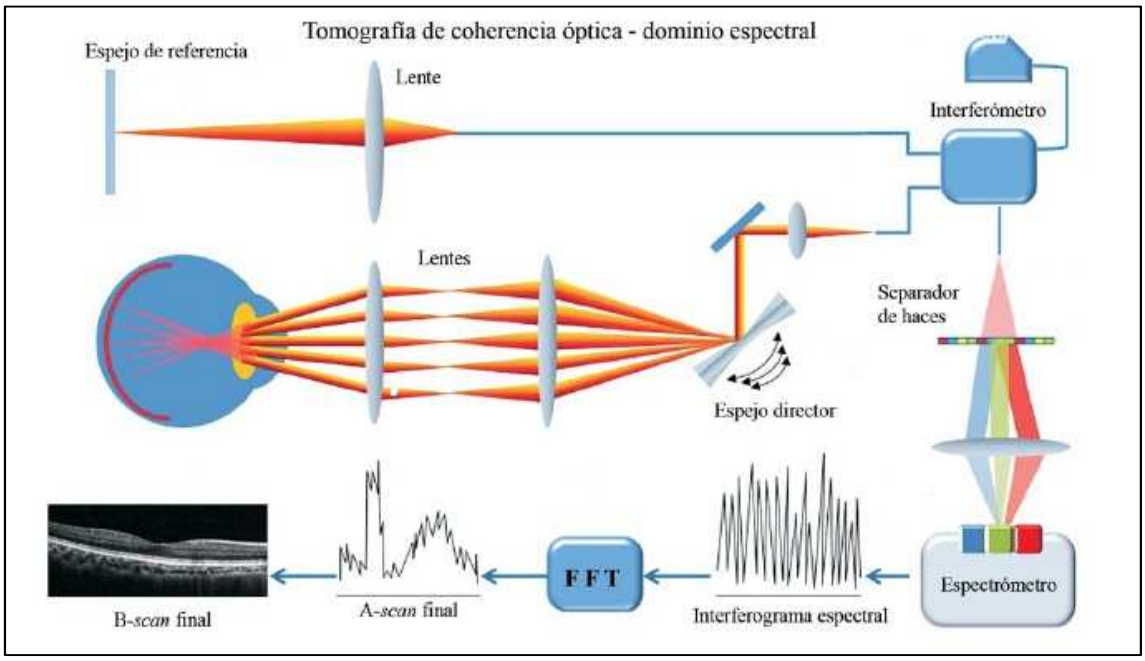

Figura 6. Tomografía de Coherencia Óptica de Dominio Espectral (Río Torres 2009)

En la actualidad junto con las constantes mejoras tanto de obtención de imágenes como de software en las SD-OCT, se están desarrollando nuevas tecnologías como: las OCT "*Ultra-High Resolution OCT (UHR-OCT)"* que proporcionan un incremento en la resolución de imágenes; la tecnología "*Swept-Source (SS-OCT)"* que mejora las imágenes obtenidas en profundidad y nos permite una mejor visualización de la coroides; el empleo del Doppler OCT que nos aporta información sobre la dinámica vascular similar a la angiografía fluoresceínica pero sin la necesidad de emplear un contraste; o el empleo de la OCT intraoperatoria en cirugía de cataratas [57,64,65].

2.1.5.2. Aplicaciones en oftalmología y cirugía refractiva

Inicialmente la OCT se utilizó para el estudio de la retina y sus patologías y con posterioridad se ha aplicado en el diagnóstico y seguimiento del glaucoma [57,66]. El potencial de la OCT para la toma de imágenes corneales fue descrito por primera vez por Izatt y colaboradores en 1994, con un prototipo del sistema OCT, que posteriormente se perfeccionó para dar lugar a los sistemas disponibles actualmente [67]. Para el estudio de la córnea se desarrolló un módulo de segmento anterior (OCT-SA), que obtiene imágenes con mayor resolución que las obtenidas por la BMU, en el que se separa el ojo para hacerlo coincidir con la distancia focal habitual de la retina [59]. La OCT-SA es una evolución de la de retina y usa una longitud de onda mayor (de 1.310 nm) que le permite una gran penetración en los tejidos que dispersan mucha luz como es la esclera y el limbo, lo que mejora la visualización de las estructuras del segmento anterior [68,69] **(Figura 7)**.

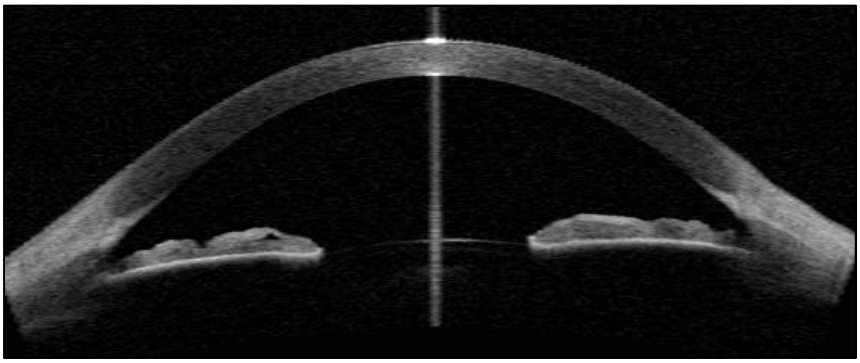

Figura 7. Imagen del segmento anterior con OCT-SA

El dispositivo Visante® es un TD-OCT de uso exclusivo en el segmento anterior. Fabricado por Carl Zeiss Meditec en el 2.005. Tiene una velocidad de 2.000 A-scans por seg, presenta una resolución axial de 10-20 µm y transversal de 60 µm. Permite la exploración automática de 360º, la medición entre dos puntos y un análisis cuantitativo de la cámara anterior, escaneando de 4 a 16 meridianos simultáneamente. Sus principales funciones son explorar la esclera, la conjuntiva, el cristalino, lentes intraoculares y las estructuras del ángulo esclerocorneal; medir el grosor corneal, la distancia ángulo-ángulo y el flap corneal; así como evaluar estática y dinámicamente la cámara anterior, permitiendo explorar la acomodación "*in vivo*" [51,58].

Existen otros dispositivos de OCT exclusivos de segmento anterior como el Slip-Lamp OCT (SL-OCT) fabricado por Heidelberg que se adapta a la lámpara de hendidura y el CASSIA SS 1000 (Tomey/AJL), siendo este último el único OCT-SA disponible basado en la tecnología *"Sweept-Source"* [70]. La SL-OCT desarrollada por Wirlebauer, permite monitorizar de forma objetiva los cambios en las capas corneales de un modo no invasivo y de no contacto, y aporta información precisa sobre su estructura, perfil y grosor [50,71–73].

Han sido constantes los avances en la tecnología OCT, pudiendo realizar también mapas paquimétricos con escáneres de alta velocidad (4.000 escáneres axiales por seg), muy útiles para el estudio de ectasias corneales y para preoperatorio de cirugías como la queratotomía astigmática, el implante de anillos intracorneales, la queratotomía fototerapeútica y la queratoplastia lamelar [58,74–76]. A su vez permite obtener mediciones de la profundidad y anchura de la cámara anterior, siendo muy útil en la planificación y seguimiento de la cirugía con implante de lentes fáquicas [69].

Dado que la OCT proporciona imágenes de alta resolución, se ha utilizado ampliamente en cirugía refractiva con láser excimer, donde además de la paquimetría, puede evaluar el estroma residual, el grosor y características del flap y el espesor epitelial en ablaciones de superficie [49,59,77–85]. Es una herramienta útil para mejorar la predictibilidad de procedimientos quirúrgicos de superficie tanto en cirugías primarias como en los retratamientos [86,87].

2.1.5.3. Estudio del grosor epitelial medido con OCT

Como ya se ha comentado, el epitelio corneal es una capa muy activa de la córnea que se autoregenera completamente en 5-7 días [88] y tiene un importante papel en el mantenimiento de la transparencia corneal y la calidad óptica [89]. Además de poseer una alta tasa de recambio celular, es muy reactivo a las irregularidades del estroma subyacente [90,91]. El epitelio contribuye al poder óptico de la córnea, dado que determina la forma de la interfase aire-película lagrimal y porque tiene un índice refractivo diferente al del estroma [92]. Se calcula que el epitelio aporta de media 1,03 D al poder óptico corneal [93]. Por ello, el perfil de grosor epitelial puede ser un factor determinante en la precisión de la cirugía refractiva corneal cuyo conocimiento podría ser de gran utilidad [94,95].

Existen diferentes métodos para medir el grosor epitelial: el microscopio confocal [53,54], el paquímetro óptico [96], la biomicroscopía ultrasónica digital de muy alta frecuencia [94,95] y la OCT [97–99] **(Figura 8)**.

La OCT-SA aporta información muy válida en el estudio morfométrico del segmento anterior, permitiendo medir con bastante exactitud el grosor corneal y el epitelial [47,100,101]. Numerosos trabajos han evaluado la exactitud, reproducibilidad y repetitividad del OCT como paquímetro de no contacto [50,73,75,102–104], al igual que su fiabilidad para medir el grosor epitelial en pacientes sanos [77,78,90,98,99,105,106]. A su vez, se ha hecho uso de la OCT para estudiar las variaciones diurnas del grosor epitelial [100,107], la respuesta de éste mismo a la hipoxia en portadores de lentes de contacto [99,108] y al ojo seco [109]; incluso el patrón de grosor epitelial se ha utilizado como herramienta en el diagnóstico del queratocono [90,110].

Tras cirugía refractiva con láser excimer, el epitelio corneal cambia su grosor para reestablecer una superficie óptica regular y lisa. En ablaciones miópicas con láser excimer, el epitelio central aumenta su grosor para compensar la eliminación de tejido estromal [111–113], y lo contrario ocurre en las ablaciones hipermetrópicas donde se ha encontrado un engrosamiento periférico anular y un adelgazamiento central del epitelio

corneal [113,114]; siendo ambos fenómenos, posibles causas de regresión refractiva [111,112,114]. Sin embargo, también se considera que la regresión podría estar más ligada con el recrecimiento estromal, que con el epitelial [87]. Por tanto, el conocimiento los cambios acontecidos en el grosor epitelial y estromal tras cirugía refractiva podría contribuir una mejor comprensión de los resultados de la misma y a mejorar la precisión de los mismos [115,116].

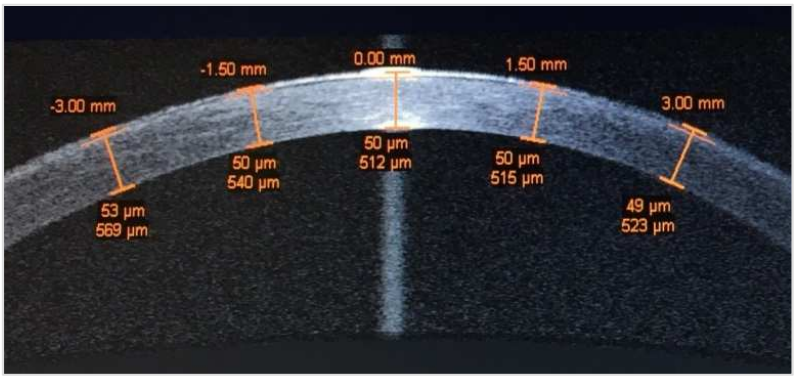

Figura 8. Imagen de las mediciones del grosor epitelial y estromal con Visante® OCT-SA

2.1.6. OTROS MÉTODOS DE NO CONTACTO

Existen otras técnicas para obtener los datos paquimétricos corneales. La reflectometría óptica de baja coherencia, que utiliza el mismo principio de interferometría de Michelson y con una resolución de 30 µm aporta información de la profundidad de la cámara anterior, la longitud axial y la paquimetría corneal [45]. Así mismo la fotografía rotacional del Scheimpflug, utiliza una cámara rotatoria que emite luz LED para la adquisición de imágenes, proporciona mapas de elevación corneal anterior y posterior, datos topográficos, queratométricos y paquimétricos [48]. La microscopía especular a través de la proyección de una luz en forma de sección óptica puede cuantificar el grosor corneal [117]. Los ultrasonidos de alta frecuencia (en inglés "*very high frequency ultrasound*") escanean una serie de meridianos en un movimiento de arco unido a la curvatura de la córnea. Esto permite medidas del espesor de capas corneales individuales sobre una zona de 8-10 mm en tres dimensiones [118]. Por último, la topografía de barrido de hendidura calcula el espesor corneal a partir de los datos de los mapas de elevación anterior y posterior [119].

2.2. MICROSCOPÍA CONFOCAL

La microscopía confocal es un método no invasivo que permite examinar la córnea humana "*in vivo*" en condiciones sanas y patológicas, siendo una herramienta muy poderosa tanto en clínica como en investigación [120].

Presenta varias ventajas frente a la microscopía óptica convencional, fundamentalmente que ofrece cortes ópticos seriados de forma no invasiva en especímenes intactos, e incluso en organismos vivos. Además, proporciona imágenes de mayor resolución al seleccionar un punto de enfoque eliminando la luz que reflejan los tejidos adyacentes fuera de foco. Tiene capacidad de obtener cortes ópticos, lo que permite generar imágenes en tiempo real desde diferentes profundidades dentro del espesor de un tejido, eliminando la necesidad de realizar procedimientos de sección y procesado de muestras [121].

2.2.1. HISTORIA

En las últimas décadas, las técnicas para examinar la córnea humana "*in vivo*", han evolucionado exponencialmente con el desarrollo de la microscopía especular, la topografía corneal computarizada, la tomografía de coherencia óptica, los ultrasonidos de alta frecuencia y la microscopía confocal.

La idea del microscopio confocal fue patentada por Minsky en 1957 para el estudio de las redes neuronales en el cerebro vivo. Pero ya en 1940 Hans Goldmann había publicado la primera descripción del microscopio confocal de uso clínico y fotografió la córnea de un animal ex vivo. El primer dispositivo mecánico similar a un microscopio confocal fue diseñado y producido por Eggar y Petran en 1967, el microscopio confocal de barrido en tándem o "*Tandem Scanning Confocal Microscope*" (MCBT). Obtuvieron las primeras imágenes de células cerebrales y ganglionares, así como de córneas animales, sin necesidad de escindirlos ni usar tinciones [122,123]. Posteriormente en 1985, Boyde demostró que el MCBT era capaz de hacer secciones histológicas de los

osteocitos en hueso intacto sin usar técnicas de procesamiento destructivas [121]. En el mismo año, Lemp y colaboradores, obtuvieron la primera imagen del espesor corneal completo en córneas de conejos [124]. Ulteriormente, fueron desarrollándose otros modelos de microscopio confocal como el de barrido en hendidura [125]y el de barrido láser. El dispositivo *Heidelberg Retina Tomograph* (HRT) II y III junto con el módulo de córnea Rostock (MCR) es el más reciente desarrollado y produce escáneres láser "*in vivo*" **(Figura 9)**.

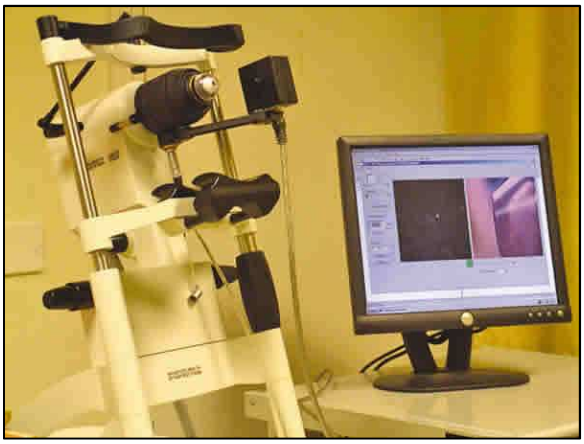

Figura 9. Microscopio confocal Heidelberg junto con el módulo de córnea Rostock

2.2.2. PRINCIPIOS ÓPTICOS Y DISEÑOS

El principio básico que utiliza la microscopía confocal es permitir secciones ópticas de un espesor relativo mediante la dispersión de la luz de un objeto [126].

En el prototipo original diseñado Minsky, el condensador del microscopio focalizaba la fuente de luz dentro de un área pequeña del tejido, haciendo coincidir el enfoque de la lente objetivo del microscopio en la misma zona. Debido a que el condensador y las lentes del objetivo tenían el mismo punto focal, el microscopio se denominó "confocal" [122].

En la actualidad hay tres tipos de microscopio confocal para uso oftalmológico: el de barrido en tándem, de barrido en hendidura y de barrido láser.

Como ya ha sido comentado, primer microscopio confocal utilizado para estudiar la córnea fue el MCBT desarrollado por Petran y colaboradores en 1967. Usa un sistema fuente-detector con un orificio que minimiza la cantidad de luz dispersada encima y debajo de un plano de enfoque. El resultado es un importante incremento en la resolución lateral y axial, comparado con la microscopía óptica convencional [127]. Los orificios se disponen en un disco giratorio, que permite un escáner del tejido en un tiempo real. Se puede registrar las imágenes utilizando un sistema de video o sistemas digitales de captura, pudiendo adquirir al menos 25 imágenes por seg [128].

Los microscopios de barrido en hendidura, usan dos haces de luz conjugados ópticamente para la fuente y detección, en lugar de apertura de orificios. El microscopio Koester tiene un único sistema de apertura óptica dividida y un sistema de trabajo a distancia con una lente cónica de inmersión, que permite obtener imágenes de todas las capas celulares de la córnea. El microscopio Confoscam tiene dos haces de luz de anchura ajustable que se encuentran en planos ópticos conjugados (fuente y detector) y un módulo de "scanning" mueve la imagen del haz a lo largo de toda la córnea en tiempo real. Las secciones ópticas se consiguen sincronizando la frecuencia y la fase de un escaner óptico con una videocámara. Así estos dos microscopios tienen capacidad para variar la profundidad de haz, lo que les hace técnicas más flexibles [120].

Por último, el Tomógrafo Heidelberg es el único que emplea tecnología láser (láser de diodo de 670 nm) [126,129]. Para escanear una imagen completa, el haz del láser debe desviarse mediante dos espejos en dos direcciones perpendiculares: horizontal para producir la línea de exploración y vertical para producir un análisis de campo. La luz reflejada se recoge para posteriormente digitalizarla y formar la imagen. Todos los diseños tienen un sistema de enfoque automático o manual, en el que el investigador puede desplazar la lente objetivo y elegir el espesor al que quiere tomar la muestra [126,129].

2.2.3. ESTUDIO DE LAS DIFERENTES CAPAS CORNEALES

Con la magnificación y resolución de los microscopios confocales disponibles actualmente, podemos observar las células corneales y sus núcleos. Todas las capas

corneales son identificables con microscopía confocal salvo la membrana de Descemet que no es visible en sujetos jóvenes, con la edad se observa una capa acelular entre el estroma y el endotelio [130].

2.2.3.1. Epitelio

Con el microscopio confocal, podemos diferenciar los tres tipos celulares del epitelio corneal [126,131]:

- La **células superficiales**: de bordes poligonales definidos, núcleos brillantes con un halo hiporreflectivo que destaca sobre un citoplasma homogéneo **(Figura 10)**.

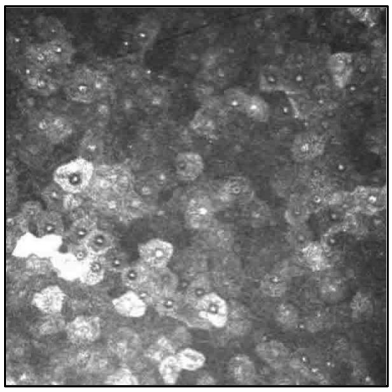

Figura 10. Imagen del epitelio superficial con microscopio confocal

- Las **células basales**: más pequeñas y numerosas, poligonales, sin núcleo hiperrefringente y citoplasma más denso. Forman un mosaico regular de cuerpos celulares oscuros con bordes brillantes **(Figura 11)**.

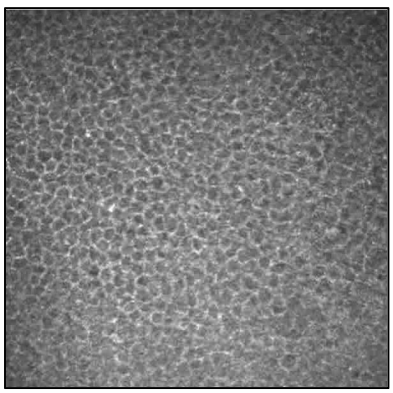

Figura 11. Imagen del epitelio basal con microscopio confocal

- Las **células intermedias**: igualmente poligonales, sin núcleo y con densidad intermedia.

La medida del grosor epitelial corneal con el microscopio confocal ha sido similar a la de la microscopía convencional, obteniendo un grosor medio de 48,6 ± 5,1 µm[3] [131,132].

2.2.3.2. Plexo nervioso subbasal y subepitelial

Tanto el plexo subepitelial, que se encuentra detrás de la membrana de Bowman como el plexo subbasal, situado entre la membrana basal epitelial y la parte anterior de la membrana de Bowman; son claramente identificables en córneas normales apareciendo como líneas blancas bien definidas con reflectividad homogénea [133] **(Figura 12)**.

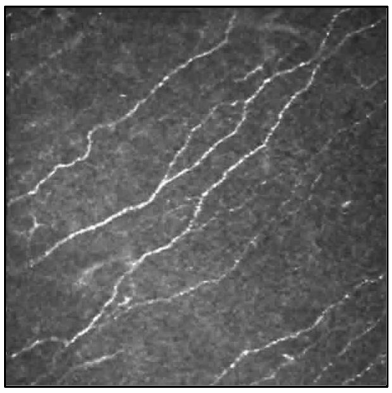

Figura 12. Imagen del plexo nervioso subepitelial con microscopio confocal

2.2.3.3. Capa de Bowman

Esta membrana aparece como una capa homogénea y amorfa. Se considera una capa acelular formada por haces de fibras de colágeno, pero en microscopía confocal, se han hallado células de Langerhans de diferente morfología (cuerpos celulares individuales, células con apariencia dendrítica y células organizadas formando una red con interdigitaciones dendríticas) [134].

2.2.3.4. Estroma

Los núcleos de los queratocitos se distinguen como cuerpos ovales, brillantes repartidos en la matriz extracelular de color grisáceo, casi transparente. En una córnea sana los cuerpos celulares de los queratocitos, sus procesos, la sustancia fundamental y las lamelas corneales son imposibles de diferenciar por la transparencia de las mismas [131,135,136].

Con la microscopía confocal se puede dividir el estroma corneal en tres subcapas:

- **Estoma anterior**: 100-150 µm bajo la membrana de Bowman
- **Estroma medio**: 150-350 µm centrales.
- **Estroma posterior**: 100 µm por encima de la membrana de Descemet.

La morfología de los queratocitos cambia en las diferentes capas: en el estroma anterior hay un gran número de queratocitos irregulares, de aspecto alargado y numerosos procesos; en el estroma medio, tienen una apariencia triangular con finos procesos; y en el estroma posterior son grandes, ovales e irregulares **(Figura 13)**. La diferente concentración de oxígeno que puede llegar a cada capa, así como su diferente actividad metabólica, podría explicar estas diferencias entre los queratocitos, debido a que la actividad mitocondrial es mayor en el estroma anterior seguida del posterior y por último en el estroma medio. La matriz extracelular también tiene un papel en la regulación de la actividad queratocitaria, por lo que se cree que diferentes composiciones en la matriz extracelular influirían en la existencia de las diferentes poblaciones de queratocitos [130,137].

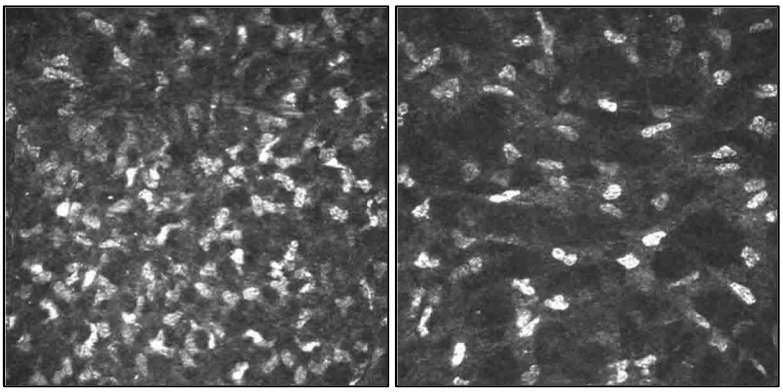

Figura 13. Imágenes del estroma anterior (izquierda) y medio (derecha) con microscopio confocal

La población queratocitaria, también varía a lo largo de las capas, siendo mayor en el estroma anterior y disminuyendo hacia el estroma posterior. En esto coinciden la mayoría de los autores, aunque los valores absolutos que reportan son bastante dispares [138,139].

2.2.3.5. Endotelio

Aparece como una monocapa de células hexagonales o poligonales con cuerpos celulares brillantes, sin núcleo visible. Los bordes celulares se encuentran bien definidos, finos y sin reflectividad [130,131] **(Figura 14)**. La microscopía confocal *"in vivo"* puede cuantificar la densidad endotelial con una reproducibilidad similar al del microscopio especular [140].

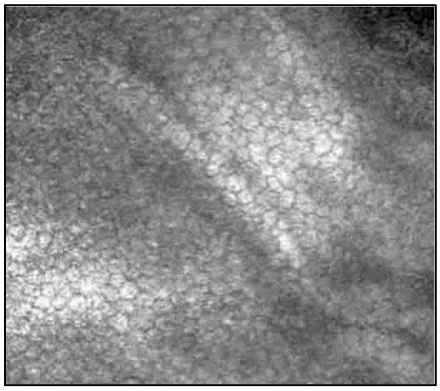

Figura 14. Imagen del endotelio con microscopio confocal

2.2.4. APLICACIONES EN OFTALMOLOGÍA Y CIRUGÍA REFRACTIVA

El uso de la microscopía confocal "*in vivo*" se ha extendido en oftalmología en los últimos años, fundamentalmente por el carácter no invasivo de la técnica. Se ha recurrido al microscopio confocal para el estudio de numerosas patologías corneales como la ectasia corneal, queratitis infeccionas, distrofias corneales; así como para la monitorización de los cambios producidos en la córnea con la edad, el uso de lentes de contacto y la cirugía corneal [141–144]. Con el microscopio confocal se pueden estudiar los efectos a nivel celular de lesiones en el epitelio y el estroma, cuantificando la apertura de la herida, la profundidad de crecimiento epitelial y el grado de fibrosis [145].

En cuanto a la cirugía refractiva corneal, el microscopio confocal es una herramienta excelente para estudiar a nivel microscópico la respuesta en el tejido corneal ablacionado. Se han cuantificado los cambios en el espesor corneal, epitelial y estromal tras cirugía refractiva, así como el grado de turbidez corneal producida por los procedimientos de ablación de superficie [53]. Es una valiosa técnica para la evaluación cuantitativa de la profundidad de ablación, así como el grosor del flap y la existencia de partículas en la interfase [48,146–148]. Ofrece grandes ventajas frente a la microscopía convencional, permitiendo el estudio de la córnea *"in vivo"* y en momentos diferentes. Por ello, el microscopio confocal es una técnica única para el estudio de los cambios celulares corneales tras cirugía refractiva y sus implicaciones en la cicatrización tisular incluso años después de la misma.

2.2.5. ESTUDIO DE LA DENSIDAD QUERATOCITARIA CON MICROSCOPÍA CONFOCAL

Como ya se ha comentado, tras una lesión epitelial la primera respuesta que encontramos en el estroma corneal es la apoptosis de los queratocitos, por lo que la capacidad de medir su densidad podría ser muy útil para analizar el papel que juegan en la cicatrización estromal tras cirugía refractiva.

La población queratocitaria en córneas normales ha sido medida de forma indirecta por histología, estudiando el ácido desoxirribonucleico (ADN) estromal; siendo éste un método invasivo que impide el estudio "*in vivo"* [132]. Rajan et al, diseñaron un modelo para mantener "*in vitro"* córneas humanas de bancos de ojos en condiciones similares a las fisiológicas, y estudiaron el efecto en la población celular corneal tras ablación de superficie [149]. Pero actualmente el único instrumento que permite cuantificar "*in vivo"* la densidad queratocitaria es el microscopio confocal.

Para poder valorar los resultados de densidad queratocitaria de los diferentes estudios publicados, hay que tener en cuenta que cada dispositivo tiene una profundidad de foco distinta, lo que podría hacer que las densidades medidas no fueran comparables [132].

Varios estudios han descrito una reducción en la densidad de queratocitos en el queratocono, en portadores de lentillas y tras cirugía refractiva bajo flap corneal, así como una distribución irregular de los mismos [150]. En cuanto al estudio de la densidad de los queratocitos en la cirugía por ablación de superficie, no existe consenso entre los diferentes estudios, aportando una gran variedad de resultados [87,149,151–155].

Aunque se desconoce el límite por debajo del cual, una población de queratocitos reducida supone riesgo para la estabilidad arquitectónica corneal, una distribución homogénea de los mismos parece ser un factor de prevención de las complicaciones de la cirugía refractiva y otras patologías corneales [150,151,155].

2.3. MICROSCOPÍA ESPECULAR

La microscopía especular es una técnica no invasiva utilizada para visualizar la morfología de la capa celular endotelial. Los principios que hacen de la córnea un tejido transparente, hacen que sus células sean prácticamente invisibles. No obstante, podemos observar las células endoteliales mediante reflexión especular. Para que se dé dicho fenómeno es necesaria una superficie plana, que en el caso de la córnea son las células planas endoteliales, y el cambio en el índice refractivo que existe entre las mismas y el humor acuoso [156].

Vogt describió en 1919 la apariencia especular del endotelio corneal normal y patológico. El primer microscopio especular fue desarrollado por Maurice en 1968, quien introdujo el término actualmente utilizado de microscopía especular [157]. Desde entonces, se han ido desarrollando diferentes modelos de microscopios especulares que permiten la realización de estudios *"in vivo"* sobre la morfología funcional endotelial y la toma de imágenes fotográficas de gran resolución [158,159].

Con el microscopio especular podemos obtener datos del endotelio como la densidad celular, el área celular media, el porcentaje de células hexagonales y la medida de la variación del tamaño celular o coeficiente de variación [160,161] **(Figura 15)** . El coeficiente de variación (=la desviación estándar de la superficie celular media / superficie celular media) es el índice más sensible de la disfunción endotelial y se encuentra en torno al 0.25 en la córnea normal. El incremento de este valor implica una variación en el tamaño de las células y se denomina polimegatismo. Otro parámetro morfométrico del estado del endotelio es la hexagonalidad, que es un buen índice de proceso de reparación de la herida endotelial. En una córnea sana alrededor del 70-80% de células son hexagonales. Sin embargo, un daño endotelial puede dar como resultado una disminución del valor de hexagonalidad y un aumento en la variabilidad del área celular. La desviación de la hexagonalidad se denomina pleomorfismo y puede constituir un signo de sobrecarga endotelial [13].

La microscopía especular ha tenido una gran importancia en la valoración del impacto de la cirugía del segmento anterior sobre el endotelio, en el diseño de lentes intraoculares, en la constitución de fluidos de irrigación intraocular y medicamentos. Su principal limitación es la degradación de la imagen cuando existe edema corneal, situación en la que el estudio de la morfología endotelial resultaría de gran utilidad. Además, no se ha hallado una buena correlación entre la morfología de las células endoteliales y su actuación funcional. De hecho, hasta que el número de células llega a ser muy bajo, existe una pobre correlación entre la densidad endotelial y el espesor corneal. Parece existir una situación de "todo o nada", en la que la reserva funcional de las células endoteliales es capaz de mantener una función de bomba normal hasta que el número de células disminuye de un determinado nivel, situado en torno a 500 celulas/mm^2 [162].

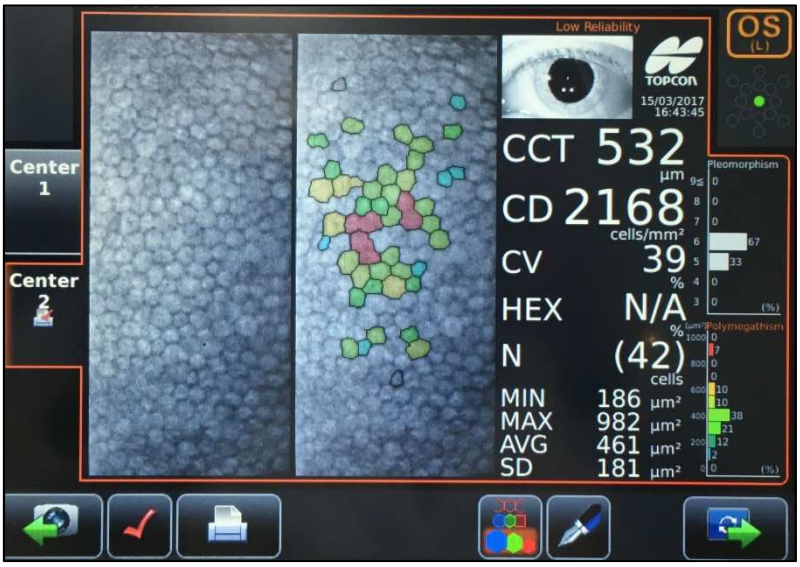

Figura 15. Imagen de las células endoteliales con microscopía especular

3. CIRUGÍA REFRACTIVA

La cirugía refractiva se define como cualquier intervención quirúrgica dirigida a alterar el poder dióptrico del ojo. Ha sido el deseo de la oftalmología de conducir a los pacientes a la emetropía, lo que ha motivado a los oftalmólogos al desarrollo constante y progresivo de la cirugía refractiva.

Los principales elementos refractivos del dioptrio ocular son la córnea, el cristalino y la longitud axial del ojo; siendo la superficie anterior de la córnea, concretamente la interfase aire-película lagrimal, la superficie refractiva más importante, responsable del 60-70% del poder dióptrico del ojo [163].

3.1. RECUERDO HISTÓRICO Y EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS

Las diferentes técnicas refractivas pueden clasificarse según el elemento refractivo sobre el que actúen: la longitud axial del ojo, la córnea o procedimientos intraoculares.

3.1.1. PROCEDIMIENTOS SOBRE LA LONGITUD AXIAL DEL OJO

Son las llamadas técnicas de refuerzo escleral**,** practicadas desde 1930. Consistían en la colocación de unas bandas sobre la esclera posterior, para modificar la longitud axial del ojo e intentar detener la progresión natural de la miopía [164]. Por tanto, al no corregir defectos refractivos, si no prevenirlos, podrían no considerarse estrictamente técnicas de cirugía refractiva. Hoy por hoy son técnicas en desuso por su poca predictibilidad y agresividad.

3.1.2. PROCEDIMIENTOS INTRAOCULARES

3.1.2.1. Extracción de cristalino transparente

El precursor de este tipo de cirugía fue Herman Boerhaave en el siglo XVIII, que ideó la cirugía de la extracción del cristalino transparente sin catarata en grandes miopes [165]. Las técnicas de extracción han evolucionado enormemente en los últimos siglos, desde la extracción intracapsular del cristalino a la extracapsular [166], pasando por la facoemulsificación (en la actualidad la más utilizada), hasta cirugía con láser de femtosegundo, técnica que está suponiendo una gran revolución en la actualidad [167].

3.1.2.2. Implante de lentes intraoculares fáquicas

La primera lente que se implantó en la cámara anterior para corregir la miopía, fue diseñada por Benedetti Strampelli en 1954. Pero la técnica fue abandonada por el diseño inapropiado y la escasa biocompatibilidad de la lente. Posteriormente se han desarrollado multitud de lentes fáquicas que se introducen en la cámara anterior (con fijación al ángulo camerular o al iris) o en cámara posterior justo delante del cristalino. Su uso queda relegado a los casos en que no se puede realizar cirugía refractiva sobre la córnea [163].

3.1.3. PROCEDIMIENTOS SOBRE LA CÓRNEA

La córnea es el principal objetivo de las técnicas de cirugía refractiva por dos motivos: su accesibilidad y su importancia en el poder dióptrico del ojo. La cirugía refractiva corneal va dirigida a modificar su poder dióptrico. En el caso de la miopía, la córnea debe ser aplanada para aumentar su radio de curvatura y reducir su potencia; y lo contrario se debe conseguir para corregir la hipermetropía. Hasta el desarrollo del láser excimer la cirugía refractiva corneal dividía fundamentalmente en tres tipos de procedimientos: incisionales, térmicos y lamelares [163].

3.1.3.1. La cirugía incisional

Se basa en realizar incisiones en la córnea para debilitar su estructura, de manera que la presión intraocular y las fuerzas biomecánicas induzcan cambios en la curvatura corneal.

- La **queratotomía radial** (*"Radial Keratotomy" –RK-),* consiste en debilitar la córnea periférica a través de cortes radiales de un 85-95% de espesor en la zona óptica paracentral, para provocar un aplanamiento corneal central y así tratar la miopía [168, 169]. Las principales desventajas de este procedimiento como la baja predictibilidad, la limitación del rango dióptrico a corregir y la hipermetropización progresiva; han llevado a su abandono en favor de técnicas más precisas [170].

- La **queratotomía astigmática** *("Astigmatic Keratotomy" –AK-),* es otro ejemplo de cirugía incisional para tratar el astigmatismo, en la que se realizan incisiones perpendiculares al eje más curvo para aplanarlo [171]. La capacidad de corrección del astigmatismo depende del número, la profundidad y la longitud de las incisiones, así como de la distancia al eje visual y de la edad del paciente [172]. Este procedimiento es de utilidad para reducir el astigmatismo prequirúrgico en cirugía de catarata [173], sin embargo, en pacientes que no tienen catarata, el láser excimer proporciona mayor predictibilidad [174].

3.1.3.2. La cirugía térmica

La **queratoplastia conductiva** [175] y la **termoqueratoplastia láser** [176], se basan en la aplicación de calor en la periferia corneal que produce una contracción del tejido subyacente, produciendo un aplanamiento en la periferia corneal con la consiguiente incurvación central [177]. Debido a la tendencia a la regresión y a la escasa predictibilidad, estas técnicas no tienen una aplicación vigente [178].

3.1.3.3. Procedimientos lamelares

Incluyen una gran variedad de técnicas diseñadas a alterar directamente la forma de la córnea mediante la adición o sustracción de tejido.

Se considera a Ignacio Barraquer el padre de la cirugía refractiva moderna. Investigó y desarrolló muchas de las técnicas que han servido de base para la cirugía actual. En 1964, propuso la primera técnica de cirugía refractiva con sustracción de tejido que denominó **queratomileusis** [179]. Consistía en realizar una queratectomía lamelar con un microqueratomo para obtener un lentículo completo. El lentículo se congelaba y colocaba en un torno para eliminar tejido corneal central (para la corrección de la miopía) o periférico (para la hipermetropía), para después suturarlo a la córnea. Encontró abundantes dificultades en la creación de ese lentículo, debido al diseño de los microqueratomos de esa época: lentículos finos, irregulares, incompletos, descentrados así como la penetración en la cámara anterior [180, 181].

La **epiqueratofaquia**, fue diseñada para eliminar la complejidad de la disección lamelar y el tallado intraoperatorio de la queratomileusis. Se basaba en tallar un flap de un donante cadáver para darle el poder refractivo necesario y después suturarlo a la córnea desepitelizada de un receptor [182]. La principal dificultad se encontraba en la reepitelización del injerto, con una alta tasa de infección y necrosis del lentículo. Así mismo, la técnica ofrecía resultados refractivos variables e incluso pérdida de agudeza visual en un número importante de pacientes, por lo que fue abandonada [183].

La **Queratoplastia Lamelar Automatizada o ALK** *("Automated Lamellar Keratoplasty"),* es el precursor de la cirugía moderna. Se desarrolló para superar las limitaciones de crear y tallar un lentículo. Con un microqueratomo se practicaban dos cortes sobre la córnea. En el primero, se creaba un colgajo lamelar no completo unido a la córnea por una bisagra y en un segundo "corte refractivo", el microqueratomo eliminaba un lentículo pequeño del lecho estromal que aplanaba la córnea central y corregía la miopía. Por último se reposicionaba sobre el lecho estromal el colgajo lamelar inicial [184]. Los resultados eran poco predecibles y está técnica fue relegada por el desarrollo del láser excimer [185].

3.1.3.4. El láser excimer

La aparición del láser excimer ha supuesto el avance más importante de la cirugía refractiva. El término "excimer" es una combinación de "*excited*" y "*dimer*", en referencia a que la luz láser está producida por un gas noble (Argón) y un halógeno (flúor). La luz emitida de 193 nm de longitud de onda (dentro del rango de la radiación ultravioleta), libera fotones de alta energía que provocan la ruptura de las uniones moleculares de la superficie ablacionada. Así permite modificar los parámetros refractivos de la córnea a través de la interacción fotoquímica entre la superficie del tejido corneal y el haz del láser. Stephen Trokel en 1983 fue el primero en opinar que el láser excimer podría ser capaz de eliminar el tejido corneal para corregir errores refractivos con precisión submicrométrica (inferior a una micra) sin producir un daño térmico a los tejidos circundantes [186]. En 1985 fue operado el primer ojo humano con láser excimer y desde entonces se ha convertido en el método de elección para la corrección refractiva a nivel mundial [187].

Existen dos métodos de liberación de energía del láser excimer: haz ancho y barrido. El **láser de haz ancho** fue el primero en desarrollarse, e incide en la córnea simultáneamente en toda el área a tratar y a pesar de la uniformidad aparente de la energía del haz, se pueden observar irregularidades en forma de isletas centrales que provocan un astigmatismo irregular [188]. El **láser de barrido** como bien indica su nombre, barre la superficie de la córnea modificando su longitud y orientación,

consiguiendo ablaciones más homogéneas y corrección de errores refractivos más complejos [189]. Una variación de los láseres de barrido, son los **láseres de punto volante**, en los que un haz de pequeño diámetro se mueve rápidamente sobre la córnea según un patrón dirigido por computadora gracias a espejos galvanométricos. Estos láseres permiten tallar patrones de ablación específicos como las ablaciones guiadas por aberrometría y las ablaciones asféricas, para conseguir una mejor calidad visual postoperatoria [190]. Asimismo, con el desarrollo de los sistemas de rastreo ocular *("eye tracking"*) que permiten seguir los movimientos oculares y desplazar el impacto microsegundos, se consigue mantener un perfil de ablación regular [191].

El desarrollo del láser excimer ha introducido el término de "*Laser Vision Correction (LVC)",* en el que se produce un cambio en la curvatura corneal y por tanto en su poder dióptrico, debido a la sustracción del tejido corneal que es realizado con láser excimer. Los defectos miópicos, se tratan ablacionando el tejido corneal en el centro del eje visual, los hipermetrópicos en forma de anillo en la media periferia corneal y el astigmatismo, eliminando un cilindro de tejido estromal en el eje preciso. Según cómo se aplique el láser sobre la córnea, podemos dividir las técnicas de cirugía refractiva con láser excimer en:

- **Procedimientos de ablación de superficie**: en las que aplicamos el láser sobre el estroma justo bajo el epitelio corneal una vez se ha retirado el mismo. Existen dos técnicas fundamentalmente: Queratectomía Fotorrefractiva o PRK ("*Photorefractive Keratectomy"*) y Queratectomía Subepitelial Asistida mediante Láser Excimer o LASEK ("*Laser Assisted Subepithelial Keratectomy").*

- **Procedimientos bajo flap**: en los que el láser se aplica sobre el lecho estromal tras la creación de un flap mediante un microqueratomo: Queratomileusis In Situ con Láser Excimer o LASIK ("*Laser Assisted In Situ Keratomileusis*") o con láser de femtosegundo (FS).

3.2. QUERACTECTOMÍA FOTORREFRACTIVA

Originalmente el láser excimer se utilizó sobre la superficie corneal, eliminando previamente el epitelio, denominándose a esta técnica PRK. La eliminación del epitelio se puede realizar mecánicamente con un raspado o con el propio láser excimer (PRK transepitelial). El láser se aplica directamente sobre la capa de Bowman y se ablaciona el estroma anterior, dejándolo expuesto hasta que reepitelice [192]. Para reducir el dolor postoperatorio se coloca una lente de contacto terapéutica, se prescriben analgésicos orales y antiinflamatorios no esteroideos (AINES) tópicos [193]. Los AINES retrasan la epitelización, e incluso se han visto casos de adelgazamiento y "*melting*" corneal por lo que deben usarse con cautela [194, 195].

Con la PRK se consiguen resultados refractivos satisfactorios en pacientes con baja y moderada miopía [196]. Estudios con seguimiento a largo plazo [58, 197] mostraron una gran estabilidad en la refracción, lo que suponía una gran ventaja frente a las técnicas anteriores, como la queratotomía radial, que mostraba una hipermetropización progresiva años después de la cirugía [170]. Pero la alta miopía tiene mayor incidencia de regresión por fenómenos de hiperplasia epitelial y regeneración estromal [198].

Además de la regresión, otro de los inconvenientes de esta técnica, era la aparición de una cicatriz fibrótica hipercelular, formada por miofibroblastos y una matriz extracelular densa y desorganizada con abundante colágeno, que alteraba la transparencia corneal [25, 199, 87, 26.] Este fenómeno que se denomina en inglés "*haze*", aparece los primeros meses tras la PRK, llegando a un máximo a los 3-6meses, para reducirse rápidamente al año de la cirugía y lentamente hasta los 6 años [197].

Las limitaciones de esta técnica (el dolor postoperatorio, la lenta recuperación visual, la aparición del haze y la limitación para tratar altas miopías), hicieron resurgir las técnicas de *queratomileusis* y ALK, aplicando la nueva tecnología desarrollada. Así se modificaron para que la corrección se realizara sobre el estroma y no sobre el lentículo (*queratomileusis in situ*) y se sustituyó el corte refractivo del microqueratomo por la ablación con láser excimer (LASIK) [200].

3.3. QUERATOMILEUSIS IN SITU CON LÁSER EXCIMER

Esta técnica es una combinación de la cirugía lamelar y el láser excimer. Se realiza una queratectomía mediante un microqueratomo mecánico, obteniendo un disco o flap corneal que es levantado para aplicar el láser excimer sobre el lecho estromal y colocado nuevamente sobre la córnea sin sutura [201, 202].

Las ventajas de esta técnica derivan de mantener el epitelio y la membrana de Bowman intactas: reducción del dolor postoperatorio, mayor rapidez en la recuperación de la agudeza visual, menor incidencia de aparición de turbidez corneal o cicatrices y reducción de la medicación en el postoperatorio [203]. Esto contribuyó a que el LASIK fuera la técnica más utilizada en cirugía refractiva corneal.

Con la aparición de nuevos microqueratomos y la mejora de los algoritmos del láser, se han ampliado las indicaciones del LASIK, pudiendo tratar la vasta mayoría de defectos refractivos con buena predictibilidad, eficacia y seguridad [204].

Pero a pesar de los buenos resultados obtenidos con el LASIK, esta técnica no se encuentra exenta de complicaciones. La ectasia postLASIK es su complicación más grave, relacionada con el debilitamiento de la resistencia mecánica de la córnea. Consiste en un adelgazamiento progresivo y un aumento de la curvatura corneal, que conlleva la aparición de un astigmatismo irregular y finalmente la pérdida de agudeza visual [205]. Se asoció inicialmente a un lecho estromal residual excesivamente fino [206], a ablaciones profundas [207] y a la topografía preoperatoria irregular [208]. Por ello los límites de seguridad de la cirugía se tuvieron que ampliar [209]: dejando un lecho estromal mayor, reduciendo el rango dióptrico de ablación, atendiendo a los patrones topográficos sospechosos [210]; lo que redujo el número de pacientes candidatos al LASIK [211].

Existen otras complicaciones asociadas al uso de microqueratomo como la obtención de flaps incompletos, colgajos libres, "*buttonholes*" (agujeros centrales en el flap) e incluso la penetración en la cámara anterior [212]. Entre las complicaciones postoperatorias encontramos las estrías del flap [214], el endocrecimiento epitelial [215], la queratitis lamelar

difusa [216], las queratitis infecciosas [217], la epiteliopatía neurotrófica [218] y el ojo seco [213,219]. Por todo ello, se ha impulsado el desarrollo de microqueratomos más seguros pero siguen existiendo complicaciones en córneas finas, planas o demasiado curvas [220].

3.4.LÁSER DE FEMTOSEGUNDO

En la investigación para mejorar la seguridad en el corte del flap, apareció el láser de femtosegundo [221]. El láser de FS tiene la propiedad de administrar pulsos ultracortos de 10^{-15} seg, lo que permite obtener una gran potencia con pulsos de baja energía, gracias a un sistema amplificador de pulsos. La córnea al ser un tejido transparente no absorbe la energía del láser de FS, lo que le diferencia del láser excimer. La emisión del láser es tridimensional y el haz se enfoca a la profundidad corneal seleccionada [222].

El láser de femtosegundo produce un fenómeno de disrupción molecular [223], en el que el tejido objetivo es vaporizado generándose unas burbujas de cavitación de un volumen muy pequeño, con poco daño térmico colateral. Estas burbujas se expanden para crear un plano de escisión de las lamelas corneales [224]. El láser realiza el flap en dos pasos: primero crea un plano de resección horizontal a la profundidad que marque el cirujano y en un segundo lugar, realiza una sección lateral (los bordes del flap), dejando una zona sin tratar que será la bisagra. La posición de la bisagra, el diámetro y el espesor del colgajo se pueden ajustar para cada cirujano [221, 222].

Los flaps del femtosegundo tienen una forma planar, con un espesor constante en todo el colgajo, a diferencia del microqueratomo, que es más grueso en la periferia, lo que de confiere una forma meniscada. Ésto hace que sea muy infrecuente la aparición de ojales en el flap [225].

El femtosegundo ha mejorado la precisión y predictibilidad del espesor del flap, con mucha menor variabilidad que el microqueratomo [226]. Su uso puede ser especialmente beneficioso en pacientes con órbitas hundidas, ojos pequeños, córneas extremadamente planas; ya que existe una menor posibilidad de producir un ojal en el flap, un corte incompleto y un corte descentrado. Disminuye por tanto las complicaciones intraoperatorias de la cirugía LASIK convencional [81,227,228]. También se pueden obtener

flaps más finos y con angulación periférica, lo que le aportaría una mayor estabilidad al flap [229]. No obstante, sigue existiendo las complicaciones postoperatorias inherentes al flap, e incluso aparecen nuevas complicaciones propias del láser de femtosegundo como el Síndrome de Sensibilidad Transitoria a la Luz o TLSS ("*Transient Light Sensitivity Syndrome*") [230].

Actualmente se están desarrollando nuevas aplicaciones del láser de femtosegundo en cirugía refractiva, como es la creación de un lentículo refractivo asistida por láser de femtosegundo para la corrección de la miopía y el astigmatismo miópico, sin necesidad de utilizar el láser excimer: la técnica de extracción lenticular de pequeña incisión sin flap o *Small Incision Lenticule Extraction (SMILE)* y la extracción lenticular con femtosegundo mediante la creación de un flap o *Femtosecond Lenticule Extraction (FLEx)* [231,232].

4. LASEK

Los avances en cirugía refractiva corneal con ablación de superficie, intentan aprovechar las ventajas de la PRK (exenta de las complicaciones asociadas a la obtención del flap) pero reduciendo sus inconvenientes (el haze, el dolor y la lenta recuperación visual), mediante la creación y posterior reposición de un flap epitelial. De ahí nace el LASEK [233]. La reposición de flap epitelial iba inicialmente dirigida a intentar mantener la viabilidad de las células epiteliales para aumentar la velocidad de reepitelización, disminuir la inflamación y la respuesta cicatricial del estroma, consiguiendo así una reducción del haze y el dolor [234,235].

El primero en reponer el epitelio al finalizar la cirugía fue Azar en 1996 y llamó a su procedimiento: "*Alcohol-Assisted Flap PRK*" [236]. La técnica fue popularizada posteriormente por Camellin que acuñó el término de "*Laser-Assisted Subepithelial Keratectomy*", concebida como un híbrido entre PRK y LASIK [237,238].

4.1. TÉCNICA QUIRÚRGICA

La técnica radica en la separación del epitelio junto su membrana basal, de la capa de Bowman, facilitada por el uso de alcohol que rompe los anclajes entre estas capas [239]. En concreto rompe los hemidesmosomas que mantienen unido el complejo epitelio-membrana basal-capa de Bowman, separando así la lámina densa de la lámina lúcida de la membrana basal epitelial [240].

A través de un marcador cilíndrico de 7-9 mm de diámetro centrado en la pupila, se pone en contacto etanol diluido al 18-20% con el epitelio corneal durante 20-40 seg [241]. El borde del flap epitelial demarcado se separa y se repliega, dejándolo unido por una bisagra que puede ser superior o temporal según las preferencias del cirujano. Posteriormente, la ablación con láser excimer se realiza sobre la capa de Bowman y el estroma anterior. Por último, se irriga el lecho estromal y se recoloca el flap epitelial con una cánula o una espátula, cubriendo todo el área tratada con láser y se coloca una lente de contacto terapéutica hasta que la córnea se haya reepitelizado [236,239,242].

Una alternativa a esta técnica quirúrgica, es el **Epi-LASIK**, en la que el epitelio se separa del estroma de un modo mecánico, utilizando un separador romo similar a un microqueratomo, cuya ventaja teórica frente al LASEK es que el epitelio se puede separar como una hoja completa sin el uso de alcohol que podría ser potencialmente tóxico [243].

4.2. RESPUESTA CELULAR

Ante la agresión quirúrgica, la córnea responde mediante mecanismos de cicatrización tisular para reparar el daño causado. Esta repuesta depende de diversos factores: la lesión conjunta del epitelio y del estroma (en las ablaciones de superficie) o fundamentalmente del estroma (en el LASIK), el grado de lesión estromal (según sean ablaciones superficiales o profundas), el uso de fármacos que modulen la respuesta inflamatoria y cicatricial (como los corticoides o la mitomicina C –MMC-) y factores individuales que explican las diferentes respuestas en pacientes sometidos a la misma intervención [22,244].

La respuesta ante el LASIK consiste una reacción inflamatoria no fibrótica e hipocelular en la interfase, que no produce pérdida de transparencia corneal. A ese nivel se hallan un menor número de queratocitos sin fenotipo miofibroblástico y una matriz extracelular formada en su mayor parte por proteglicanos y escaso colágeno [25]. En el láser de Femtosegundo, se observa una respuesta similar, aunque parece existir una mayor muerte celular, proliferación celular e infiltración inflamatoria que con el microqueratomo [225], que podrían ser los causantes de la pérdida de transparencia que se observa en los bordes del flap y del síndrome TLSS [245].

Sin embargo, en la ablación de superficie, la córnea responde con el desarrollo de una cicatriz fibrótica hipercelular en el área ablacionada, en el estroma más anterior. Las células epiteliales son las primeras involucradas en la reparación corneal tras cirugía de ablación de superficie, proliferan y migran desde el limbo y la membrana basal epitelial para alcanzar el cierre epitelial. A su vez en el estroma, se produce una apoptosis de queratocitos, seguida de una migración y proliferación de los queratocitos circundantes para repoblar la zona y una diferenciación de éstos hacia miofibroblastos. Los miofibroblastos, se caracterizan en el examen con microscopía confocal, por provocar una mayor dispersión de la luz tanto por el aumento de reflectividad de su núcleo, como de su cuerpo celular y sus prolongaciones. Además, la eliminación de tejido estromal dañado y su sustitución por colágeno y matriz extracelular nuevos, da lugar a un tejido más denso y desorganizado, que contribuye a disminuir la transparencia corneal causante del haze [25,87,199] **(Figura 16)**.

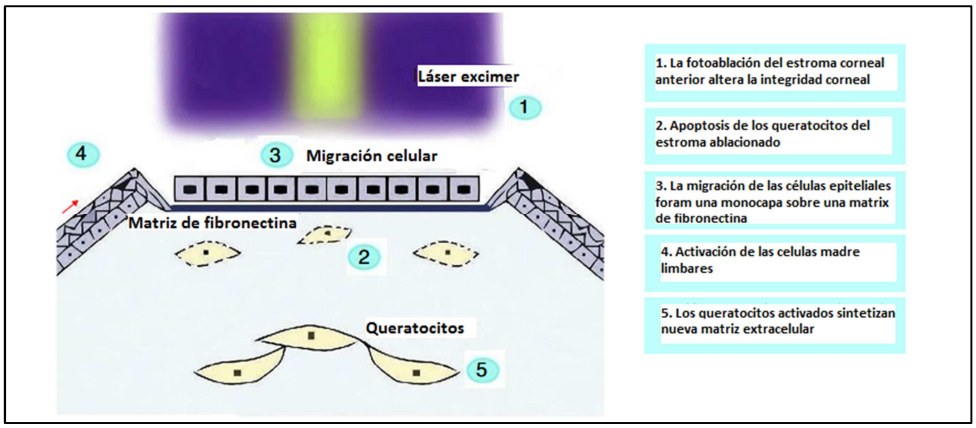

Figura 16. Primeros pasos de la cicatrización corneal tras ablación de superficie **(Tomás-Juan. *Journal of Optometry 2015).***

Estas diferencias en la cicatrización del LASIK y la ablación de superficie, tienen su origen en la interacción entre el epitelio y el estroma. La lesión epitelial, en concreto de su membrana basal, parece inducir la apoptosis de los queratocitos, su migración, activación y diferenciación en miofibroblastos [246]. La lesión epitelial en la ablación de superficie es mucho mayor que en el LASIK, que se produce sólo en los bordes del flap [245]. Se ha descrito una mayor aparición de haze tras láser de femtosegundo cuando se generan flaps extremadamente finos, debido a la proximidad de la membrana basal epitelial y su posible lesión por la fotodisrupción creada por el láser [247]. La desepitelización en sí misma, ya produce la apoptosis de queratocitos [149,248,249] debido a la liberación de citoquinas por el epitelio dañado, principalmente interleuquina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) [250, 27]. Se produce a su vez la proliferación y migración de los queratocitos periféricos y del estroma posterior hacia el área dañada [28,29,149], con la aparición de queratocitos activados y células inflamatorias [30]. El epitelio lesionado también produce TGFβ y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que modulan la diferenciación de estos queratocitos activados a miofibroblastos [31,251]. Actualmente se conoce que los miofibroblastos también derivan de precursores de la médula ósea que entran a través de los vasos del limbo, atraídos por las citoquinas liberadas tras la lesión epitelial [24]. Los miofibroblastos producen colágeno, matriz extracelular, metaloproteinasas, colagenasas y gelatinasas, que están implicados en las dos complicaciones más importantes de la cirugía por ablación de superficie: la regresión y el haze [25,26,199,252]. Cuando la membrana basal epitelial se regenera y recupera su estructura y función, se reducen los niveles de TGFβ y PDGF; el balance TGFβ/ IL-1 se intercambia y se produce la apoptosis de los miofibroblastos. Se restaura progresivamente la transparencia corneal porque los queratocitos que entonces pueblan el estroma anterior producen una matriz extracelular normal [30,245].

La membrana basal epitelial parece ser el factor fundamental que regula la respuesta celular tras la ablación de superficie, su lesión produce la cascada inflamatoria para la diferenciación en miofibroblastos y su reparación, invierte esta respuesta [253]. En el LASEK a pesar de ser una técnica de ablación de superficie como la PRK, la reposición del flap epitelial podría disminuir la interacción epitelio-estroma, de hecho se ha encontrado una menor concentración de TGFβ y otras citoquinas en la lágrima en el postoperatorio temprano en LASEK frente a PRK [254]. Al principio se pensó que era

necesario mantener un epitelio viable, pero se ha visto que la reepitelización en el LASEK se produce bajo el flap epitelial y que es inicialmente más lenta[149,255]. Este retraso en el inicio de la reepitelización y la menor concentración de citoquinas en la lágrima, podrían responder al efecto barrera producido por el flap epitelial, que como consecuencia reduce la remodelación estromal [27]. Parece por tanto, que no es imprescindible que el epitelio reposicionado sea viable o esté intacto. Esto lo podemos observar en la técnica de epi-LASIK, donde la viabilidad celular epitelial se conserva mejor, pero el flap epitelial también es sustituido por un epitelio nuevo y dicho flap no ha mostrado ventajas con respecto al creado con alcohol en el LASEK, sino que incluso se ha relacionado con mayor dolor postoperatorio [256–259].

Existen varios estudios con córneas animales que apoyan la hipótesis de que mantener el flap epitelial retrasa la interacción entre el epitelio y el estroma, y por tanto la respuesta estromal cicatricial. Esquenazi et al. [260] y Laube et al. [261] describieron una menor apoptosis de queratocitos y su transformación en miofibroblastos tras LASEK comparado con PRK, en córneas de conejo. Javier et al. [262] encontraron menor depósito de colágeno tipo III en córneas de polluelo sometidas a LASEK que en las sometidas a PRK.

Encontramos estudios en córneas humanas in vitro, como el de Rajan et al. [149] que crean un modelo para mantener córneas de bancos de ojos en condiciones similares a las fisiológicas y comparan el efecto de diferentes técnicas de cirugía refractiva. Al comparar la reepitelización entre PRK y LASEK, describen un mayor periodo de latencia, una menor migración epitelial durante la misma con LASEK. En el estroma encuentran la misma pérdida de queratocitos, pero con un retraso en la repoblación queratocitaria con LASEK.

Gracias al desarrollo de la microscopía confocal, se pueden realizar estudios en córneas humanas "*in vivo*". Vinciguerra et al. [263] no encontraron diferencias significativas entre PRK y LASEK, mientras que Rokita-Wala et al. afirman que el LASEK es una técnica menos invasiva, con menor aparición de haze [264].

Los estudios que comparan los efectos clínicos de LASEK y PRK obtienen resultados muy variables. La mayoría [265–267] no encuentran diferencias en cuanto al dolor

postoperatorio, aunque dos estudios describen menor dolor tras LASEK [254,268]. En cuanto la reepitelización, la mayor parte de los estudios no parten del mismo área despitelizada, por lo que sus resultados no son comparables entre sí. Los únicos estudios en los que el diámetro de desepitelización es el mismo para ambas técnicas, no encuentran diferencias estadísticamente significativas [234,267]. Ningún estudio encuentra mayor incidencia de haze tras LASEK, en incluso algunos describen menor haze. Tampoco encuentran evidentes diferencias en cuanto a seguridad, eficacia y predictibilidad [234,254,268].

4.3. INDICACIONES

El LASEK evita las complicaciones asociadas a la creación de un flap estromal y se indica principalmente en aquellas situaciones en las que el LASIK está contraindicado: córneas finas, riesgo de traumatismos (deportes de contacto, policías, militares) y alteraciones de la superficie ocular como ojo seco, erosiones corneales recidivantes o enfermedades de la membrana basal epitelial [239,269]. El LASEK es menos traumático y más cómodo en pacientes que presentan órbitas profundas y una hendidura palpebral pequeña. También es más seguro en pacientes nerviosos y en pacientes muy jóvenes, dado que se puede realizar un retratamiento tardío con independencia de cuánto tiempo haya pasado desde la primera intervención. Se puede aplicar para tratar regresiones miópicas tras cirugía LASIK complicada, como los agujeros del flap o flaps incompletos [242]. Asimismo se han obtenido buenos resultados en el tratamiento de defectos refractivos residuales tras queratoplastia penetrante [270].

Numerosos estudios muestran buenos resultados refractivos tras LASEK [271,272]. Pero el hecho de que la predictibilidad disminuya a medida que aumenta la ametropía tratada [273] y que existe mayor incidencia de haze con ablaciones profundas [274], había relegado el LASEK al tratamiento de miopía baja o moderada. Entonces comenzaron a surgir estudios, donde se planteaba el uso de MMC intraoperatoria, para tratar la alta miopía reduciendo la incidencia de haze [275–277] y en la actualidad se utiliza de manera habitual para el tratamiento de cualquier defecto refractivo miópico.

4.4. COMPLICACIONES

Tanto la hipo como la hipercorrección ocurren de manera ocasional tras LASEK. La hipercorrección puede ser resultado de una excesiva deshidratación estromal previa a la aplicación del láser, que provoca inicialmente una mayor ablación estroma [242,266]. La hipermetropización que se hallaba al comienzo de la técnica y que podía durar hasta 6 meses [197,278], actualmente apenas aparece debido al desarrollo de nuevos láseres excimer así como su aplicación sobre zonas ópticas y de transición mayores, lo cual reduce también la incidencia de deslumbramiento y halos nocturnos [242].

La queratitis bacteriana es un riesgo potencial, particularmente antes del cierre epitelial. Su incidencia es baja, pero supone una gran amenaza para la visión [279]. Generalmente es causada por Gram positivos, y en menor medida Gram negativos, incluso se aislado gérmenes como *Mycobacterium Chelonae* [280]. Por ello se aconseja suspender el porte de lentes de contacto entre una y tres semanas antes de la intervención y se realiza un tratamiento intensivo de la blefaritis. El riesgo de queratitis puede prolongarse durante los primeros meses tras la intervención por la presencia de pequeños defectos epiteliales que se detectan con lámpara de hendidura. La queratitis estéril con la aparición de depósitos subepiteliales es otra complicación que se ha asociado al uso tópico de AINES en el postoperatorio [281].

El ojo seco ocurre generalmente tras cirugía refractiva en pacientes predispuestos con alteraciones en la lágrima preexistentes. Los factores de riesgo son mujeres postmenopáusicas, la presencia de una enfermedad autoinmune, fundamentalmente el Síndrome de Sjögren y determinada medicación sistémica [282]. Se conoce que tras ablación de superficie existe menor riesgo de desarrollar ojo seco, así que si existe alguna duda sobre la calidad de la lágrima del paciente, el tratamiento refractivo de elección debe ser PRK o LASEK [242].

Una minoría de pacientes desarrolla erosiones corneales recidivantes, generalmente fuera de la zona tratada. Debido a que el láser destruye los nervios del plexo nervioso sub-basal y del estroma anterior y que los que se regeneran puede tener una morfología

diferente e hipersensibilidad, algunos pacientes pueden tener dolor hasta un año después de la cirugía [242].

El riesgo de ectasia corneal tras ablación de superficie es menor que tras LASIK, de hecho se han descrito escasos casos y sólo en pacientes con un queratocono frustre preexistente o con antecedentes familiares de queratocono, pero no en pacientes con córneas sanas [283,284].

Por último, aunque se comentará en detalle más adelante, el haze era un problema significativo en cualquier cirugía de ablación de superficie que se ha reducido con la aplicación de nuevos protocolos de láser y MMC [242,285].

5. MITOMICINA C

5.1. QUÉ ES

La MMC es un antibiótico genotóxico que por su acción alquilante, una vez activado en las células impide la síntesis de ADN y secundariamente la mitosis celular [286,287]. Es un potente agente antineoplásico que inhibe a largo plazo la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno [277]. Fue aislado por primera vez en cultivos de Streptomyces caespitosus en 1956 [163]. Ha sido ampliamente utilizada como agente quimioterápico sistémico, dado que ejerce su máximo efecto antiproliferativo sobre las células con mayor actividad mitótica [288,289]. Se administra por vía intramuscular y es metabolizada por el hígado. Su uso sistémico provoca mielosupresión marcada y puede causar daño renal y fibrosis pulmonar [290].

5.2. USOS EN OFTALMOLOGÍA

En oftalmología, la MMC ha sido utilizada por su actividad antimitótica, para el tratamiento de diversas patologías. Su uso tópico a diferentes concentraciones, se ha

aplicado de forma satisfactoria para reducir la recurrencia del pterigión [291,292], aunque se han encontrado complicaciones de su uso repetido tales como edema y perforación corneal, uveítis anterior, glaucoma y catarata [293,294]. Se ha empleado de forma intraoperatoria en la cirugía de pterigión [295,296] y glaucoma [297,298] para disminuir la cicatrización al reducir la proliferación fibroblástica, secundariamente la recidiva del pterigión o el fracaso de la ampolla de filtración [299]. A pesar de encontrar escasas complicaciones asociadas [300], se han observado casos de adelgazamiento corneo-escleral con riesgo de perforación tras cirugía de pterigión [301] y también la formación de ampollas avasculares con riesgo de filtración e infección, así como casos de descompensación corneal tras su aplicación en cirugía filtrante [302,303]. Para evitar el desarrollo de estas complicaciones, se ha reducido el tiempo de aplicación así como la concentración y se aconseja cubrir la esclera expuesta con conjuntiva [300]. También se administra de manera tópica para el tratamiento de las neoplasias de la superficie ocular [304–310], mostrándose muy efectiva y bien tolerada, siendo sus principales efectos adversos la alergia y la estenosis del punto lagrimal, sin haberse descrito importantes complicaciones [311].

Por último, su capacidad para reducir la proliferación celular y la cicatrización corneal condujeron a su aplicación en cirugía refractiva para disminuir el haze [312]. Se ha utilizado para prevenir la aparición de haze en el tratamiento primario de ablación de superficie [275,277,313–319], para tratar el haze preexistente asociado a otras cirugías refractivas previas [320–323] y para el tratamiento de defectos refractivos residuales en el LASIK [324–326] y sus complicaciones (flaps incompletos o agujeros en el lentículo) [327–330], la queratoplastia penetrante [331–334] y la queratotomía radial [318,335,336].

5.3.HAZE

5.3.1. FISIOPATOLOGÍA

El haze se define como una pérdida de la transparencia corneal tras una agresión (como puede ser la cirugía refractiva corneal) producida por la cicatrización estromal. Inicialmente se produce una apoptosis de queratocitos [26], seguida de una migración y

proliferación de los queratocitos circundantes[149]. En respuesta a citoquinas epiteliales, fundamentalmente TGFβ, algunos queratocitos se diferencian en miofibroblastos. Estas células son la base del haze, no sólo por el aumento de la reflectividad de su núcleo, sino también su cuerpo celular y procesos dendríticos, provoca una mayor dispersión de la luz [25,26,87,199]. Adicionalmente, los miofibroblastos participan en la remodelación de la matriz extracelular. El estroma eliminado por la ablación es sustituido por una matriz densa y desorganizada con abundante colágeno tipo III, que contribuye a la disminución de transparencia corneal [25].

El haze se clasifica según el grado de opacidad corneal [337]:

- **Grado 0:** córnea transparente.
- **Grado 0,5:** opacidad corneal difícilmente visible con biomicroscopía.
- **Grado 1:** opacidad subepitelial reticular que no afecta a la visión pero se ve fácilmente con lámpara de hendidura.
- **Grado 2:** opacidades corneales que impiden ver los detalles iridianos.
- **Grado 3:** opacidades confluentes que disminuyen la agudeza visual.
- **Grado 4:** opacidades densas que impiden el examen de la cámara anterior.

La mayoría de los pacientes intervenidos con ablación de superficie desarrollan haze de bajo grado (0,5-1) dentro del proceso de cicatrización normal. Escasos casos tienen un haze más severo con pérdida de agudeza visual [338]. El haze aparece semanas después de la intervención, alcanzando su máximo a los tres meses y reduciéndose posteriormente de forma espontánea [196,339,340]. Existen casos de haze tardío más allá de los 3 meses tras la cirugía y se relacionan con la regresión refractiva [341–343].

Se desconoce la etiología del haze, aunque se ha asociado a la exposición a luz ultravioleta [344], la queratoconjuntivitis vírica [345], los traumatismos , el embarazo [346] y el lupus eritematoso sistémico [347]. El factor más claramente asociado, es la profundidad de ablación [274,348]. Pero deben existir otros factores individuales o exógenos, que expliquen las diferentes respuestas entre pacientes que intervenidos del mismo modo [349,350]. Algunos autores postulan que factores genéticos, como alteraciones hereditarias de la membrana basal epitelial, podrían tener un papel en desarrollo del haze en algunos casos [351].

5.3.2. PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

Para modular la respuesta cicatricial y la aparición del haze, se han utilizado los corticoides tópicos con resultados muy variables [352–357]. También se ha intentado reducir la incidencia de haze con membrana amniótica [358,359], suplementos vitamínicos [353,360,361] y anticuerpos anti-TGF [362,363], sin establecer claramente su eficacia.

La mitomicina C se comenzó a usar en 1991 en cirugía refractiva con láser excimer por Talamo y colaboradores [345]. En su estudio, observaron que las córneas de conejo que recibían MMC tópica durante dos semanas en el postoperatorio de la cirugía, presentaban un menor depósito subepitelial que las no tratadas. Igualmente, Schipper y colaboradores, observaron una reducción en los queratocitos y el tejido cicatricial en conejos tratados con PRK y MMC intraoperatoria al 0,04% durante 5 minutos (min) [364]. Majmudar y colaboradores, describieron la primera serie de ojos humanos que recibían MMC para tratar cicatrices corneales secundarias a cirugía refractiva (queratotomía radial y PRK). Publicaron una mayor transparencia corneal con una única aplicación de MMC al 0,02% durante 2 min y postularon que el efecto antiproliferativo de la MMC sobre los queratocitos activados podría prevenir el depósito anormal de colágeno y la formación de haze [320]. En su estudio, Carones y colaboradores [276], observaron una menor tasa de haze en pacientes tratados con LASEK y MMC intraoperatoria al 0,02%, comparado con el grupo en el que no se aplicó MMC. Desde entonces se ha extendido su uso y se aplica de manera profiláctica para prevenir el haze tras ablación de superficie con buenos resultados [365].

5.4. EFECTOS DE LA MMC SOBRE LA CÓRNEA

La MMC se ha convertido de utilidad en cirugía de ablación de superficie por su capacidad de interferir en el proceso de cicatrización estromal. Se aplica sobre el estroma desepitelizado tras realizar la ablación con láser excimer. Se han estudiado ampliamente los efectos histopatológicos de la MMC. Estudios animales demuestran

que inmediatamente tras aplicarlo en el estroma ablacionado se observa una mayor tasa de apoptosis de queratocitos, seguida a las veinticuatro horas por una menor repoblación queratocitaria [366]. Tras cuatro semanas, existe una menor densidad de queratocitos y miofibroblastos, con una reducción en el depósito de colágeno y matriz extracelular [321,367,368]. Como resultado disminuye la pérdida de transparencia corneal tras ablación de superficie [369–372].

Además del efecto antiproliferativo que ya hemos comentado, la MMC presenta un efecto citotóxico que explica la mayor tasa de apoptosis de queratocitos hallada en modelos animales tras su aplicación [373]. No obstante, la MMC impresiona de ser más eficaz para prevenir el haze que para tratarlo [374,375], debido a que su capacidad antimitótica parece ser mayor que su efecto citotóxico sobre los miofibroblastos [321]. De hecho, la concentración para alcanzar el efecto antiproliferativo de la MMC es menor, que la necesaria para provocar citotoxicidad [376].

Se ha intentado determinar cuáles son los mecanismos que activa la aplicación de MMC a nivel celular. Se ha observado una detención en el ciclo celular, inducción a la apoptosis y lisis celular [377–381]. Se desconoce cómo las células reparan los daños inducidos por la MMC y la duración de los mismos. Estudios realizados sobre cultivos de fibroblastos así como la aparición de haze tardío, sugieren que el efecto tras una única exposición no es permanente y que las células que no se ven afectadas por la MMC suplen a las afectadas [313,341,382].

Con todo, no están exactamente esclarecidos los mecanismos por los que la MMC actúa sobre la córnea.

5.5. DOSIS Y TIEMPO DE APLICACIÓN

Inicialmente se aplicaba MMC a una dosis de 0,02% durante dos min sobre el estroma ablacionado [320]. Posteriormente la tendencia ha sido intentar reducir la dosis y el tiempo de aplicación, y dilucidar si son también efectivos para prevenir la aparición de haze

[313,317,321,372,376,383–389], basándose en que el efecto de la MMC es dosis y tiempo dependiente [376].

Estudios animales sobre los efectos de la MMC en función de la dosis y tiempo de aplicación, como el de Netto y colaboradores, corroboran que dosis menores (0,002%) y tiempos de aplicación más cortos (12 seg), tienen el mismo efecto en la prevención del haze [321]. También se ha encontrado una relación directamente proporcional entre la apoptosis de los queratocitos, la concentración y el tiempo de administración de la MMC, siendo más fuerte con la concentración [366]. En córneas humanas, Rajan y colaboradores, confirmaron que a mayor tiempo de exposición mayor era la reducción en el número de queratocitos [372].

De entre los estudios clínicos en los que se ha usado MMC a dosis menores de 0,02%, Camellin obtuvo una menor incidencia de haze aplicando una "pincelada" de MMC al 0,01% tras LASEK comparado con controles [383]. Thornton y colaboradores, encontraron una reducción significativa de haze en pacientes tratados con MMC al 0,002% tras LASEK comparado con controles sin MMC [317]. Posteriormente los mismos autores hicieron una revisión retrospectiva de ojos tratados con MMC al 0,02% y 0,002%, hallando menor haze en el grupo de 0,02%; sobre todo en alta miopía y ablaciones profundas, e incluso reportan casos de haze muy severo en el grupo que recibió MMC al 0,002% [386]. Hofmeister no encontró una disminución de la incidencia de haze utilizando una dosis de MMC al 0,01% en diferentes tiempos de aplicación [387], sin embargo Razmjoo et al. [388] recomiendan dosis de 0,01% al no hallar diferencias en cuanto al haze comparado con la dosis de 0,02%. Es por ello que la dosis de 0,02% de MMC parece la opción más efectiva para la alta miopía o ablaciones profundas, pero más estudios son necesarios para establecer la eficacia de concentraciones menores en la miopía moderada [365,390]. A pesar de estos estudios con menores concentraciones, la dosis habitualmente utilizada es 0,02% [275–277,315].

En cuanto al tiempo de aplicación, teniendo como referencia el estudio de Netto y colaboradores [321] y debido a la ausencia de evidencia que establezca la dosis óptima, la tendencia es a reducir la exposición para reducir los posibles efectos secundarios de la MMC [390]. El fármaco es aplicado habitualmente entre 12 seg y un minuto según la profundidad de ablación [277,313,315,321]. Aunque según los resultados aportados por los

trabajos de Song y colaboradores, los cambios en el tiempo de exposición tienen menos impacto en la absorción de la MMC por la córnea y el humor acuoso, que cambios en su concentración [366,391].

El factor de riesgo más claramente relacionado con el desarrollo de haze es la profundidad de ablación [274,348]. No existe consenso en cuanto a la profundidad a partir de la que debe utilizarse MMC de manera profiláctica, dado que se desconoce la ablación exacta por debajo de la cual no existe riesgo de haze [274,315,321,392].

En cuanto al tratamiento del haze previo, la MMC se aplica en igual concentración pero durante un tiempo más prolongado, generalmente dos min, para alcanzar así su efecto citotóxico sobre los miofibroblastos ya existentes [320,322,323].

5.6. EFECTOS ADVERSOS DE LA MMC EN LA CÓRNEA

Las complicaciones de la MMC halladas en cirugía de glaucoma y pterigión [294,301,302], no han sido descritas asociadas a cirugía refractiva corneal. Quizá esto se deba a que los tejidos sobre los que actúa la MMC en el pterigión y el glaucoma están profusamente vascularizados. La MMC podría lesionar el endotelio vascular, producir un efecto isquémico sobre el tejido [393] y subsidiariamente la necrosis del mismo [313]. En cambio, en cirugía refractiva, la MMC se aplica sobre la córnea avascular, afectando por citotoxicidad directa a los principales tipos celulares corneales: las células epiteliales, los queratocitos y las células endoteliales. Debido a que la MMC afecta en mayor medida a las células con mayor actividad mitótica [163], el epitelio y los queratocitos, serían teóricamente las estipes celulares más alteradas por la exposición a la MMC [394].

5.6.1. EPITELIO

Los trabajos que estudian el efecto de la MMC sobre el epitelio corneal publican resultados variables.

En cuanto a la reepitelización, en modelos animales Chang y colaboradores [395], estudiaron el efecto de distintas concentraciones de MMC (0,01% y 0,02%) aplicada durante 2 min en córneas de conejo. Encontraron un reepitelización retrasada dosis dependiente en los ojos tratados con MMC comparados con controles. No obstante, esta diferencia no fue hallada en el estudio también en córneas de conejo de Lai y colaboradores [367]. En corneas humanas in vitro, Rajan et al. [372] encontraron retraso en el inicio de la reepitelización dependiente del tiempo de aplicación de la MMC comparado con controles. Una vez que se iniciaba la misma, la tasa de migración celular y la reepitelización completa sólo se veía retrasada en el grupo al que se le aplicó MMC durante dos min, pero no en el que solamente se sometió a un minuto de exposición. Así mismo, el grosor y la morfología epitelial al mes eran similares entre el grupo control y el tratado con un minuto de MMC; no así, en el grupo con 2 min de aplicación de MMC, en el que el epitelio era significativamente más delgado y peor diferenciado.

Aunque los estudios publicados sobre córneas humanas *"in vivo"*, no específicamente diseñados para estudiar el efecto de la MMC sobre el epitelio, sugieren una falta de toxicidad epitelial clínicamente significativa de este fármaco [275–277,313,323,383], existe un caso publicado de queratitis punctata persistente tras el uso intraoperatorio de MMC al 0,02% durante 2 min [396]. Considerando que el tiempo de exposición de la MMC suele ser actualmente más corto, éste podría ser el motivo por el que no se observan complicaciones de este tipo [277,313,315,365,372]. A pesar de la aparente falta de toxicidad epitelial de la MMC, no encontramos estudios clínicos prospectivos comparativos que determinen realmente el efecto de la MMC en el cierre agudo de la úlcera quirúrgica tras LASEK.

Existe otro aspecto de la posible toxicidad de la MMC sobre el epitelio que no ha sido estudiado en profundidad: el efecto de este fármaco en el desarrollo de hiperplasia epitelial postoperatoria. Se conoce que tras la ablación estromal, el epitelio reacciona con un hipertrofia de las células de la capa basal, y si ésta no es suficiente para conseguir una superficie corneal lisa, el epitelio desarrolla una hiperplasia para compensar la posible irregularidad del estroma, siendo ésta la causa más probable del engrosamiento corneal observado en el postoperatorio [25,111,112,114,397]. Se cree que la hiperplasia es más acusada cuando se tratan zonas ópticas pequeñas o en las ablaciones profundas, debido a que existe un marcado cambio de curvatura en los bordes del área

de ablación [21,398,399]. Como el epitelio parece tener un importante papel en poder dióptrico corneal total, se cree que la hiperplasia epitelial es una de las posibles causas de regresión refractiva tras ablación de superficie [112,400]. Sin embargo, también se ha descrito la existencia de un engrosamiento estromal postoperatorio [87,397,401] relacionado con la regresión [87,401] e incluso algunos autores comentan que el efecto combinado del recrecimiento tanto del epitelio como del estroma es responsable del engrosamiento corneal total [397,400–402], y en algunos casos se correlaciona fuertemente con la regresión miópica [400].

Gracias al desarrollo de nuevas tecnologías como el OCT de segmento anterior y la microscopía confocal, podemos monitorizar los cambios acontecidos en el grosor epitelial y estromal tras la cirugía refractiva [79,115,116]. Si el epitelio tuviese un patrón de respuesta predecible tras cirugía, su conocimiento podría ayudar a la mejoría en la precisión de sus resultados [95], sobre todo para altos grados de miopía [403]. De hecho, Huang y colaboradores elaboraron un modelo matemático de los cambios en el epitelio corneal tras la ablación refractiva, que explica la aparición de regresión y aberraciones. Y proponen tenerlo en cuenta para desarrollar patrones de ablación que compensen los cambios en el epitelio para conseguir mejores resultados visuales [113].

Para analizar el efecto de la MMC sobre el grosor epitelial corneal, debemos conocer el efecto de la propia cirugía de ablación de superficie sobre el mismo. En cuanto a los estudio en córneas animales publicados a este respecto, Lohmann y colaboradores [403], hallaron un engrosamiento epitelial significativo en córneas de conejo en la zona de ablación a las 3 semanas que contribuía a la regresión miópica, siendo ésta mayor a mayor grado de ametropía a tratar. Estos resultados coinciden con los publicados por Beuerman y colaboradores, que encontraron un engrosamiento epitelial en córneas de primates en el área central de ablación, siendo mayor en el grupo que más dioptrías de miopía fueron corregidas [404]. Sin embargo, otro estudio no encontró hiperplasia epitelial significativa tras PRK en córneas de conejo, sino un engrosamiento estromal que justificaría el incremento del grosor corneal en el postoperatorio [52]. Aunque entre los estudios en córneas humanas existen inconsistencias en los resultados del grosor epitelial tras PRK (sin MMC), la mayoría encuentran un epitelio inicialmente más delgado, que posteriormente aumenta de grosor [86,112,115,397,400,401], y en algunos casos se mantiene significativamente más grueso años después de la intervención [397,400,401].

Entre los estudios que analizan el posible efecto de la MMC sobre a hiperplasia epitelial tras ablación de superficie, existe un trabajo realizado por Xu et al. en córneas de conejo en el que no encuentran diferencias en la evolución postoperatoria del grosor epitelial evaluado histológicamente asociadas al uso de MMC al 0,02% durante 5 min tras PRK [371]. Rajan y colaboradores [372], en bancos de córneas humanas mantenidas "*in vitro*", encontraron un grosor epitelial disminuido a las 4 semanas con la aplicación de MMC a 0,2µg/ml (microgramos / mililitro) durante 2 min, sin encontrarlo en el grupo que se aplicó durante 1 minuto, sugiriendo que la MMC podría alterar la capacidad del epitelio de producir la hiperplasia. Chen y colaboradores [405] estudiaron con confocal los cambios epiteliales tras EpiLASIK, y compraron los resultados entre un grupo que recibió MMC al 0,02% durante 30-40 seg y un grupo control sin MMC. Observaron un mayor daño en los flaps epiteliales asociado al uso de MMC, encontrando un menor número de células basales y apicales morfológicamente normales.

El único trabajo que encontramos publicado de córneas humanas "*in vivo*" en el que estudian el grosor epitelial con OCT tras PRK con MMC al 0,02% durante dos min, es el de Kaluzny y colaboradores [406]. En él comparan el grosor epitelial entre dos técnicas de ablación de superficie: PRK con despitelización con alcohol al 20% y PRK transepitelial utilizando en ambos grupos MMC (sin un grupo control en el que no se aplique MMC); sin encontrar diferencias entre ambos. Describen un engrosamiento epitelial moderado en el postoperatorio, siendo máximo al cuarto día (casi 10 micras más grueso) que disminuye progresivamente hasta casi equipararse con los valores preoperatorios a los 3 meses. No hemos encontrado ningún otro estudio del grosor epitelial con OCT tras ablación de superficie con MMC a la dosis y tiempo habitualmente aplicados y con un seguimiento mayor de 3 meses, lo cual podría ayudar a definir si la MMC interfiere en el patrón normal de hiperplasia epitelial corneal tras ablación de superficie, signo de su posible toxicidad epitelial.

5.6.2. ESTROMA

Los queratocitos son la principal diana celular de la MMC para conseguir su efecto anti-haze. La aplicación de este fármaco produce, como ya se ha comentado con anterioridad, una mayor apoptosis de los mismos, así como una inhibición en su proliferación, activación y diferenciación en miofibroblastos [321,367–371,407]. El efecto antimitótico de la MMC, ha hecho que se tema de los posibles efectos a largo plazo que podría tener la depleción de la población queratocitaria y si ésta podría suponer un problema para la estabilidad corneal futura [26,30,289,321,408].

Sin embargo, antes de valorar el efecto de la MMC sobre la población estromal, hay que tener en cuenta el efecto a largo plazo de la propia ablación láser en dicha población que es también tema de controversia. Rajan et al. [149], estudiando córneas humanas mantenidas "*in vitro*", describen una depleción de queratocitos en las primeras semanas tras cirugía de superficie, con una repoblación queratocitaria progresiva, de manera que a las 4 semanas se ha recuperado prácticamente el valor preoperatorio y en algunos casos llega a superarlo. Sin embargo, los estudios con microscopia confocal en córneas humanas "*in vivo*" encuentran resultados contradictorios en la densidad queratocitaria del estroma anterior. Mientras que algunos estudios describen una depleción de queratocitos, incluso a los 5 años tras ablación de superficie sin MMC [151,154,155], otros no encuentran ese descenso [152] e incluso algunos reportan un aumento en la densidad queratocitaria [25,87,153]. Los resultados hallados en el estroma posterior, sí son más congruentes, sin encontrar modificaciones en su densidad en ninguna de las revisiones [87,151,153].

Los escasos estudios que analizan el efecto del uso de MMC intraoperatoria sobre los queratocitos, también muestran datos muy heterogéneos sobre la densidad queratocitaria en el estroma anterior a largo plazo. Los estudios en córneas animales, muestran por lo general, una depleción queratocitaria dosis y tiempo dependiente, incluso 6 meses tras la intervención con MMC como coadyuvante [321,369,371]. El estudio de Rajan et al. [372] en córneas humanas "*in vitro*" comparó el efecto sobre la población queratocitaria de aplicar MMC al 0,02% durante 1 y 2 min frente a un grupo control. Halló una disminución inicial de queratocitos en el estroma anterior similar en los 3 grupos, pero

la repoblación queratocitaria se encontraba retrasada en los grupos en los que se utilizó MMC, siendo mayor a mayor tiempo de exposición, reduciendo la densidad queratocitaria a las 4 semanas en los grupos con MMC frente al control. Existe un trabajo de córneas humanas *"in vivo"* con microscopía confocal que estudia la densidad queratocitaria a largo plazo tras la aplicación de MMC al 0,02% durante 2 min realizado por Gambato et al. [275]. En él describen una depleción inicial de queratocitos del estroma anterior seguida de una progresiva repoblación, con un incremento de la población queratocitaria y la aparición de queratocitos activados. A los 6-12 meses tras PRK con MMC sugieren que existe una tendencia a la normalización de la densidad queratocitaria pero no aportan datos numéricos en su escrito. Los queratocitos del estroma profundo permanecen quiescentes sin cambios en su densidad, al igual que en el trabajo de Rajan et al. [372], lo cual parece indicar que ni la MMC, ni la propia ablación (como se ha comentado anteriormente) afectan a las capas estromales profundas.

5.6.3. ENDOTELIO

El endotelio, aunque se conoce que mantiene cierta capacidad proliferativa [409], es la estirpe celular corneal con menor actividad mitótica y por tanto menos susceptible de la posible toxicidad de la MMC [34,36,410]. Sin embargo, es importante estudiar la potencial citotoxicidad de la MMC sobre el endotelio, porque sus consecuencias podrían ser devastadoras para la visión [390].

Torres y Song detectaron la presencia de MMC en la cámara anterior tras su aplicación tópica sobre la córnea en modelos animales [366,391,411]. Lo cual sugiere que el fármaco entra en contacto con el estroma profundo y el endotelio, planteando la cuestión de una posible toxicidad endotelial de la MMC. Se ha demostrado que la exposición directa a la MMC a las concentraciones utilizadas sobre la superficie ocular, llevaría a una rápida lesión endotelial [412,413]. Afortunadamente, salvo la entrada inadvertida de MMC a cámara anterior en casos de cirugía filtrante de glaucoma, la MMC a esa concentración no llega aponerse en contacto con el endotelio. Las concentraciones detectadas en cámara anterior tras la aplicación de MMC sobre la córnea desepitelizada son mucho menores [366,391,411].

Los estudios que analizan el efecto de la MMC sobre la densidad endotelial son escasos y con resultados variables. Gambato y colaboradores, no encontraron alteraciones morfológicas en el endotelio en el grupo tratado con MMC al 0,02% [275]. Chan estudió el efecto de la MMC al 0,01% y 0,02% durante dos min en córneas de conejo. Descubrió un edema corneal transitorio dosis dependiente y una reducción de la densidad endotelial [395]. Hay que tener en cuenta que el endotelio en el conejo es diferente al humano, puesto que mantiene una continua capacidad mitótica [410], siendo por tanto más susceptible al efecto de la MMC. McDermott analizó los efectos de la aplicación directa de solución salina balanceada (BSS) y diferentes concentraciones de MMC en córneas humanas de donantes [414]. Mientras que el BSS y 20 µg/ml de MMC tenían una respuesta similar, 200 µg/ml de MMC producían importantes cambios endoteliales. Se ha observado que la aplicación puntual de MMC desde 10 µg/ml a 100 µg/ml sobre células fibroblásticas y endoteliales cultivadas no producía ninguna toxicidad, pero sí aparecía cuando se mantenía la exposición de manera más prolongada [415]. Por tanto el efecto en el endotelio humano de la MMC también es dosis y tiempo-dependiente. Las concentraciones de MMC detectadas en humor acuoso tras su aplicación en ablación de superficie son mucho menores [366,391,411], lo que sugiere que no alcanzan niveles tóxicos para el endotelio corneal. Aunque se han detectado daños persistentes en el ADN de las células endoteliales de córneas de cabra sometidas a bajas concentraciones de MMC, que hacen temer sobre las consecuencias a largo plazo del uso de la MMC sobre el endotelio corneal [416,417].

Los efectos a largo plazo de estos cambios en córneas humanas "*in vivo*" son todavía tema de controversia. Existen 2 trabajos que evidencian un descenso endotelial asociado al uso de MMC [418,419], pero otros no reportan ningún cambio [275,313,335,420–424]. No se han descrito casos de edema corneal tras la exposición a la dosis habitual de MMC intraoperatoria en ablación de superficie [365,390]. Aunque sí hay un caso de edema corneal tras la aplicación de MMC en cirugía refractiva ocurrió en un paciente tras su aplicación tópica y repetida postoperatoria [425].

JUSTIFICACIÓN

La posible toxicidad de la MMC en los procedimientos de cirugía refractiva corneal sobre sus principales estirpes celulares es de gran relevancia.

Como hemos podido comprobar, no encontramos estudios prospectivos comparativos que determinen realmente el efecto de la MMC en la reepitelización corneal tras LASEK. Tampoco hemos encontrado estudios de los efectos a largo plazo de la MMC sobre el patrón de grosor epitelial a la dosis habitualmente aplicada. Ambas cosas podrían ayudar a definir si la MMC interfiere en el patrón normal de cierre y crecimiento epitelial corneal tras ablación de superficie, signos de su posible toxicidad epitelial.

No encontramos en la literatura trabajos que estudien el efecto de la MMC sobre el engrosamiento corneal total tras ablación de superficie, considerando este una medida indirecta de la hiperplasia epitelial o el recrecimiento estromal descritos tras cirugía de superficie.

En cuanto a los queratocitos del estroma, no hemos encontrado estudios que aporten evidencia sobre el efecto a largo plazo de la MMC aplicada intraoperatoriamente sobre la población queratocitaria, ni el límite por debajo del cual una reducción en el número de los queratocitos supone realmente un riesgo para la estabilidad arquitectónica corneal. La pregunta si el efecto de la MMC sobre la población estromal podría facilitar el desarrollo de ectasia o melting corneal tras ablación de superficie, no se ha respondido aún.

Así mismo, apoyándonos en la literatura existente, no podemos determinar si existe realmente un efecto tóxico de la MMC sobre el endotelio corneal cuando se utilizada a las dosis y tiempo de aplicación habitualmente empleados en cirugía refractiva de ablación de superficie.

Por todo lo referido anteriormente, y ante la ausencia de evidencia científica, consideramos de gran interés estudiar los efectos de la MMC sobre la biología celular corneal (epitelio, estroma y endotelio), dada la trascendencia que los resultados podrían tener en la práctica clínica habitual de la cirugía refractiva por ablación de superficie.

HIPÓTESIS

El uso de mitomicina C como coadyuvante de la cirugía refractiva tipo Queratectomía Subepitelial Asistida mediante Láser Excimer es seguro para la biología celular corneal.

OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis son:

1. Estudiar el efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la reepitelización corneal.

2. Estudiar el efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el patrón de grosor epitelial corneal a 6 meses de la cirugía.

3. Estudiar el efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el grosor corneal total a 3 meses de la cirugía.

4. Estudiar el efecto a medio, corto y largo plazo del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre la densidad queratocitaria corneal.

5. Estudiar el efecto del uso de MMC intraoperatoria en cirugía LASEK para corregir miopía sobre el endotelio corneal a 3 meses de la cirugía.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN MUESTRAL

1.1. ÁMBITO

Los pacientes incluidos en los diferentes estudios de esta tesis doctoral corresponden a pacientes intervenidos en la clínica Vissum Madrid.

1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN GENERALES

En todos los estudios se excluyeron todos aquellos pacientes con refracción inestable, sospecha de queratocono, cirugía ocular previa de cualquier tipo, enfermedad ocular o enfermedad sistémica que pudiera interferir en el proceso de cicatrización como la diabetes o trastornos del tejido conectivo.

Todos los pacientes incluidos fueron informados de la naturaleza del estudio y participaron voluntariamente en ellos tras firmar un consentimiento informado.

El estudio obtuvo la aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica de referencia (Hospital Universitario de la Princesa. Madrid, España).

1.3. CONTROLES SANOS

El grupo control lo han formado pacientes jóvenes sanos, hombres y mujeres no intervenidos de ninguna cirugía ocular, que acudieron a realizarse revisiones oftalmológicas en la clínica Vissum Madrid y no fueron diagnosticados de ninguna patología.

2. EXAMEN PREOPERATORIO

Todos los pacientes fueron sometidos a un examen oftalmológico completo antes de ser admitidos para cirugía. La exploración incluía el registro de la agudeza visual sin corrección (AVsc) y la agudeza visual con corrección (AVcc) (utilizando los optotipos de Snellen, Nidek autochart projector CP 670, Nidek, Gamagori, Japón) tanto con la refracción manifiesta como con la cicloplejica. Se realizó una exploración biomicroscópica en lámpara de hendidura, toma de la presión intraocular (CT-80, Topcon, Tokio, Japón), medición del grosor corneal central (GCC) con paquimetría ultrasónica (DGH 5100 contact pachymeter, DGH Technology Inc, Exton, PA; OcuScan RXP, Alcon Laboratories, Inc. Fort Worth, TX), queratometría y topografía corneal (Dicon CT200, Vismed Inc., San Diego, Calif; CSO Costruzione Strumenti Oftalmici, Italia), medición del diámetro pupilar en condiciones mesópicas (pupilómetro Colvard, Oasis, Glendora, Calif) y valoración fundoscópica.

3. TÉCNICA QUIRÚRGICA

Todas las cirugías fueron realizadas por el mismo cirujano (MAT).

La cirugía se realiza con anestesia tópica (lidocaína 2%). Se desinfecta el ojo y la piel con povidona yodada y se colocan un paño quirúrgico estéril y un blefarostato rígido. Se coloca un marcador semi-cortante de 7mm (ASICO, Westmont, IL) en la córnea centrado en la pupila. Se instila una solución de etanol al 20% diluido en BSS dentro del marcador y se deja actuar durante 40 seg. **(Figura 17)**. Se retira utilizando una hemosteta que absorba la mayor parte del alcohol y se lava posteriormente con abundante BSS tras quitar el marcador.

Con una hemosteta seca se delimitan los bordes creados por el marcador **(Figura 18)** y con una cuchilla tipo crescent (Alcon Surgical, Orlando, FL) se levanta el flap epitelial, dejándolo unido a las 12horas **(Figura 19)**. El lecho estromal se seca con una hemosteta y se centra el marcador de rastreo ocular en la pupila. La ablación se realiza con el láser excimer Technolas 217C (Bausch & Lomb Surgical, Claremont, CA) utilizando el

nomograma para PRK. En aquéllos pacientes en los que se utiliza MMC, se realiza un ajuste para evitar la hipercorrección, restando un 10% al defecto esférico programado. La zona óptica fue de 6 mm en todos los casos, con una zona de transición automáticamente determinada por el láser. Una vez finalizada la ablación, en aquellos estudios en los que se utiliza MMC (indicado en cada subapartado), se aplica ésta diluida al 0,02% sobre el lecho estromal (durante el tiempo indicado asimismo en cada subapartado), siendo muy cuidadoso de que no gotee al flap epitelial ni al limbo **(Figura 20)**.

La dilución de MMC se preparó de la siguiente manera: se añaden 10 ml de BSS a 5 mg (miligramos) de MMC, para obtener una dilución de MMC al 0,5 mg/ml. De esta solución, se cogen 0,8 ml y se les añade 1,2 ml de BSS, para obtener así 2 ml que contienen 0,4 mg de MMC, es decir, una concentración de MMC de 0,2 mg/ml (0,02%).

Tras esto (o una vez finalizada la ablación si no se aplica MMC) el lecho estromal se lava con BSS **(Figura 21)** y con la misma cánula de irrigación se recoloca el flap epitelial de forma que cubra el área ablacionada **(Figura 22)** . Finalmente, se coloca con cuidado una lente de contacto terapéutica (Acuvue, Johnson & Johnson Vision Care Inc., Jacksonville, FL) **(Figura 23)**, se aplican gotas de antibiótico (ciprofloxacino 3mg/ml) y de antiinflamatorio no esteroideo (ketorolaco trometamol 5mg/ml) y se retiran el blefarostato y el paño quirúrgico.

La medicación postoperatoria consiste en gotas de antibiótico (ciprofloxacino 3mg/ml) y de corticoide (dexametasona alcohol 1mg/ml) aplicadas cuatro veces al día hasta que se completa la reepitelización. Una vez finalizada ésta, se retira la lente de contacto terapéutica y se suspende el tratamiento antibiótico tópico. Las gotas de corticoide se continúan 3 veces al día durante 3 semanas.

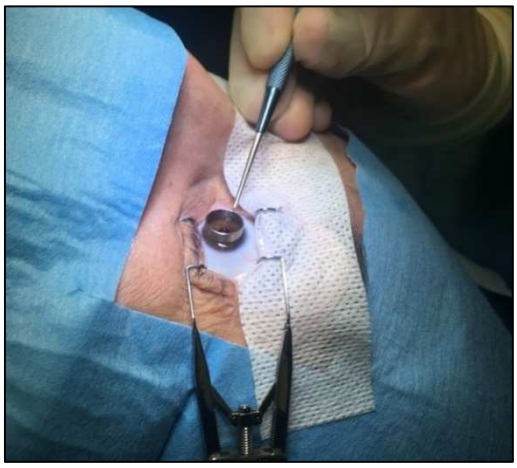

Figura 17. Colocación de paño estéril, blefarostato y marcador centrado en la pupila con dilución de etanol al 20% en contacto con el epitelio

Figura 18. Delimitación de los bordes creados por el marcador con una hemosteta seca

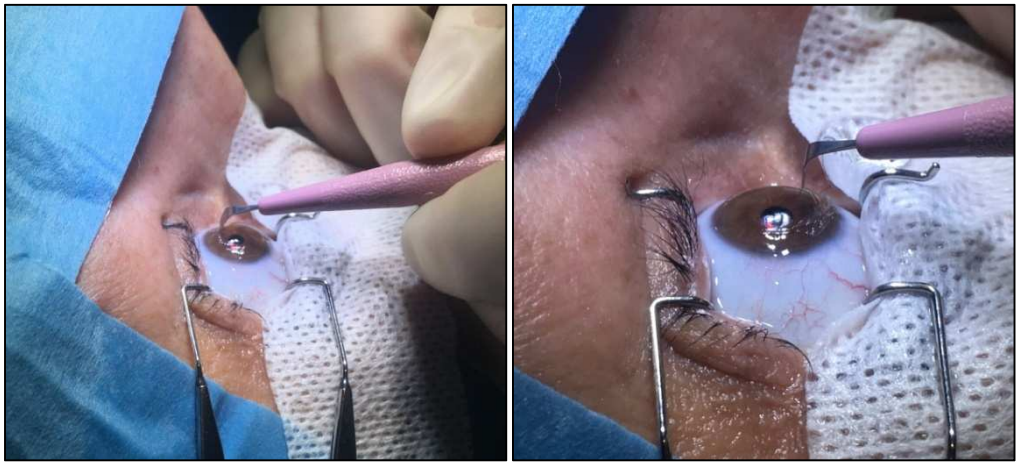

Figura 19. Una cuchilla tipo crescent permite levantar el epitelio desde el borde delimitado y crear el flap epitelial que queda replegado, unido a la córnea por una bisagra a las 12 horas

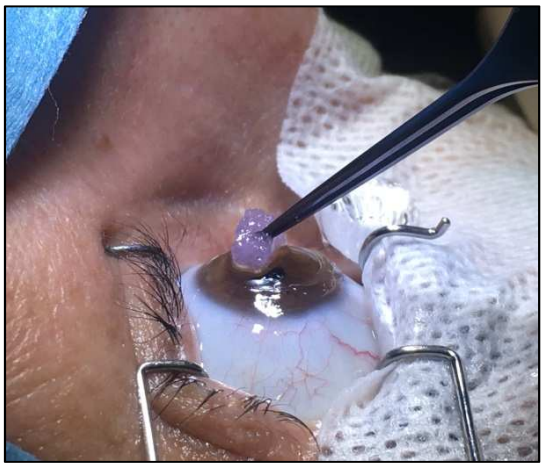

Figura 20. Tras la ablación se aplica cuidadosamente MMC al 0,02% sobre el lecho estromal

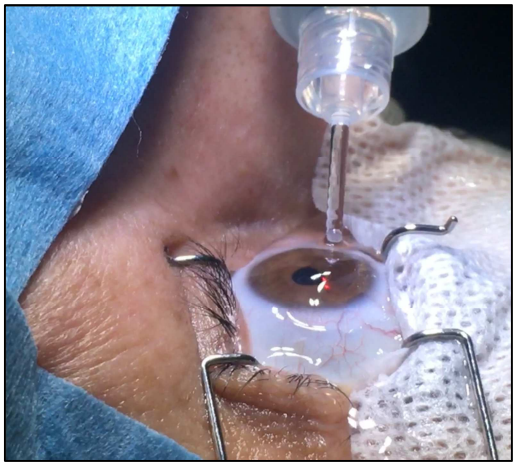

Figura 21. Después de la aplicación de MMC se lava con abundante BBS el lecho estromal

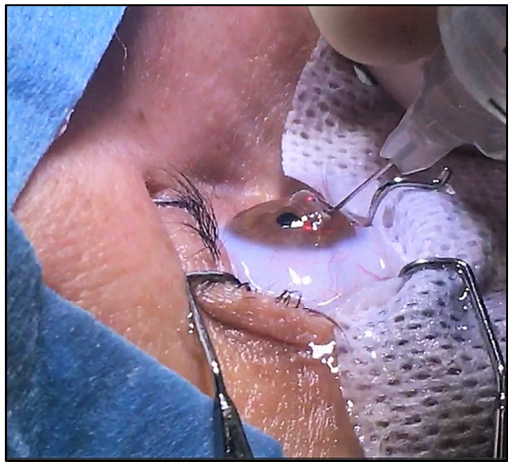

Figura 22. Con la misma cánula de irrigación se recoloca el flap epitelial para que cubra el área ablacionada

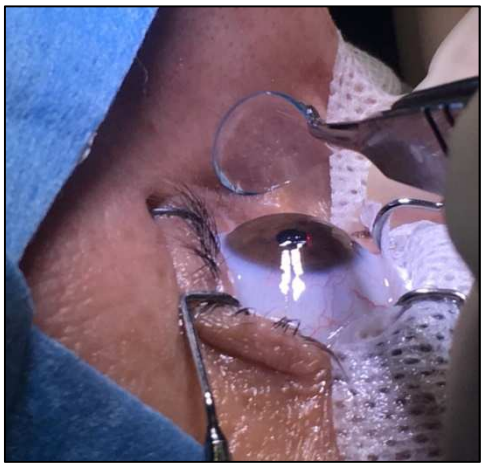

Figura 23. Finalmente se coloca una lente de contacto terapéutica

4. SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO

Las revisiones se realizan al día siguiente, a la semana, al mes y a los tres meses de la cirugía. En estas revisiones, dos optometristas, enmascarados para la refracción preoperatoria y la técnica quirúrgica, registran la AVsc. En la revisión de los tres meses, registran además la AVcc y la refracción manifiesta y cicloplejica. Las revisiones específicas de cada estudio se indicarán en sus subapartados correspondientes. Todos los pacientes son graduados en la misma habitación con la luz ajustada a condiciones mesópicas.

5. DATOS GENERALES DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa “Statview SE + Graphics”TM (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA).

La analítica descriptiva incluyó el cálculo de la media, error estándar, desviación estándar y rango. Los parámetros cuantitativos se expresan por el valor de la media ± la desviación estándar, ocasionalmente seguido del rango entre paréntesis.

Para la comparación entre grupos se emplearon diferentes tests estadísticos dependiendo del tipo de variable y del número de casos. Se especifican en cada subapartado.

La AV en notación decimal fue convertida a logMAR para el análisis estadístico utilizando una tabla de conversión.

La significación estadística se estableció en un valor de $P \leq 0,05$.

6. DISEÑO DE LOS ESTUDIOS

6.1. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE LA REEPITELIZACIÓN CORNEAL

Realizamos un estudio prospectivo de pacientes consecutivos que iban a ser operados con la técnica LASEK para corregir su error refractivo miópico. Se separaron dos grupos de pacientes consecutivos empatados por edad. En el grupo 1 se incluyeron aquellos ojos en los que la profundidad de ablación excedía las 50 µm, que recibieron MMC 0,02% durante 30 seg. sobre el área ablacionada. En el grupo 2 se incluyeron aquellos ojos en los que la profundidad de ablación era 50 µm o menor, que no fueron tratados con MMC. Ningún estudio ha demostrado aún la profundidad de ablación por debajo de la cual no existe riesgo de desarrollo de haze, por ello se estableció empíricamente el límite a partir del cual aplicar la MMC profiláctica en 50 µm de profundidad de ablación. Cuando ambos ojos de un paciente cumplían los requisitos de inclusión, sólo el ojo derecho era incluido para el análisis.

Las revisiones se realizaron al día siguiente de la cirugía, a los 5 días y al mes y 3 meses. La decisión de examinar a los pacientes a los 5 días de la cirugía (en lugar de a los 3 o 4 días) se basó en la experiencia de que la epitelización habitualmente no es completa al tercer día de la cirugía [241,254,265,426] y de que la retirada de la lente de contacto puede conllevar un incremento en el área desepitelizada en aquéllos ojos que no hayan completado aún la epitelización [426]. A los cinco días de la cirugía, la mayoría

de los ojos han completado la reepitelización y, por tanto, si hubiera un retraso significativo en la misma ocasionado por la MMC, se detectaría con mayor probabilidad a partir de ese día. En nuestro protocolo, la revisión a los 5 días de la cirugía permitía a un observador enmascarado evaluar la reepitelización a través de la lente de contacto y sin fluoresceína. El flap epitelial que se recoloca tras la cirugía tiene un aspecto grisáceo y edematoso, sin embargo el nuevo epitelio sano bien adherido tiene una superficie regular y es transparente. A los 5 días, si toda la superficie corneal presentaba este epitelio sano, se retiraba la lente de contacto; si no, se mantenía la lente y el epitelio era examinado de nuevo al día siguiente, actuando de la misma manera hasta que se completaba la reepitelización. Registramos el número de días tras el quinto día postoperatorio necesarios hasta completar la reepitelización y los comparamos entre ambos grupos.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el test t de Student de dos colas para datos no pareados.

6.2. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL PATRÓN DE GROSOR EPITELIAL CORNEAL

Realizamos un estudio prospectivo, intervencionista, no aleatorizado, con observador enmascarado de pacientes que iban a ser intervenidos de LASEK con MMC al 0,02% intraoperatoria durante 30 seg. para corregir su miopía. Un grupo de pacientes normales, con córneas sanas no operadas sirvió de grupo control. Ambos grupos estaban empatados por edad.

Se midió grosor epitelial con el dispositivo Visante®, que es un TD-OCT de uso exclusivo en el segmento anterior, fabricado por Carl Zeiss Meditec **(Figura 24)**. Utilizamos el protocolo *"High Resolution Cornea"* para la toma de la tomografía. Las medidas del epitelio corneal se realizaron manualmente por el mismo examinador enmascarado y experimentado, haciendo uso del *"flap tool"*, que también proporciona de manera automática el valor paquimétrico. Se tomaron medidas en el centro corneal, a

1,50 mm y a 3 mm del centro corneal hacia nasal y temporal en el meridiano horizontal, tanto en el grupo LASEK como en los controles **(Figura 25)**. En el grupo LASEK se practicaron estas mediciones a la semana, 1º, 3º y 6º mes postoperatorios.

Figura 24. OCT-SA Visante®

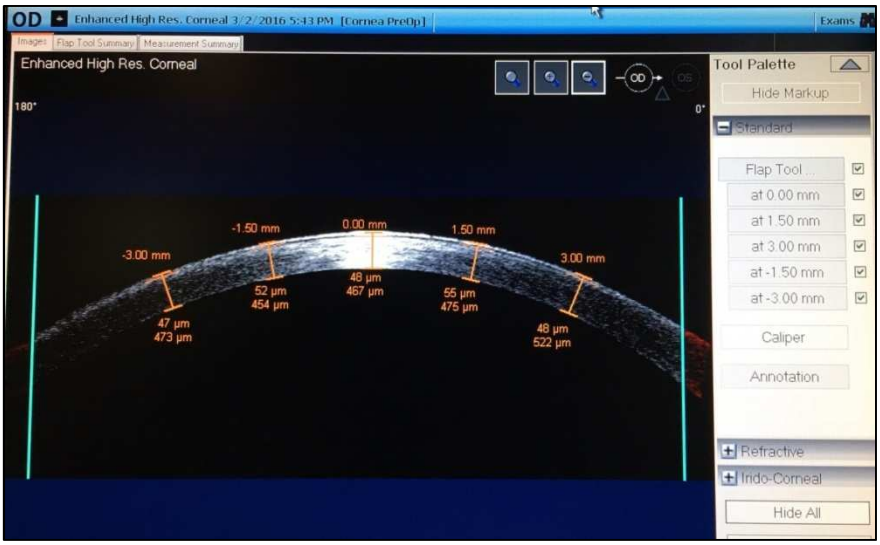

Figura 25. Imagen de la medida del epitelio con OCT-SA Visante®

Tanto en el grupo control como en todas las visitas tras la cirugía, un observador enmascarado midió el GCC de cada ojo con un paquímetro ultrasónico de contacto (OcuScan RXP, Alcon Laboratories, Inc. Fort Worth, TX). Se tomaron tres medidas de cada ojo y se promediaron.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el test t de Student de dos colas para datos pareados para la comparación intragrupo y para datos no pareados para la

comparación entre grupos. Utilizamos además el análisis por regresión lineal para estudiar si existía relación entre el recrecimiento epitelial y el corneal total (valores obtenidos a los 6 meses menos los valores obtenidos al mes) con el defecto refractivo preoperatorio, la edad, el género y la paquimetría preoperatoria.

6.3. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL GROSOR CORNEAL TOTAL

Realizamos un estudio de cohortes prospectivo, intervencionista, no aleatorizado, con observador enmascarado, de pacientes consecutivos que iban a recibir LASEK para corregir su miopía. Los pacientes consecutivos fueron separados en dos grupos empatados por edad. En el grupo 1 se incluyeron aquellos ojos en los que la profundidad de ablación era 50 µm o menor, que no fueron tratados con MMC. En el grupo 2 se incluyeron aquéllos en los que la profundidad de ablación excedía las 50 µm, que recibieron MMC 0,02% durante 30 seg sobre el área ablacionada. Ningún estudio ha demostrado aún la profundidad de ablación por debajo de la cual no existe riesgo de desarrollo de haze, por ello se estableció empíricamente el límite a partir del cual aplicar la MMC profiláctica en 50 µm de profundidad de ablación.

En las revisiones del primer mes y tercer mes tras la cirugía, un observador enmascarado registró el GCC de cada ojo con un paquímetro ultrasónico de contacto (OcuScan RXP, Alcon Laboratories, Inc. Fort Worth, TX) **(Figura 26)**, tomando tres medidas y promediándolas. Comparamos entonces las medidas entre las distintas revisiones postoperatorias.

Las comparaciones estadísticas se realizaron con el test t de Student de dos colas para datos pareados para la comparación intragrupo y para datos no pareados para la comparación entre grupos. Utilizamos además el análisis por regresión lineal para estudiar si existía relación entre el aumento de GCC en el postoperatorio y el defecto refractivo preoperatorio.

Figura 26. Paquímetro ultrasónico de contacto (OcuScan RXP, Alcon Laboratories)

6.4. EFECTO A MEDIO, CORTO Y LARGO PLAZO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE LA DENSIDAD QUERATOCITARIA CORNEAL

Realizamos un estudio prospectivo, intervencionista, no aleatorizado de pacientes consecutivos que iban a ser intervenidos de LASEK para corregir su defecto refractivo miópico (con o sin astigmatismo) y que iban a recibir MMC al 0,02% durante 30 seg de manera profiláctica por tener una ablación mayor de 50 µm. Cuando ambos ojos del paciente cumplían criterios de inclusión, sólo uno (el derecho) se incluía en el análisis. Se realizaron exámenes con microscopía confocal el tercer mes, a los 15 meses y 3 años. Un grupo de pacientes normales con córneas sanas no operadas fueron también analizados y sirvieron de controles.

6.4.1. MICROSCOPIO CONFOCAL "*IN VIVO*"

La microscopía confocal "*in vivo*" fue realizada usando el Heidelberg Retina Tomograph II (HRTII) con el módulo de córnea *Rostock* (MCR). Este microscopio tiene un objetivo de inmersión de 60X con una apertura numérica de 0,9 (Olympus Tokio, Japan) y una longitud de onda roja de 670 nm. Las dimensiones de las imágenes

obtenidas con esta lente son de 400x400 µm. El fabricante indica que la resolución y el espesor de la sección óptica son de 1 µm y 4 µm respectivamente. EL MCR usa un sistema digital de captura de imágenes y puede escanear automáticamente 80 µm de la córnea a cualquier profundidad, capturando 30 imágenes por seg, pero para obtener un escaneado de toda la córnea tenemos que mover de forma manual el enfoque del microscopio a través de todo el espesor corneal con el MCR.

6.4.2. MONTAJE DEL MICROSCOPIO

En primer lugar debemos poner en el objetivo del láser la refracción en +12 dioptrías. Después debemos acoplar el MCR en el objetivo del HRT II **(Figura 27)**.

Figura 27. Imagen del microscopio confocal *Heidelber Retina Tomograph II* junto con el módulo de córnea *Rostock*

Una vez acoplado al HRT II el MCR, debemos aplicar una gota de gel Viscotears (Carbómero 980, 0,2%, Novartis, North Ryde, Australia) en la superficie de la lente del microscopio evitando las burbujas al colocar el capuchón de la lente (“*lens cap*”) **(Figura 28)**. Tenemos que tener en cuenta que uso de ultrasonidos y geles de viscosidad baja pueden dañar la lente del microscopio, por lo que es necesario usar este tipo de gel. Debemos ser muy cuidadosos debido al riesgo de infección de no tocar el frontal del capuchón mientras lo montamos, si lo hacemos debemos desecharlo y usar uno nuevo.

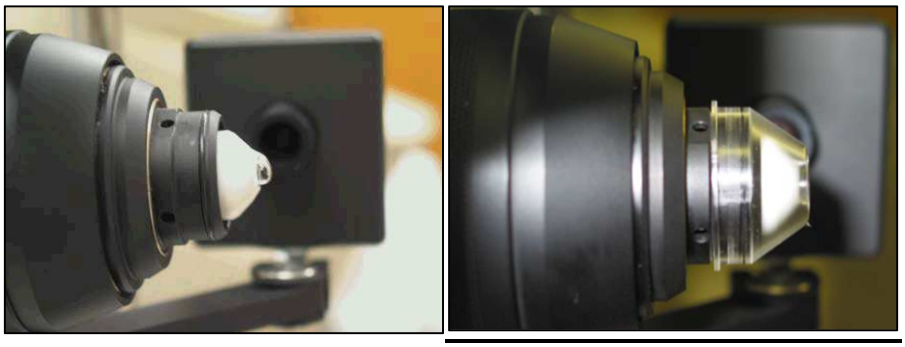

Figura 28. Gel *"Viscotears"* aplicado en la superficie de la lente del módulo de córnea *Rostock* (izquierda). Lente del módulo de córnea *Rostock* con el gel aplicado y el capuchón (derecha)

Una vez esté el MCR acoplado procedemos a ajustar el enfoque para hacer coincidir el plano focal con la superficie externa del capuchón de la lente. Esto lo hacemos girando el objetivo del MCR hasta que un reflejo de láser brillante se vea en la ventana de la izquierda del programa. En este momento ponemos el enfoque a 0 (pulsando la tecla "*RESET"* de la pantalla).

6.4.3. PROCEDIMIENTO DE TOMA DE IMÁGENES EN LOS PACIENTES

Para realizar el examen con el microscopio confocal instilamos una gota de anestésico en cada ojo del paciente con clorhidrato de tetracaína al 1% (Alcon Cusí Lab., Spain). Como agente de acople entre el capuchón de la lente y la córnea, usamos el gel Viscotears (Carbómero 980, 0,2%, Novartis, North Ryde, Australia). El microscopio se va acercando al ojo del paciente mientras éste mira a un punto fijo, hasta que el capuchón de la lente entra en contacto con la córnea, siempre sin ejercer presión sobre ella. En el momento en el que aparezca la primera imagen del epitelio (células superficiales) movemos el objetivo del MCR manualmente hasta obtener la imagen de toda la córnea.

Registramos 3 imágenes de la córnea completa de cada ojo. De estas 3 imágenes, se selecciona la imagen de la córnea completa que menos artefactos presente debido al movimiento del paciente para realizar el análisis de la densidad de queratocitos estromales. Todas las imágenes fueron tomadas por el mismo examinador entrenado.

Cuando ambos ojos del mismo paciente cumplían los criterios de inclusión**,** sólo el ojo derecho se incluyó en el análisis.

6.4.4. MEDIDA DE LA DENSIDAD DE QUERATOCITOS

En cada imagen digital de 400 x 400 µm de la córnea, sólo un observador, siempre el mismo, seleccionó los núcleos celulares correspondientes a los núcleos de los queratocitos. Los núcleos que tocan el borde inferior y el borde izquierdo de la imagen digital se cuentan, mientras que los núcleos que tocan el borde superior y el borde derecho, no se cuentan. El programa del microscopio confocal, expresa entonces la densidad de queratocitos en células por mm^2 (cels/mm^2) **(Figura 29)**.

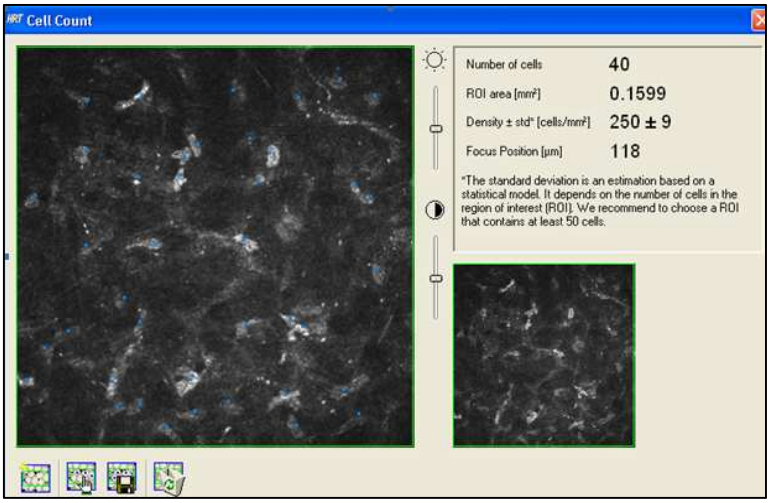

Figura 29. Método de selección manual de células para obtener la densidad de queratocitos a una profundidad determinada

Para obtener la densidad de los queratocitos en volumen usamos la siguiente fórmula:

$$\mathbf{D = N / A\partial}$$

Donde N es el número de células identificadas en el área A, y ∂ es el espesor de la sección óptica. La sección óptica o profundidad de campo ∂, la calculamos, según el método descrito por McLaren y colaboradores [427], como la distancia a la que se mueve el enfoque (escáner) desde la aparición gradual de una célula a la desaparición gradual

de esa célula. El número de imágenes en las cuales una célula se cuenta se multiplica por la distancia media entre imágenes. Con este fin se usa el escaneado automático que posee el HRT II con el MCR y se obtienen 3 escaneados con un espesor de 77 µm, una media de captura de imágenes de 39 imágenes por escaneado y una distancia media entre imágenes de 1,93 µm. En cada uno de esos 3 escaneados automáticos se chequean 15 queratocitos (45 queratocitos en total). En nuestro microscopio confocal, con este método obtuvimos una profundidad de campo de **15,63 ± 1,82 µm**, que fue la utilizada para nuestros análisis.

6.4.5. PROFUNDIDADES A LAS QUE MEDIMOS LA DENSIDAD DE QUERATOCITOS

A cada profundidad determinada del estudio se analizaron 3 imágenes: la que más se correspondía a la profundidad a estudio y 2 imágenes más: una justo anterior y otra justo posterior, con una diferencia entre ellas menor de 20 µm. Se contabilizaron las células de las tres imágenes y se obtuvo la media.

Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal "*in vivo*" se analizan a las siguientes profundidades:

- Estroma anterior/lecho estromal en los ojos operados: primera imagen de queratocitos bajo el epitelio.
- Estroma medio: 200 µm por encima del endotelio.
- Estroma profundo: 50 µm por encima del endotelio.

En el trabajo de hasta 3 años; entre los 36 y 42 meses decidimos medir los cambios más profundos en el estroma anterior, para tener más información respecto a la población queratocitaria del estroma anterior tras la cirugía, no sólo limitarnos al lecho estromal. Por tanto, medidos la densidad queratocitaria a 25 µm y 75 µm bajo el epitelio y lo comparamos con las mismas profundidades en controles. Con esas medidas, estroma anterior (considerando la media de las densidades entre 25 µm y 75 µm), estroma medio y estroma profundo, la media de la densidad total de queratocitos fue calculada y comparada con controles.

La normalidad de la distribución de los datos fue comprobada con el test de Bonferroni. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas con el test ANOVA y el test de la t de Student cuando fuera apropiado, utilizando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Una $P \leq 0{,}05$ se considera estadísticamente significativa. Los datos se expresan en media ± desviación estándar.

6.5. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL ENDOTELIO CORNEAL

Realizamos un estudio prospectivo, intervencionista, no aleatorizado, con observador enmascarado, de pacientes consecutivos que iban a recibir LASEK para corregir su miopía. Los pacientes consecutivos fueron separados en dos grupos. En el grupo 1 se incluyeron aquellos ojos en los que la profundidad de ablación era 50 µm o menor, que no fueron tratados con MMC. En el grupo 2 se incluyeron aquéllos en los que la profundidad de ablación excedía las 50 µm, que recibieron MMC 0,02% durante 30 seg sobre el área ablacionada. Ningún estudio ha demostrado aún la profundidad de ablación por debajo de la cual no existe riesgo de desarrollo de haze, por ello se estableció empíricamente el límite a partir del cual aplicar la MMC profiláctica en 50 µm de profundidad de ablación.

Para realizar el recuento endotelial se tomaron fotografías con el microscopio especular (Topcon SP-2000P, Topcon Corp.) **(Figura 30)**, que proporciona una foto de la capa endotelial y un cálculo automático de la densidad endotelial.

Antes de la intervención se tomaron tres fotos de la córnea central de cada ojo. En la revisión 3 meses tras la cirugía, se tomaron de nuevo tres fotos de la córnea central de cada ojo con el mismo microscopio especular. A partir de dichas imágenes y de las obtenidas preoperatoriamente, un observador enmascarado para el defecto refractivo preoperatorio y el uso de MMC, contó la densidad endotelial manualmente partiendo de contar las células incluidas en un recuadro determinado en la imagen, que correspondía

a 0,03 mm^2 de la córnea real. Es decir, en una córnea de 2.500 células/mm^2, se contaron 75 células. Las mediciones obtenidas de las tres imágenes fueron promediadas.

Figura 30. Microscopio especular (Topcon SP-2000P, Topcon Corp.)

Tanto en el grupo 1 como en el 2, antes y a los tres meses de la intervención, un observador enmascarado midió el GCC de cada ojo con un paquímetro ultrasónico de contacto (OcuScan RXP, Alcon Laboratories, Inc. Fort Worth, TX). Se tomaron tres medidas de cada ojo y se promediaron.

Las comparaciones estadísticas intragrupo entre la densidad endotelial antes de la cirugía y 3 meses después se realizaron con el test t de Student para datos pareados. Las comparaciones entre los grupos 1 y 2 antes y a los 3 meses de la cirugía se realizaron con el test t de Student para datos no pareados. El diseño del estudio permitía un poder estadístico del 90% para detectar un cambio en la densidad endotelial del 10% o mayor, con el nivel de significación estadística establecido en 0,05.

RESULTADOS

1. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE LA REEPITELIZACIÓN CORNEAL

Se incluyeron 120 ojos en el estudio, 60 en el grupo 1, tratado con MMC y 60 en el grupo 2, no tratado con MMC. La edad media era 31±6 años en el grupo 1 y 31,8±7 años en el grupo 2 (ambos grupos estaban emparejados por edad) (*P*=0,9). La refracción esférica preoperatoria era -5,60±2,00 D (rango: 0 a -12 D) en el grupo que recibió MMC y -1,90±1,00 D (rango: 0 a -4,70 D) en el grupo sin MMC (*P*=0,0001). El cilindro preoperatorio era -1,50±1,00 D (rango: 0 to -6 D) en el grupo 1 y -0,80±0,80 D (rango: 0 a -3,50 D) en el grupo 2 (*P*=0,0001). La AVcc preoperatoria era 0,98±0,1 en el grupo 1 y 1,0±0,1 en el grupo 2, una diferencia que era estadísticamente significativa (*P*=0,001).

La AVcc a los 3 meses tras la cirugía mostraba una diferencia estadísticamente significativa (*P*=0,001) entre ambos grupos: 0,9±0,1 en el grupo 1 y 1,0±0,1 en el grupo 2, diferencia similar a la que existía ya preoperatoriamente. La AVsc no mostraba diferencias significativas al día siguiente, a los 5 días y al mes tras la cirugía. La diferencia en AVsc entre ambos grupos era estadísticamente significativa a los 3 meses de la cirugía: 0,83±0,2 en el grupo 1; 0,98±0,2 en el grupo 2 (*P*=0,001). La refracción esférica residual 3 meses tras la cirugía era 0,3±0,8 en el grupo 1 y 0,2±0,6 en el grupo 2 (*P*=0,4).

El número de días posteriores al quinto día tras la cirugía que fueron necesarios para completar la reepitelización fue de 0,6±1,2 días en el grupo 1, tratado con MMC, y 0,4±1,0 días en el grupo 2, no tratado con MMC (*P*=0,09). No se detectó ningún defecto epitelial que se prolongara más de 10 días tras la cirugía en ninguno de los dos grupos.

Durante el primer mes postoperatorio, no observamos ninguna alteración trófica epitelial relevante a parte de una leve queratopatía punctata en algunos casos. No hubo complicaciones intra ni postoperatorias. No se detectó haze mayor de grado 1 (leve, que no altera la visión ni la refracción [337]) en ninguna visita postoperatoria en ninguno de los dos grupos.

2. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL PATRÓN DE GROSOR EPITELIAL CORNEAL

Se incluyeron 77 ojos en el estudio, 40 en el grupo control y 37 en el tratado con LASEK y MMC. La edad media era 30,2±7,62 años en el grupo control y 33,3±9,56 años en el grupo LASEK (ambos grupos estaban emparejados por edad) (P>0,05). La refracción esférica preoperatoria era –1,20±1,44 D (rango: 0 a -5,75 D) en el grupo control y -3,09±1,64 D (rango: 0 a -7,75 D) en el grupo LASEK (P=0,0001). El cilindro preoperatorio era -0,75±0,50 D (rango: 0 to -1,50 D) en el grupo control y -1,16±0,66 D (rango: 0 a -2,75 D) en el grupo LASEK (P=0,18).

La **Tabla 1** muestra las mediciones paquimétricas realizadas con el paquímetro ultrasónico (US) así como las obtenidas con el Visante® OCT en el grupo LASEK con MMC en todas las revisiones postoperatorias. La comparación entre la paquimetría ultrasónica y la del OCT, muestra una diferencia estadísticamente significativa, siendo mayor el grosor corneal medido con Visante® (P=0,001) en todas las revisiones. En cuanto a la evolución de la paquimetría en el postoperatorio, encontramos un adelgazamiento significativo al mes con ambos aparatos (P=0,02 para el ultrasonido y P=0,006 para el Visante®). Existe posteriormente un engrosamiento estadísticamente significativo aunque clínicamente no relevante (de unas 10 µm) en las medidas con el ultrasonido a los 3 y 6 meses (P=0,01 y P=0,001 respectivamente). Sin embargo esas diferencias no se encuentran en las medidas tomadas con Visante® (P=0,7).

En cuanto a la medida del grosor epitelial con OCT Visante®, los datos se muestran en la **Tabla 2.** En los ojos operados, el epitelio central y periférico, se va engrosando progresivamente siendo significativamente más grueso al tercer y sexto mes que a la semana (P<0,05 para todas las comparaciones). Cuando comparamos el grosor epitelial central en los ojos operados con el grupo control, hallamos un epitelio significativamente más delgado a la semana (P=0,0001) y al mes (P=0,03), que se engrosaba significativamente los 3 meses (P=0,03) y 6 meses (P=0,05). El epitelio de las córneas operadas a los 3 y 6 meses mostró un mayor grosor central comparado con el grosor epitelial en nasal y temporal tanto a 1,5 como a 3 mm del centro corneal

(*P*<0,05). Sin embargo en controles, el epitelio central es sólo significativamente más grueso que el epitelio nasal y temporal a 3 mm (*P*<0,05) **(Figura 31)**.

El análisis de regresión lineal no mostró ninguna relación significativa entre la edad, el género, la paquimetría, la esfera ni el cilindro preoperatorios y la hiperplasia epitelial central (grosor epitelial central a los 6 meses – grosor epitelial al mes = 4,32 ± 6,92 µm) ni tampoco con el recrecimiento corneal total (paquimetría ultrasónica a los 6meses – paquimetría ultrasónica al mes = 8,02 ± 13,99 µm) en el grupo tratado con LASEK y MMC (*P*=0,1 para todas las comparaciones). Tampoco observamos relación significativa entre la hiperplasia epitelial y el recrecimiento corneal total (*P*=0,1).

No hubo complicaciones intra ni postoperatorias. No encontramos ningún caso de haze mayor de grado 1 en ninguna de las visitas postoperatorias.

Tabla 1. Comparaciones entre la paquimetría (GCC) en micras (µm) medida con Ultrasonido (US) y con Visante OCT en postoperatorio de los pacientes intervenidos con LASEK + MMC. Las medidas se muestran como media ± desviación estándar.

	GCC 1sem	**GCC 1m**	**GCC 3m**	**GCC 6m**	**Comparación intragrupo**
US	437,56 ± 31,7	432,18 ± 34,06	443,45 ± 31,56	445,59 ± 32,31	*P*=0,0001
OCT	462,02 ± 39,13	448,29 ± 36,05	460,89 ± 34,54	463,24 ± 37,95	*P*> 0,05
Comparación entre grupos	*P*=0,0001	*P*=0,0001	*P*=0,0001	*P*=0,0001	

Tabla 2. Medida del grosor epitelial en micras (µm) con Visante OCT® en el grupo control y el grupo LASEK + MMC a la semana, 1 mes, 3 meses y 6 meses. Las medidas se muestran como media ± desviación estándar.

	Control	1 semana LASEK + MMC	1 mes LASEK + MMC	3 meses LASEK + MMC	6 meses LASEK + MMC
Grosor epitelial central	48,62 ± 4,38	43,86 ± 5,65	46,05 ± 6,02	50,91 ± 4,99	50,37 ± 5,65
Grosor epitelial nasal a 1,5 mm	46,95± 4,3	39,86 ± 5,61	42,7 ± 4,47	47,51 ± 5,68	47,59 ± 5,04
Grosor epitelial temporal a 1,5 mm	47,85 ± 4,19	41,1 ± 5,09	43,56 ± 4,87	46,45 ± 4,59	47,72 ± 4,51
Grosor epitelial nasal a 3 mm	46,3 ± 4,87	41,67 ± 4,97	43,75 ± 5,6	45,45 ± 4,39	47,37 ± 4,11
Grosor epitelial temporal a 3 mm	45,57 ± 4,26	41,83 ± 4,03	43,45 ± 5,11	45,02 ± 4,18	46,18 ± 5,47

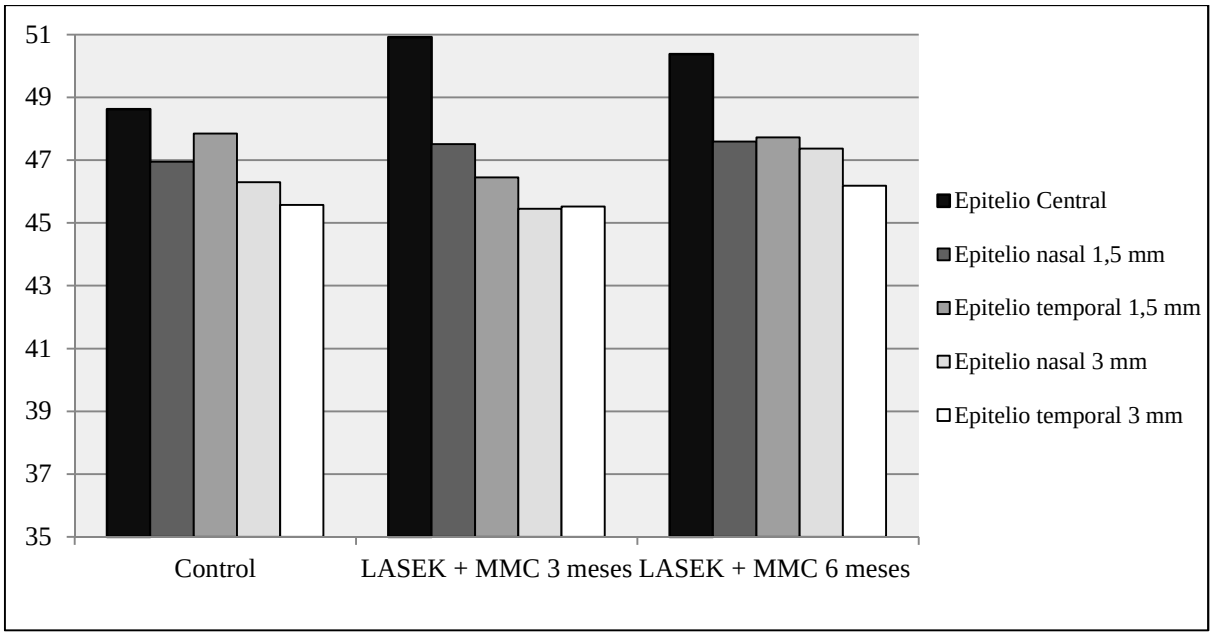

Figura 31. Comparación de la medida del grosor epitelial con OCT Visante® entre el grupo control y en el grupo tratado con LASEK + MMC a los 3 y 6 meses**.**

3. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL GROSOR CORNEAL TOTAL

Se incluyeron 64 pacientes consecutivos (64 ojos) en el estudio: 32 ojos en el grupo 1 (no tratado con MMC) y 32 ojos en el grupo 2 (tratado con MMC intraoperatoria).

La edad media era 315±4,6 años en el grupo 1 y 31,6±8,7 años en el grupo 2 (ambos grupos estaban emparejados por edad) (*P*=0,9). La refracción esférica preoperatoria era -2,30±1,00 D (rango: 0,75 a -4,20 D) en el grupo que no recibió MMC y -5,70±2,60 D (rango: 0 a -11,00 D) en el grupo con MMC (*P*=0,0001). El cilindro preoperatorio era -0,60±0,50 D (rango: 0 to -2,75 D) en el grupo 1 y -1,60±1,4 D (rango: 0 a -5,00 D) (*P*=0,0003).

La refracción esférica residual a los 3 meses de la cirugía era 0,1±0,3 D en el grupo 1 y 0,05±0,6 D en el grupo 2 (*P*=0,4). El cilindro residual era -0,2±0,6 D y -0,7±0,3 D, respectivamente (*P*=0,2).

La **Tabla 3** muestra las mediciones paquimétricas antes de la cirugía y en todas las revisiones postoperatorias. La comparación dentro de cada grupo entre el GCC al mes y a los 3 meses de la cirugía mostraba un incremento estadísticamente significativo en ambos grupos. La diferencia entre el incremento del GCC entre ambos grupos no era estadísticamente significativa (*P*=0,6).

El análisis de regresión lineal no mostró relación significativa entre el error refractivo tratado y el incremento postoperatorio en el GCC en ninguno de los dos grupos (*P*=0,1 para ambas comparaciones).

No hubo complicaciones intra ni postoperatorias. No encontramos ningún caso de haze mayor de grado 1 en ninguna de las visitas postoperatorias.

Tabla 3. Grosor corneal central (GCC) en los dos grupos tratados con LASEK para corregir miopía. Los datos se muestran como media ± desviación estándar.

	GCC preop (µm)	GCC 1m (µm)	GCC 3m (µm)	Incremento GCC	Comparación intragrupo
LASEK	507,9 ± 30,7	444,0 ± 41,3	450,3 ± 43,5	1,42%	*P*=0,04
LASEK + MMC	514,5 ± 26,9	399,7 ± 31,2	407,9 ± 32,6	2,02%	*P*=0,006
Comparación entre grupos	*P*=0,3	*P*=0,0001	*P*=0,0001	*P*=0,6	

4. EFECTO A MEDIO, CORTO Y LARGO PLAZO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE LA DENSIDAD QUERATOCITARIA CORNEAL

Se incluyeron 64 ojos en el estudio, 32 en el grupo tratado con LASEK con MMC y 32 en el grupo control. La edad media era 28,5±3,2 años en el grupo control y 30,7±4,8 años en el grupo LASEK (ambos grupos estaban emparejados por edad) (*P*=0,2). La refracción esférica preoperatoria era -2,25±2,60 D (rango: 0 a -8,50 D) en el grupo control y -4,04±2,90 D (rango: 0 a -9,50 D) en el grupo LASEK (*P*=0,04). El cilindro preoperatorio era -0,31±0,50 D (rango: 0 to -2 D) en el grupo control y -1,21±1,14 D (rango: 0 a -4,00 D) en el grupo LASEK (*P*=0,002).

A los 15 meses se realizó el análisis al 100% de los pacientes, mientras que a la revisión de los 3 años no acudieron 5 pacientes, por lo que dispusimos del 84,37% para realizar el análisis.

A los tres meses, la densidad queratocitaria en el grupo LASEK y MMC (Tabla 4), presentó una reorganización de los queratocitos en el estroma tras la cirugía, con una reducción significativa de su densidad en el estroma anterior comparado con controles,

pero compensada con un incremento también significativo de la población queratocitaria en el estroma medio y profundo. La comparación entre la media de las densidades (calculada como la media entre las densidades del estroma anterior, medio y profundo en cada grupo) mostró una mayor densidad significativa en el grupo operado frente al grupo control **(Figura 32)**.

La exploración con el microscopio confocal a los 15 meses tras LASEK exhibió una tendencia a la normalización de la distribución celular en el estroma, con un ligero incremento en el estroma lecho estromal (estroma anterior) y un descenso en el estroma medio y profundo. La densidad queratocitaria media a los 15 meses fue significativamente menor que a los tres meses, equiparándose a los valores de densidad media obtenidos en el grupo control (diferencia no estadísticamente significativa) **(Figura 32)**.

La población queratocitaria a los 3 años se mantuvo significativamente menor en el estroma anterior comparado con controles, mientras que la densidad en el estroma medio y posterior permaneció estable **(Figura 32)**.

En el estroma anterior a los 3 años, se tomaron medidas en otras dos profundidades; 25 y 75 µm, considerando la media entre las dos ofrece una mejor estimación de la densidad queratocitaria real en el estroma anterior, y no sólo la del lecho estromal en los ojos operados **(Tabla 5)**. Esta medida persistió ligeramente menor en el grupo LASEK frente al grupo control, pero cuando se utilizó para calcular la densidad queratocitaria media en toda la córnea (incluyendo estroma medio y posterior), no encontramos diferencias significativas entre los dos grupos, es decir, las córneas operadas no presentaron ningún cambio significativo en su densidad corneal total a los tres años comparadas con las córneas del grupo control **(Figura 33)**.

Tabla 4. Comparación de la densidad queratocitaria (células/mm^3) entre el grupo control y el grupo LASEK + MMC a los 3 meses, 15 meses y 3 años. Los datos se muestran como media ± desviación estándar y rango entre paréntesis.

	Control n= 32	**3 meses LASEK + MMC** n= 32	**15 meses LASEK + MMC** n= 32	**3 años LASEK + MMC** n= 27	***P***	**Comparaciones estadísticamente significativas**
Lecho estromal/ estroma anterior (células/mm^3)	29.660,71 ± 5.904,80 (20.333,33 a 42.666,66)	16.993,75 ± 8.001,78 (6.800,00 a 36.933,33)	19.408,31 ± 3.615,54 (12.000,00 a 29.733,33)	15.662,2 ± 2.839,1 (11.000,0 a 21.844,0)	*P*= 0,0001	Controles vs 3m/15m/3a
Estroma medio (células/mm^3)	18.505,95 ± 1.996,06 (14.880 a 21.533)	30.783,33 ± 9.300,00 (13.933,33 a 47.400,00)	22.055,16 ± 3.834,56 (16.533,33 a 32.733,33)	18.889,5 ± 3.474,0 (12.266,66 a 27.933,33)	*P*= 0,0001	Controles vs 3m 3m vs 15m/3a
Estroma profundo (células/mm^3)	18.439,00 ± 2.139,68 (13.666 a 22.800)	30.268,75 ± 8.321,95 (17.333,33 a 43.600,00)	21.271,52 ± 4.434,22 (14.133,33 a 35.400,00)	18.992,6 ± 3.402,4 (14.000,0 a 31.066,66)	*P*= 0,0001	Controles vs 3m 3m vs 15m/3a
Media total (células/mm^3)	22.201,58 ± 2.760,72 (16.711,11 a 28.444,44)	26.015,27 ± 7.193,52 (15.755,55 a 38.600,00)	20.911,66 ± 3.508,27 (14.533,33 a 3.2622,22)	17.848,16 ± 26.53,06 (13.822,22 a 26.474,0)	*P*= 0,0001	Controles vs 3m/3a 3m vs 15m/3a 15m vs 3a

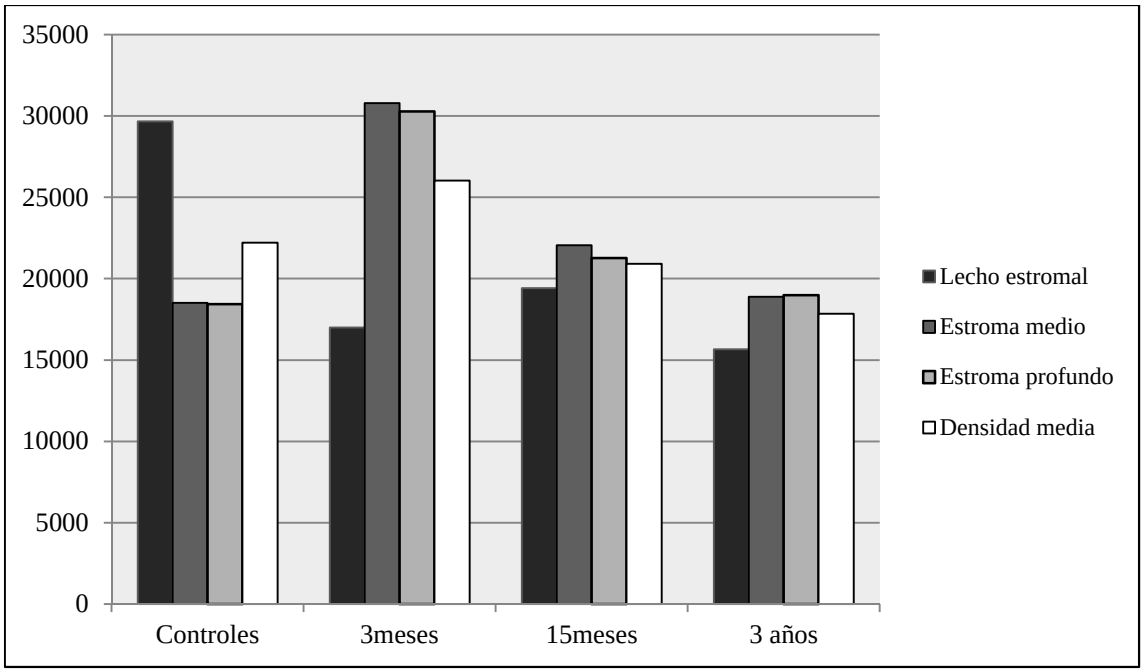

Figura 32. Densidad queratocitaria en el grupo control y en el grupo tratado con LASEK + MMC a los 3 meses, 15 meses y 3 años.

Tabla 5. Comparación de la densidad queratocitaria (células/mm^3) del estroma anterior (medido a 25 y 75 µm de profundidad) entre controles y el grupo tratado con LASEK + MMC a los 3 años. Los datos se muestran como media ± desviación estándar y rango entre paréntesis.

	Controles n =32	**3 años post LASEK + MMC n = 27**	***P***
25 µm (células/mm^3)	21.668,19 ± 3.037,24 (14.333,33 a 27.600,0)	17.699,06 ± 2.530,57 (13.910,66 a 25.177,33)	0,0001
75 µm (células/mm^3)	21.155,47 ± 2.144,53 (17.222,0 a 25.000,0)	19.179,06 ± 2.530,57 (13.910,66 a 25.177,33)	0,003
Media entre 25 y 75 µm (células/mm^3)	21.411,83 ± 1.917,69 (17.411,0 a 24.688,66)	18.439,06 ± 2.278,01 (14.799,66 a 25.666,33)	0,0001
Media corneal total (células/mm^3)	19.451,96 ± 1.533,21 (16.514,77 a 21.577,77)	18.738,03 ± 2.555,77 (14.351,77 a 28.222,11)	0,2

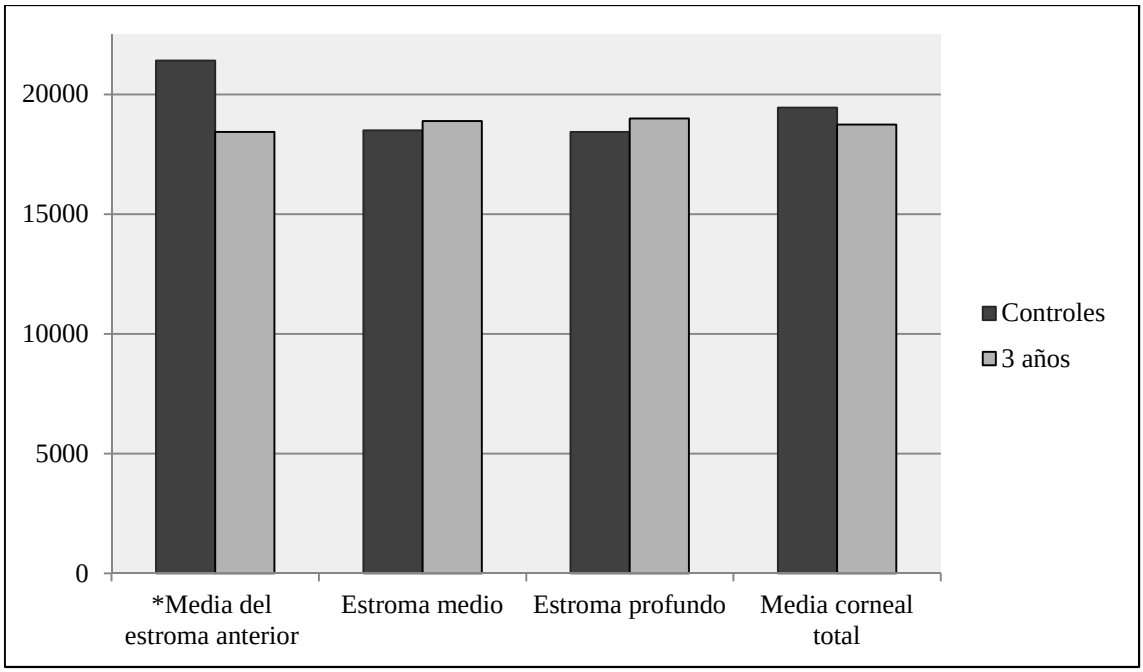

Figura 33. Comparación de la densidad queratocitaria entre el grupo control y a los 3 años tras LASEK + MMC. La medida del estroma anterior se calculó con la media a 25 y 75 µm de profundidad. *Diferencia estadísticamente significativa.

5. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL ENDOTELIO CORNEAL

Se incluyeron 40 pacientes consecutivos (80 ojos) en el estudio: 32 ojos en el grupo 1 (no tratado con MMC) y 48 ojos en el grupo 2 (tratado con MMC intraoperatoria). La edad media era 31,5±4,6 años en el grupo 1 y 33,2±7,9 años en el grupo 2 (ambos grupos estaban emparejados por edad) (P=0,3). La refracción esférica preoperatoria era -2,30±1,00 D (rango: 0,75 a -4,20 D) en el grupo que no recibió MMC y -5,50±3,00 D (rango: -2,50 a -11,00 D) en el grupo con MMC (P=0,0001). El cilindro preoperatorio era -0,60±0,50 D (rango: 0 to -2,75 D) en el grupo 1 y -1,60±1,20 D (rango: 0 a -5,00 D) (P=0,0001).

La refracción esférica residual a los 3 meses de la cirugía era 0,1±0,3 D en el grupo 1 y 0,1±0,7 D en el grupo 2 (P=0,7). El cilindro residual era 0,2±0,6 D y -0,1±0,4 D, respectivamente (P=0,8).

La **Tabla 6** muestra las mediciones paquimétricas antes de la cirugía y a los 3 meses en ambos grupos.

Los valores queratométricos preoperatorios eran 43,8±2,0 D en el grupo 1 y 44,3±2,2 D en el grupo 2 (*P*=0,3). Los valores postoperatorios eran 41,1±2,2 y 39,6±2,9 respectivamente (*P*=0,02).

La **Tabla 7** muestra la población endotelial antes y después de la cirugía en ambos grupos. La comparación entre la densidad endotelial preoperatoria y postoperatoria dentro de cada grupo mostraba un incremento significativo en ambos grupos. Las diferencias entre la densidad endotelial entre ambos grupos tanto antes de la cirugía como después de ella no eran estadísticamente significativas (*P*=0,9 y *P*=0,5 respectivamente).

No hubo complicaciones intra ni postoperatorias. No se detectó ningún problema de reepitelización en ningún grupo ni ningún caso de haze mayor de grado 1 en ninguna de las visitas postoperatorias.

Tabla 6. Grosor corneal central (GCC) en micras (µm) de ambos grupos. Los datos se expresan como media ± desviación estándar

	GCC preop	**GCC 3m**
LASEK	507,9 ± 30,7	434,4 ± 79,0
LASEK + MMC	514,5 ± 25,6	411,0 ± 30,5
P	0,3	0,06

Tabla 7. Densidad endotelial (células/mm^2) antes y 3 meses tras la cirugía. Los datos se expresan como media ± desviación estándar

	Densidad endotelial preop (cels/mm^2)	**Densidad endotelial 3 meses (cels/mm^2)**	**Comparación intragrupo**
LASEK	2.462,5 ± 226,8	2.562,5 ± 258,7	*P*=0,0001
LASEK + MMC	2.466,6 ± 294,1	2.525 ± 312,5	*P*=0,0008
Comparación entre grupos	*P*=0,9	*P*=0,5	

DISCUSIÓN

1. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE LA REEPITELIZACIÓN CORNEAL

En nuestro trabajo, no encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo que recibió MMC y el que no la recibió, en cuanto al número de días necesarios para una completa reepitelización. Ésto sugiere que la MMC no altera el proceso de reepitelización de un modo relevante para la práctica clínica habitual.

Encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la AVcc y la AVsc a los 3 meses de la intervención, ambas mejores en el grupo 2 (en el que no se aplicó MMC). No obstante, no consideramos que esta diferencia se deba al uso de MMC, ya que la AVcc preoperatoria era ya significativamente peor en el grupo 1 (aunque clínicamente no relevante), probablemente debido a que el error refractivo preoperatorio era mucho mayor en este grupo.

El uso de MMC se ha asociado a complicaciones de tipo isquémico en las cirugías de pterigium y glaucoma, en las que los tejidos donde se aplica está profusamente vascularizados, produciendo un daño en el endotelio vascular y secundariamente la necrosis del tejido [313,393]. En cirugía refractiva, la MMC se aplica sobre la superficie estromal ablacionada, que es un tejido avascular, ejerciendo por tanto un efecto citotóxico directo sobre las células corneales, fundamentalmente en aquellas con una actividad mitótica importante (las células epiteliales y los queratocitos), siendo teóricamente más susceptibles del posible efecto tóxico de la MMC [372]. En nuestro estudio, el epitelio corneal no parece verse afectado por la MMC al no sufrir un retraso clínicamente relevante en la reepitelización independientemente del uso o no de este fármaco antimitótico.

Existen otros estudios no específicamente diseñados para estudiar este tema, que apoyan la ausencia de toxicidad epitelial por la MMC [275,276,316,319,323,360,362,383,385,423,428]. Rajan et al. [372] estudiaron in vitro el efecto de la MMC sobre un modelo de córneas humanas y analizaron cómo afectaba a la reepitelización el uso de MMC al 0,02% durante 1 o 2 min y lo compararon con un grupo de córneas que no recibió MMC. Encontraron un

retraso en la latencia hasta que se iniciaba la reepitelización asociada a la MMC, que era dependiente del tiempo de aplicación, pero no hallaron diferencias en el tiempo de migración celular epitelial una vez iniciada la reepitelización entre el grupo que no había recibido MMC y en el que se había aplicado durante 1 min. Nuestros resultados clínicos parecen coincidir con sus observaciones in vitro. El trabajo de Blanco-Mezquita [429] en córneas de gallina, tampoco encuentra diferencias significativas en el cierre epitelial entre los grupos que recibieron MMC tras PRK y el grupo control.

En cuanto a los estudios clínicos en córneas humanas, la mayor parte encuentran resultados similares a nuestro trabajo, sin evidenciar alteraciones en la cicatrización epitelial. Argento et al. [277] realizaron una revisión retrospectiva de la reepitelización de ojos tratados con MMC intraoperatoria al 0,02% durante 75 segs. tras LASEK y los compararon con ojos que fueron sometidos a LASEK sin MMC. Al igual que en nuestro trabajo, no encontraron una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en cuanto al tiempo necesario para completar la reepitelización. Igualmente Leccisotti et al [422], no encontraron un retraso significativo en la reepitelización tras aplicar MMC al 0,02% durante 45 segs. tras PRK para alta miopía comparado con controles en los que se aplicaba BBS en vez de MMC, ni ningún efecto adverso en los 12 meses de seguimiento postoperatorio. Lee [313] publicó un trabajo con un seguimiento de 1.011 ojos tras PRK con MMC intraoperatoria y detectó un retraso en la reepitelización en tan sólo 2 ojos.

Chang [395] estudió el efecto de la MMC en un modelo animal en conejos y observó que la reepitelización era más rápida en los ojos que no eran tratados con MMC frente a los que sí la recibieron, mientras los trabajos de Lai y Talamo también en córneas de conejo no identificaron un retraso en la epitelización en los ojos que recibieron MMC [312,367]. Los estudios realizados con córneas animales tienen limitaciones y hay que tener precaución al interpretar sus resultados, dado que se diferencian de las córneas humanas. Las córneas de conejo no tienen una capa de Bowman real, son muy reactivas a cualquier intervención o fármaco, tienen un estroma más fino y un endotelio mitóticamente muy activo [372,429]. Sin embargo, las córneas aviares son un mejor modelo para el estudio de la cicatrización y la modulación farmacológica, dado que presentan una autentica capa de Bowman y sus capas corneales son proporcionales a las humanas [429].

El único estudio en el que se aportan resultados clínicos de retraso en la epitelización asociados al uso de MMC en ablación de superficie, es el de Kremer et al [430]. En él se estudió la cicatrización epitelial en un grupo de 1.520 ojos tratados con PRK y MMC al 0,02% durante 20 segs. y se comparó con 500 ojos en los que se había realizado una PRK sin MMC años anteriores. Encontraron un retraso significativo en la epitelización en el grupo con MMC, con mayor aparición de alteraciones epiteliales como erosiones corneales recurrentes, epitelio poco adherido al estroma, defectos epiteliales persistentes y placas epiteliales paracentrales que requirieron otros tratamientos. Sin embargo, este estudio utiliza en su postoperatorio diclofenaco tópico 2 veces al día hasta la completa reepitelización, fármaco con potencial toxicidad epitelial y como los mismos autores comentan, podría tener un efecto sinérgico negativo junto a la MMC sobre la reepitelización. Además de ser un estudio retrospectivo, el grupo control estaba formado por pacientes operados años antes, por lo que en la recogida de datos podría haberse perdido información sobre la incidencia de los defectos epiteliales estudiados. Los controles a su vez, fueron operados con otro laser excimer y se colocó una lente de contacto terapéutica diferente, lo cual podría dificultar la comparación entre los grupos y limitar los resultados de este estudio.

Nuestro estudio no fue diseñado para medir el tiempo exacto necesario para completar la reepitelización en cada paciente, ni para detectar un retraso en el tiempo de latencia hasta que se inicia la reepitelización en el postoperatorio inmediato, por lo que no podemos sacar conclusiones a este respecto. Para estudiar estos importantes aspectos, el mejor método sería probablemente examinar a los pacientes cada día tras la intervención y medir el área de defecto epitelial, algo que conlleva dificultad con la lente de contacto puesta. Algunos autores calculan la velocidad de reepitelización (en mm^2/día), midiendo el tamaño defecto epitelial con fotografías y utilizando un software para el análisis de las imágenes [266], que nosotros no disponíamos. Con el desarrollo de nuevas técnicas de imagen del segmento anterior, actualmente se puede estudiar el epitelio y medir el área desepitelizada con la lente de contacto [406,431]. En nuestro caso, hubiera sido necesario retirar la lente de contacto y teñir el epitelio para ser exactos, pero esto hubiera supuesto el riesgo de perder o desplazar el flap epitelial, además de que cualquier manipulación es muy molesta para el paciente los primeros días tras la cirugía. Por consiguiente, nosotros no intentamos estudiar la velocidad de reepitelización, sino averiguar si la

MMC tiene un impacto en la epitelización que pueda ser relevante para la práctica clínica habitual.

Está ampliamente documentado el efecto antimitótico de la MMC sobre los queratocitos: disminuye su activación, proliferación y transformación en miofibroblastos y por tanto previene la aparición de *"haze"* [25,87,275,276,323,383]. Esta diferente susceptibilidad a la MMC entre el epitelio y los queratocitos, podría deberse a que la aplicación de la MMC sobre el estroma ablacionado se realiza de un modo muy cuidadoso a través de una esponja de celulosa, evitando al máximo su contacto con el limbo. La ausencia de retraso en la reepitelización sugiere que las células madre limbares no sufren daño por la MMC, a pesar de que estas células por su alta actividad mitótica serían potencialmente más sensibles a los efectos de este fármaco. En mayor abundancia, la ausencia de toxicidad limbar de la MMC se ve apoyada por estudios sobre el tratamiento de neoplasias de la superficie ocular, donde a pesar de que la MMC se aplica como colirio de forma repetida sobre toda la superficie ocular incluido el limbo, no se han hallado cambios epiteliales relevantes [311]. De hecho, nosotros no encontramos una mayor incidencia de queratitis punctata durante el seguimiento postoperatorio en el grupo que recibió MMC, lo que sugiere que tras la aplicación de MMC el epitelio no sólo es capaz de cerrar la herida quirúrgica, sino también de conseguir un recambio celular normal para mantener un epitelio corneal sano. Sólo existe un caso publicado de queratitis persistente tras PRK en la que se aplicó MMC al 0,02% durante 2 min [396], pero en nuestro estudio se aplica durante 30 seg. debido a la evidencia de que la MMC consigue ejercer su acción sobre las células estromales con tiempos de exposición más cortos [315,321,383]. Otra explicación podría ser que la actividad mitótica de las células epiteliales sí se ve afectada negativamente por la MMC, al igual que los queratocitos, pero no lo suficiente como para alterar su capacidad para reepitelizar la córnea. De hecho, los queratocitos parecen sufrir un incremento transitorio en su tasa de apoptosis tras la exposición a la MMC; seguido de una proliferación para repoblar el área tratada tras varias semanas [275,371].

Nuestro estudio sugiere por tanto, que el uso de MMC no altera la reepitelización corneal postoperatoria de un modo clínicamente relevante.

2. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL PATRÓN DE GROSOR EPITELIAL CORNEAL

En nuestro trabajo, encontramos mayores valores de GCC cuando se realizan las medidas con el OCT Visante®, que con el paquímetro ultrasónico en todas las visitas postoperatorias. Hallamos con ambos aparatos un adelgazamiento corneal significativo al mes comparado con la exploración a la semana de la intervención, que quizá sea debido a la existencia de edema corneal en el postoperatorio inmediato de la ablación de superficie. Existe un engrosamiento paquimétrico postoperatorio significativo a partir de los 3 meses cuando realizamos las mediciones con US (si bien es aproximadamente de 10 µm y por tanto clínicamente no relevante), pero estas diferencias no son significativas cuando la medida se realiza con el Visante®.

Aunque muchos estudios han determinado que la OCT tiene una gran reproducibilidad y precisión como paquímetro de no contacto [50,74,432–434], por lo general la mayoría determinan que el OCT infraestima la medida en condiciones normales [47,101–103,435,436], lo cual le hace más conservador a la hora de plantear una cirugía refractiva [435]. No hemos encontrado en la literatura estudios del GCC tras ablación de superficie con OCT Visante®, pero sí estudios tras LASIK, que reportan una sobreestimación en las mediciones al igual que en nuestro trabajo [82,437]. El único trabajo que estudia las diferencias entre la paquimetría en pacientes normales y operados de PRK, encuentra valores similares entre ambos grupos, pero fue realizado con el OCT Stratus® [83]. Varios trabajos coinciden en que las medidas realizadas con diferentes aparatos no son intercambiables, y que para comparar resultados de distintos trabajos, se deben realizar con el mismo método de medida [103,435]. Que nosotros encontremos una sobrestimación del GCC postoperatorio cuando realizamos la medida con Visante® frente a US, quizá sea debido a que el OCT confunde la medida paquimétrica por la distorsión que pudiera producir la presencia de haze subclínico.

En nuestro trabajo, el grosor epitelial central medido con OCT de los pacientes tratados con LASEK y MMC se va engrosando a partir del primer mes postoperatorio haciéndose estadísticamente significativo a los 3 y 6 meses. Comparado con el grupo

control, el epitelio de los ojos intervenidos es significativamente más delgado a la semana y al mes, pero se vuelve significativamente más grueso a los 3 y 6 meses.

La mayor parte de los estudios que evalúan los cambios en el grosor epitelial de la ablación de superficie sin utilizar MMC, describen un engrosamiento epitelial central postoperatorio, tanto en córneas animales [403,404], como humanas [86,112,115,397,400,401]; debido probablemente al alargamiento de las células basales epiteliales y al aumento del número de células superficiales [21,397], en un intento de restaurar la curvatura corneal original [438–441]. Sin embargo, algunos estudios no encontraron hiperplasia epitelial significativa tras PRK [52,87,442,443]. Probablemente estas diferencias se deban a las diferentes técnicas empleadas para medir el grosor epitelial, la magnitud del defecto refractivo tratado, la instrumentación, la zona de ablación y el método de desepitelización empleado [115].

Existen pocos trabajos analicen los cambios grosor epitelial tras la aplicación intraoperatoria de MMC en cirugía de ablación de superficie, y presentan resultados dispares. Xu et al. [371] estudiaron el grosor epitelial en córneas de conejo divididas en dos grupos: unas tratadas solamente con PRK y otras añadiendo MMC al 0,02% durante 5 min. Hallaron un engrosamiento epitelial significativo en el postoperatorio de ambos grupos, siendo más acusado en las primeras semanas de seguimiento, pero manteniéndose significativamente más grueso en la revisión de los 6 meses, igual que en nuestro trabajo. No encontraron diferencias entre ambos grupos asociadas al uso de MMC.

Chen [405] estudió con microscopio confocal los cambios en el epitelio y el estroma tras Epi-LASIK, utilizando MMC al 0,02% durante 20-30 seg cuando la miopía a tratar era mayor de -6,00 D. No halló cambios en el grosor epitelial postoperatorio asociados al uso de MMC; si bien observó que existía un daño celular inicial en el flap epitelial (menor número de células basales y apicales morfológicamente normales) tanto si se usaba MMC como si no.

En el estudio histológico de corneas humanas tras PRK de Rajan y colaboradores [372], a las 4 semanas el grosor epitelial era igual en controles y en el grupo tratado con MMC a 0,2µg/ml durante 1 min, pero significativamente más fino e indiferenciado cuando la

MMC se aplicó 2 min. Con un mayor seguimiento, quizá estas diferencias hubiesen desaparecido. Además en ese grupo (2 min de exposición) encontraron una mayor tendencia a la hipercorrección, sugiriendo que la MMC podría alterar la capacidad del epitelio de producir una hiperplasia compensadora tras la ablación estromal, por lo que recomiendan el tiempo de aplicación de un minuto. Si bien el tiempo de exposición que utilizamos nosotros fue menor, hallamos al mes un epitelio significativamente más delgado que los controles, pero estos cambios tendían a normalizarse a los 6 meses.

Gambato describe con microscopía confocal, un leve engrosamiento epitelial a los 5 años tras PRK, tanto en el grupo sin MMC como en el que utilizó MMC al 0,02% durante 2 min, sin existir diferencias significativas entre ambos grupos [444]. Kaluzny et al. son los únicos autores que han estudiado los cambios en el grosor del epitelio corneal con OCT (como en nuestro trabajo) tras PRK con MMC [406]. No encontraron diferencias en el grosor epitelial entre dos técnicas de ablación de superficie: PRK con despitelización con alcohol al 20% y PRK transepitelial; aplicando en ambos grupos MMC al 0,02% durante 2 min. Describen un engrosamiento epitelial marcado en el postoperatorio (máximo al cuarto día) que disminuye progresivamente hasta casi equipararse con los valores preoperatorios a los 3 meses. Igualmente, Nassiri et al. [445] compraron el grosor epitelial entre dos técnicas de despitelización: mecánica y con etanol al 20%; utilizando en ambos grupos MMC al 0,02% durante 2 min; sin encontrar diferencias significativas. Aunque ni Kaluzny ni Nassiri cuentan con un grupo control sin MMC, de ambos estudios se podría deducir que la posible toxicidad de la MMC sobre el grosor epitelial no se ve potenciada por el uso de alcohol. Nuestros resultados, con un tiempo de exposición menor, se asemejan a los de Kaluzny [406], aunque encontramos un adelgazamiento inicial, seguido de un incremento del grosor epitelial más mantenido en el tiempo, como el estudio de Gambato et al [444].

Por tanto en función de nuestros resultados y apoyándonos en la literatura publicada al respecto, la aplicación de MMC como coadyuvante a la ablación de superficie no parece alterar la evolución postoperatoria del patrón de grosor epitelial corneal central.

No hallamos relación entre las diversas variables estudiadas (edad, género, paquimetría, esfera y cilindro preoperatorios) y la hiperplasia epitelial o el recrecimiento corneal total. Numerosos autores han publicado la relación entre la hiperplasia epitelial y la

regresión miópica post-ablación de superficie [86,112,400,403,404], siendo mayores a mayor grado de ametropía a tratar [115,398,403,404], mayor profundidad de ablación [398–400], menor zona óptica [86,112,115,398,399], cambios abruptos en el borde de la ablación [112,398] y menor grosor epitelial preoperatorio [115].

En el estudio de Möller-Pedersen sin embargo, no encontraron hiperplasia epitelial tras PRK, sino un epitelio inicialmente más fino, que restaura su grosor preoperatorio sin hiperplasia compensadora y que no contribuye significativamente a los cambios refractivos tras PRK. Según los autores la principal causa de regresión es el recrecimiento estromal [87]. Al igual que en el trabajo anterior, Erie [400] estudió los cambios en el perfil corneal tras PRK con microscopía confocal, pero encontró un engrosamiento epitelial a partir los 3 meses manteniéndose significativamente más grueso a los 36 meses. De sus resultados se desprende que la regresión miópica no sólo se relaciona con el grosor estromal como Möller-Pedersen [87], sino también con el grosor epitelial y el haze. El mismo grupo publicó sus resultados a 7 años [397], encontraron que existía un incremento en el GCC, debido al engrosamiento tanto del epitelio como del estroma; pero sin relación con la regresión. Del mismo modo Ivarsen et al. [401] estudiaron los cambios en las distintas capas corneales tras PRK. Encontraron un engrosamiento epitelial, estromal y corneal total al año, pero sólo estos dos últimos se correlacionaban con la regresión refractiva. Chen et al. halló un engrosamiento epitelial, pero sin cambios en el estroma, con SD-OCT tras PRK transepitelial, pero no pudo relacionarlo con el defecto refractivo postoperatorio [405]. Debido a que disponemos de nuevos perfiles de ablación y a la actualización de los nomogramas, la regresión es menos frecuente [446]. Nosotros no hallamos relación entre la hiperplasia epitelial y el recrecimiento corneal total, lo que podría reflejar que existe un recrecimiento estromal más acusado que enmascara en parte el cambio epitelial o que la hiperplasia epitelial hallada es menor de la esperada debido al uso de MMC.

En nuestro trabajo el patrón de grosor epitelial en los ojos intervenidos varía con respecto a los controles en cuanto a las medidas a 1,5 mm del centro corneal, siendo significativamente más delgado que el centro en el grupo LASEK. A 3 mm el epitelio es significativamente más delgado que el centro en ambos grupos. Por tanto, parece que la cirugía cambia el patrón epitelial corneal en nuestros pacientes, haciendo que la diferencia en el grosor epitelial central y periférico sea más acusada.

Como hemos comentado el grosor epitelial corneal tras PRK se considera un importante factor en el resultado refractivo final [196,337], dado que determina el contorno de la superficie corneal. Si el epitelio cubre el área ablacionada suave y uniformemente no cambiaría de forma apreciable la curvatura de la córnea y los resultados refractivos serán correctos [112], pero incrementos epiteliales postoperatorios más marcados, así como mayores diferencias entre el grosor central y paracentral se relacionan con una regresión significativa [115]. No hemos encontrado trabajos que evalúen los cambios en el grosor epitelial paracentral tras PRK, si bien nuestros resultados difieren de la literatura publicada, en la que en córneas normales el epitelio sufre un engrosamiento centrífugo siendo más fino en el centro e incrementándose gradualmente hacia la periferia [95,99,107,447]. Estas diferencias quizá se deban al método empleado para medir el epitelio corneal, que es diferente en cada estudio (SD-OCT [99], ultrasonidos de muy alta frecuencia [95]-*"Very High Frecuency Digital Ultrasound"*- y -OCT [107,447]) y a que algunos aparatos incluyen la medida de la película lagrimal y otros no.

La principal limitación de nuestro trabajo es no contar con un grupo control de pacientes operados con LASEK sin MMC. Así hubiésemos podido analizar la evolución de las variables a estudio entre 2 grupos que sólo se diferenciasen en la aplicación de MMC. Pero como conocemos la gran utilidad que tiene la MMC para reducir la aparición de haze tras ablación de superficie, son escasos los pacientes en los que actualmente no la utilizamos, así que no pudimos obtener un grupo control de estas características con un tamaño muestral suficiente. Además el teórico grupo control sin MMC no sería del todo comparable, dado que no aplicamos MMC cuando el defecto refractivo a tratar es muy pequeño, así que los grupos también diferirían en la cantidad de ablación realizada. Otra limitación de nuestro estudio es la subjetividad de la medida manual del grosor epitelial en la tomografía, que intentamos reducir realizando siempre las medidas por el mismo examinador entrenado.

Son necesarios más estudios para determinar los cambios a largo plazo en el grosor de las diferentes capas corneales tras de ablación de superficie, cuál es su relación con los resultados refractivos finales y cómo se ven afectados por el uso de MMC intraoperatoria.

3. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL GROSOR CORNEAL TOTAL

En este estudio encontramos un incremento estadísticamente significativo entre el GCC entre el mes y los 3 meses tras ablación de superficie en ambos grupos, independientemente del uso de MMC. No encontramos diferencias significativas en el porcentaje de incremento de GCC entre el grupo que recibió MMC intraoperatoria y el grupo que no fue tratado con ella, lo que sugiere que la MMC no altera el engrosamiento corneal postoperatorio, considerando éste como medida indirecta de la hiperplasia epitelial o del recrecimiento estromal descritos tras cirugía refractiva.

Como se ha comentado con anterioridad, la córnea parece reaccionar a los cambios en el estroma desarrollando una hiperplasia epitelial [439–441]. Estos cambios se han visto secundarios a enfermedades corneales con pérdida estromal [440] y tras cirugía refractiva; tanto ablación de superficie [25,111,112,398,399] como LASIK [438,448,449]; pudiendo ser causa de regresión refractiva. Incluso algunos autores han propuesto realizar ablación láser sobre la superficie de este epitelio para tratar la regresión miópica [446].

Varios trabajos han estudiado con microscopía confocal los cambios en el epitelio y el estroma tras PRK sin el uso de MMC y su posible relación con la regresión postoperatoria con resultados dispares. Erie et al. encontraron un engrosamiento epitelial postoperatorio mantenido al año, relacionado significativamente con la regresión miópica. No hallaron cambios significativos en el grosor estromal postoperatorio, pero el efecto combinado del engrosamiento estromal y epitelial (recrecimiento corneal total) se correlacionaba fuertemente con la regresión [400]. No obstante, el mismo grupo publicó más tarde un trabajo con mayor seguimiento, encontrando un engrosamiento epitelial y estromal a los 7 años, responsables del engrosamiento corneal total, pero estos cambios no se correlacionaban con la regresión [397]. Ivarsen et al. hallaron un engrosamiento tanto epitelial como estromal mantenido hasta los 3 años tras PRK, pero sólo este último se relacionaba significativamente con la regresión [401]. En el estudio de Möller-Pedersen encontraron un epitelio inicialmente más fino que recuperaba valores preoperatorios a los 3 meses y permanecía estable hasta el

año sin hiperplasia compensadora y sin contribuir significativamente a los cambios refractivos tras PRK. Sí detectaron un recrecimiento corneal, mediado fundamentalmente por un incremento del grosor estromal, siendo éste la principal causa de regresión postoperatoria [87]. Sus resultados coinciden con el trabajo de Gauthier, que tampoco halló hiperplasia epitelial al año, ni relación con los cambios en el poder óptico de la córnea [398]. Chen et al. estudiaron con OCT estos mismos cambios y hallaron un epitelio más grueso a los 6 meses tras PRK transepitelial que no se relacionaba con los cambios refractivos postoperatorios, sin cambios en el estroma [115].

Por tanto no parece existir consenso en cuanto a los cambios en el grosor del epitelio y del estroma tras ablación de superficie; y en qué medida estos afectan al grosor corneal total postoperatorio y por tanto a la regresión refractiva.

En cuanto a los efectos de la MMC sobre el grosor corneal postoperatorio, Lai et al. estudiaron en córneas de conejo el efecto de aplicar MMC tópica postoperatoria al 0,02% durante 5 días tras PRK y lo compararon con un grupo control que no recibió MMC. Encontraron a las 4 semanas un GCC más delgado, un menor recrecimiento estromal y menos haze en el grupo con MMC. Según estos autores la MMC inhibe el engrosamiento corneal y estromal causante de la regresión miópica descrita previamente y lo relacionan posiblemente con la prolongación de la apoptosis de los queratocitos que evidenciaron en su trabajo [367]. En nuestro trabajo encontramos resultados contrarios a los expuestos por Lai, quizá porque la dosis total de MMC que recibieron las córneas de ese trabajo fue muy superior a la que usamos nosotros. Chang et al. [395] también en córneas de conejo, encontraron un aumento dosis-dependiente del GCC tras PRK asociado al uso de MMC intraoperatoria, pero producido por la alteración de la función endotelial, que sabemos es más sensible a la MMC en córneas de conejo [372,429].

Rajan et al. [372] analizaron el efecto de la MMC al 0,02% sobre la morfología del epitelio corneal tras su aplicación en córneas humanas “in vitro”. Al mes, el epitelio era similar en grosor y morfología en el grupo control y el grupo tratado con MMC durante 1 min., pero era significativamente más fino y menos diferenciado en el que recibió MMC durante 2 min. Quizá un seguimiento más largo habría permitido que el epitelio se diferenciase y engrosase, y que dichas diferencias desaparecieran. No obstante, nuestro estudio utilizamos un tiempo de exposición de 30 seg., el cual basándose en sus

resultados, no debería producir ningún cambio significativo en el grosor y la morfología del epitelio regenerado ya al mes de la cirugía.

Morales et al. [418] investigaron la evolución del GCC y del recuento endotelial en 18 ojos tras PRK, aplicando en un ojo MMC al 0,02% durante 30 seg. y BSS en el ojo contralateral. A pesar de encontrar una mayor pérdida endotelial asociada a la MMC, no hallaron diferencias significativas en cuanto a la paquimetría entre ambos grupos a los 3 meses. Nuestros resultados apoyan los del estudio de Morales, si bien el tamaño muestral de nuestro trabajo fue mayor.

El hecho de que en nuestro estudio encontremos una diferencia estadísticamente significativa entre el GCC al mes y a los 3 meses de la cirugía, apoya la hipótesis de la existencia de un engrosamiento corneal postoperatorio, pudiendo deberse a una hiperplasia epitelial, a un recrecimiento estromal o a una combinación de ambos mecanismos. No encontramos diferencias en el engrosamiento corneal entre ambos grupos, lo que sugiere que la MMC a la concentración del 0,02% y aplicado durante 30 seg., no sólo no produce un retraso clínicamente significativo de la reepitelización de la úlcera quirúrgica [275,277,313,323,324,365,383], sino que además permitiría tanto la hiperplasia epitelial como el engrosamiento estromal.

Encontramos en nuestros resultados un incremento mayor de GCC en el grupo que recibió MMC que en el grupo control, aunque la diferencia no alcanza significación estadística. Este mayor aumento podría ser debido al mayor defecto refractivo tratado en el grupo que recibió MMC [87,398]. Que no hallemos diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al recrecimiento corneal puede hacernos pensar que la MMC en córneas tratadas de un mayor defecto refractivo reduce el recrecimiento corneal esperado para esa cantidad de refracción ablacionada. Sin embargo, el análisis por regresión lineal realizado entre ambos grupos, no mostró correlación significativa entre el error refractivo preoperatorio y el incremento postoperatorio de GCC. Quizá un número mayor de casos nos habría podido detectar una correlación significativa entre ambos parámetros, lo que explicaría el mayor incremento en el GCC en el grupo tratado con MMC.

Hay que considerar que conseguimos una buena predictibilidad en los resultados refractivos en el grupo al que aplicamos MMC, a pesar de programar una hipocorrección del 10% del defecto refractivo esférico preoperatorio. Si la regresión estuviera única y directamente determinada por el recrecimiento corneal postoperatorio, el uso de MMC podría estar inhibiendo parcialmente dicho engrosamiento, pero, según nuestro estudio, sin anular completamente la respuesta cicatricial corneal tras la cirugía, y por tanto, sin poner en peligro la capacidad regenerativa corneal. Nuevos estudios serían necesarios para medir si la MMC ejerce realmente una inhibición parcial (y en qué medida) del engrosamiento corneal tras ablación de superficie.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la MMC no parece tener una influencia notable sobre el engrosamiento corneal tras ablación de superficie. Son necesarios más estudios, con mayor número de pacientes, con análisis histológico, OCT y microscopio confocal "*in vivo"* de córneas humanas que ayuden a esclarecer el efecto de la MMC en el proceso de cicatrización tras ablación de superficie.

4. EFECTO A MEDIO, CORTO Y LARGO PLAZO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE LA DENSIDAD QUERATOCITARIA CORNEAL

En nuestro estudio encontramos cierta reorganización en la población celular estromal tras ablación de superficie con MMC. Hallamos un descenso inicial en la densidad queratocitaria del estroma anterior, compensado con un incremento en los queratocitos del estroma profundo, y una tendencia a la normalización de la misma con el paso del tiempo. Tres años tras la cirugía, el lecho estromal todavía muestra una depleción queratocitaria, pero la celularidad corneal total no muestra ninguna diferencia significativa comparada con el grupo control.

Los estudios que evalúan los efectos de la propia ablación de superficie sin MMC sobre la población queratocitaria del estroma anterior a largo plazo, aportan resultados poco

concluyentes. En el modelo estudiado por Rajan y colaboradores, encontraron una depleción queratocitaria en las primeras semanas tras PRK y LASEK, pero con una repoblación progresiva hasta las cuatro semanas, en que prácticamente recuperaba los valores preoperatorios, e incluso en algunos casos los superaba [149].

Existen diferentes estudios que utilizan la microscopía confocal para medir la densidad queratocitaria "*in vivo"* tras cirugía de superficie. Herrman y colaboradores, estudiaron 17 ojos tras LASEK y describieron una disminución de la densidad de los queratocitos desde el primer mes, y una repoblación posterior progresiva hasta el primer año, aunque no alcazaba los valores preoperatorios [151]. Erie y colaboradores encontraron una población queratocitaria disminuida a los 36 meses y 5 años tras PRK [154,155,400]. También Amoozadeh [450] y Einollahi [442] hallaron una reducción en la densidad queratocitaria 6 meses tras PRK.

Contrario a estos resultados, Frueh encontró un aumento en la población de queratocitos en el estroma anterior en el primer y cuarto mes tras PRK [153]. Podríamos explicar las diferencias de los trabajos de Erie y Frueh por la distinta profundidad en la que realizan las medidas. Mientras que Erie realiza el contaje en la cicatriz hiperreflectante subepitelial, Frueh lo hace en la porción posterior de la cicatriz estromal. Moller-Pedersen describe un aumento en la densidad queratocitaria en el estroma anterior en las revisiones del mes y 6 meses tras PRK, normalizándose los valores al año [87]. A los 5 años, Moilanen tampoco halló una población reducida de queratocitos sometidos a PRK [152]. Incluso el estudio histopatológico realizado por Dawson et al. en córneas humanas tras cirugía refractiva apoya los estudios citados, al encontrar una cicatriz fibrótica hipercelular con un aumento de queratocitos en el estroma anterior [25].

En lo que sí coinciden la mayoría de los estudios es en la respuesta de los queratocitos del estroma posterior, que no mostraron activación ni variación en su densidad en ninguna de las revisiones [87,151,153,443,450].

Los escasos estudios que analizan la densidad queratocitaria tras el uso intraoperatorio de mitomicina C en cirugía de ablación de superficie, muestran resultados paradójicos **(Tabla 8)**. Los estudios animales, la mayoría realizados en córneas de conejo, describen una depleción de los queratocitos del estroma anterior al mes [371], a los 3 meses [369] e

incluso a los 6 meses [321] tras PRK y MMC comparado con el grupo control. Contrario a los anteriores estudios, Xu et al [371] no encontraron diferencias significativas en las revisiones de las 12 y 26 semanas. En el estudio en corneas de gallina de Blanco-Mezquita, se halló una menor densidad queratocitaria inicial tras PRK asociada a MMC; que se igualaba al grupo control a partir del primer mes postoperatorio [429]. El modelo *in vitro* de corneas humanas de Rajan et al. [372] describe una reducción inicial de los queratocitos en el estroma anterior independientemente del uso de MMC, pero la repoblación se iniciaba más lentamente en los grupos en los que se había aplicado MMC, con un retraso más evidente a mayor tiempo de aplicación de la misma. Encontraron a las 4 semanas una densidad significativamente menor en los grupos con MMC y también significativamente menor en el grupo en que se aplicó 2 min frente al que se aplicó durante 1min. No obstante, no podemos descartar que con un tiempo de seguimiento mayor, estas diferencias hubiesen desparecido.

Existen tres estudios clínicos de la densidad queratocitaria tras ablación de superficie con MMC realizados en córneas humanas. Gambato et al. [275] estudiaron 36 ojos de pacientes sometidos a ablación de superficie con MMC intraoperatoria al 0,02% durante 2 min. Describen inicialmente una depleción de queratocitos, seguida de una progresiva repoblación, y aunque no proporcionan datos numéricos, refieren que tras 6-12 meses, la densidad y activación queratocitarias se normalizan. No refieren ningún descenso mantenido de la densidad de queratocitos en el área ablacionada. En todo momento, los queratocitos de las capas estromales más profundas permanecen quiescentes, sin cambios en su densidad. En el estudio de Midena et al. [451], encontraron un descenso en los queratocitos en el lecho estromal 5 años tras la ablación de superficie comprado con los datos preoperatorios, pero sin diferencias significativas asociadas al uso de MMC. Nassiri et al. reportan un descenso significativo en la población estromal anterior a los 3 meses tras PRK con MMC al 0,02% entre 10 y 50 seg según la profundidad de ablación, comparado con los valores preoperatorios, sin evidenciar cambios en el estroma medio y posterior [445]. Para su análisis estos dos estudios, dividen la córnea en diferentes capas: 5 capas (0-10%, 11-33%, 34-66%, 67-90% y 91-100%) en el de Midena [451] y 3 (10% anterior, 33-66% medio y 10% posterior) en el de Nassiri [445]; y comparan los datos pre y postoperatorios. Consideramos que estos métodos no comparan realmente las capas preoperatorias con las que tras la ablación se convierten en el estroma anterior, y las diferencias halladas podrían deberse a la eliminación por el láser de la zona del estroma

anterior más densamente poblada de queratocitos y no a una depleción real de los queratocitos en el lecho estromal residual causada por el láser excimer, la MMC o ambos. Por ello, nosotros realizamos el recuento de queratocitos también a 25 y 75µm, lo cual da una medida más real de lo que acontece en el estroma anterior tras la ablación. Como en nuestro trabajo, tanto el grupo de Midena [451] como el de Nassiri [445] no encuentran ninguna diferencia significativa en las capas más profundas, aunque las medidas que obtienen en el estroma medio y posterior fueron mayores que las basales (sin alcanzar significación estadística), coincidiendo también con los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, estos autores no analizaron la media de la densidad de todas las capas estudiadas, lo que podría haber sido de utilidad para esclarecer si la densidad corneal total de queratocitos se mantiene sin cambios significativos como observamos nosotros.

El incremento inicial de los queratocitos en el estroma medio y profundo a los 3 meses tras la cirugía que se normaliza a los 15 meses del postoperatorio, ya ha sido descrito tras LASIK [148,452], pero no tras ablación de superficie [87,151,155,275,451,453]. Nuestro estudio respalda la hipótesis de que existe una tendencia a mantener estable el número de queratocitos a través de toda la córnea tras la cirugía. El aumento en la población queratocitaria en las capas profundas podría reflejar la respuesta de los queratocitos profundos a apoptosis de los queratocitos del estroma anterior producida por la ablación. Se ha demostrado que los queratocitos están fuertemente interconectados formando una red a través de toda la córnea [454–456]. El hecho de que la MMC no parezca inhibir esta proliferación de los queratocitos en las capas profundas, sugiere que o la MMC no afecta a la respuesta mitótica de estos queratocitos o que hay una repoblación del estroma por células derivadas de la médula ósea que mantienen intacta su fisiología [457–462]. Un estudio reciente muestra que la gran mayoría de los miofibroblastos detectados en córneas de ratones tras ablación de superficie derivan de su médula ósea [24].

Durante los meses posteriores existe una tendencia a la normalización de la densidad queratocitaria en las diferentes capas corneales, encontrando valores normales de densidad corneal total a los 15 meses y también a los 3 años cuando realizamos la mediciones a 25 µm y 75 µm de profundidad y no sólo en el lecho estromal. Aunque el estroma anterior mantiene una densidad de queratocitos menor, que podría estar causada

por la reorganización de la matriz extracelular y el desarrollo de una cicatriz fibrótica. Sin embargo, esto parece ser compensado por los queratocitos de otras capas, dado que no encontramos una depleción en la población celular de toda la córnea a largo plazo tras ablación de superficie con MMC. Qazi et al. publicaron la aparición de haze denso 17 meses tras cirugía de ablación de superficie con MMC profiláctica, lo que sugiere que las células estromales no se ven afectadas de forma importante y permanente por la MMC y que los queratocitos mantienen su capacidad de activarse y proliferar [341].

Los diferentes diseños ópticos de los microscopios confocal disponibles pueden dar lugar a diferentes mediciones y por tanto no podemos comparar con fiabilidad los datos obtenidos en nuestro estudio, con aquellos estudios que utilizan un microscopio confocal distinto al nuestro. Incluso la profundidad de foco o sección óptica de nuestro microscopio (calculado con el método descrito por McLaren et al. [427]) difiere significativamente del proporcionado por el fabricante (4 µm) y también del publicado en la literatura para otros HRTII-RCM (7,6 µm [463]). Es importante, que cada usuario de cada RCM calcule la profundidad de foco de su dispositivo antes de trasladar los valores de área a volumen, para poder permitir comparaciones entre diferentes dispositivos de HRTII-RCM.

Existen dos limitaciones de nuestro estudio inherentes al hecho de utilizar el microscopio confocal para obtener la densidad queratocitaria: la posibilidad de movimiento antero-posterior del paciente y la subjetividad del contaje manual de los queratocitos. Intentamos reducir esta primera fuente de error, realizando 3 escáneres en cada ojo y seleccionando el de menor movimiento [125]. La subjetividad en el recuento celular fue reducida por el hecho de que todos los escáneres fueron analizados por el mismo examinador entrenado. Un estudio que comparó los resultados en las mediciones realizadas manual y automáticamente, mostró que a pesar de las diferencias en las densidades finales, las conclusiones en cuanto al cambio en la celularidad queratocitaria postoperatoria hubiesen sido las mismas independientemente del método de medida [464]. Asimismo, el alto contraste [125] que ofrecen las imágenes con el HRTII-RCM también permite reducir la variabilidad en el recuento manual [464].

Nuestro estudio sugiere que la ablación de superficie con láser excimer y MMC intraoperatoria no da lugar a una depleción queratocitaria permanente, pero conlleva una

redistribución de los queratocitos en las diferentes capas corneales, con una reducción temporal en el estroma anterior compensada con un incremento en las capas más profundas y seguida posteriormente por una normalización de la densidad celular estromal a través de toda la córnea.

Tabla 8. Estudios del efecto de la MMC sobre los queratocitos del estroma corneal

Autores	Nº de ojos con MMC	Tipo de estudio	Dosis MMC (%)	Tiempo aplicación MMC	Seguimiento	Densidad queratocitaria al final del estudio
Xu et al. [371]	20	Animal (conejos)	0,02	5 min	6 meses	No depleción
Kim et al. [369]	18	Animal (conejos)	0,02	2 min	3 meses	Depleción
Netto et al. [321]	182	Animal (conejos)	0,002 0,02	12 seg- 2 min	1 mes	Depleción tiempo y dosis dependiente
Blanco-Mezquita et al. [429]	32	Animal (gallinas)	0,02	12 seg	2 meses	No depleción
Rajan et al. [372]	16	Córneas humanas *in vitro*	0,02	1 min 2 min	1 mes	Depleción tiempo dependiente
Gambato et al. [275]	36	Córneas humanas *in vivo*	0,02	2 min	3 años	No depleción (no aportan datos)
Midena et al. [451]	56	Córneas humanas *in vivo*	0,02	2 min	3años	No depleción comparado con ojos sin MMC
Nassiri et al. [445]	88	Córneas humanas *in vivo*	0,02	10 - 50 seg	3 meses	Depleción comparado con valores preoperatorios

5. EFECTO DEL USO DE MMC INTRAOPERATORIA EN CIRUGÍA LASEK PARA CORREGIR MIOPÍA SOBRE EL ENDOTELIO CORNEAL

En este estudio encontramos un incremento estadísticamente significativo en la densidad endotelial 3 meses tras la cirugía LASEK en ambos grupos, independientemente del uso de MMC intraoperatoria. No encontramos diferencias significativas en la densidad endotelial 3 meses tras la cirugía entre el grupo al que se aplicó MMC y el grupo al que no se le aplicó. La técnica LASEK con y sin MMC mostró ser segura y eficaz para corregir la miopía, sin complicaciones epiteliales ni haze clínicamente significativo.

En la revisión de la literatura de los efectos de la MMC sobre el endotelio corneal encontramos trabajos que arrojan conclusiones poco consistentes (tabla 9). Lee et al. [313] estudiaron la celularidad endotelial postoperatoria en 1.011 ojos tratados con MMC al 0,02% durante un tiempo de exposición entre 30 seg y 2 min según la profundidad de ablación. No sólo no encontraron un descenso en la misma, sino un aumento significativo en la densidad endotelial a los 6 meses de la cirugía; aunque este estudio no cuenta con grupo control. Los autores sugieren que este incremento podría ser resultado de la interrupción en el porte de las lentes de contacto [465,466]. También podría explicarse por la magnificación corneal tras la ablación láser [467]. El descenso en los valores queratométricos tras la ablación miópica, podría producir un reducción en la magnificación de la imagen de las células endoteliales en el microscopio especular. Así las células podrían aparentar un menor tamaño que en la imagen obtenida preoperatoriamente y ser contadas erróneamente como más numerosas. Nuestros resultados también muestran un aumento en la densidad endotelial a los 3 meses de la intervención.

Gambato et al., en su estudio con microscopia confocal a largo plazo, encontraron cambios en los queratocitos del estroma anterior en pacientes intervenidos con PRK y MMC al 0,02% durante 2 min comparado con los pacientes que no recibieron MMC [275]. No encontraron cambios en los queratocitos del estroma profundo ni en el endotelio [275,444]. Numerosos trabajos [385,420–422,424,428,468] no encontraron cambios en la densidad y

la morfología endotelial asociados a la aplicación de MMC al 0,02% con tiempos de exposición entre 5 y 45 seg. Trabajos con tiempos de exposición más prolongados (entre 1 y 2 min) no observaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad endotelial postoperatoria tras la aplicación de MMC al 0.002% [423] y 0.02% [276,319,335,445]. Tampoco Rajan, en su estudio sobre córneas humanas in vitro, encontró efectos perceptibles de la MMC al 0,02% aplicada durante 1 y 2 min, en la población celular endotelial, ni en los queratocitos del estroma medio y posterior, en relación con los controles [372]. Hofmeister [387] evaluó la densidad endotelial tras la aplicación de MMC al 0,01% durante 15, 30 y 60 seg, y la comparó con un grupo control sin MMC. Encontró una menor densidad endotelial al mes de la intervención que recuperaba valores normales a los 6 y 12 meses en todos los grupos sin diferencias significativas independientemente del uso y el tiempo de exposición de MMC.

Se podría pensar que el alcohol utilizado para separar el epitelio en la ablación de superficie, podría potenciar la posible toxicidad de la MMC. Pero los trabajos que lo estudiaron, no encontraron diferencias en el epitelio, los queratocitos, ni el endotelio, entre el grupo que utilizaba alcohol y en el que se realizaba la desepitelización mecánicamente o con el propio láser excimer [369,406,429,445].

McDermott [414] y Garweg et al. [415] mostraron que la aplicación directa de MMC (en córneas humanas de donante [414] y en cultivos de células endoteliales [415]), a concentraciones de 0,01% o menores, no producían toxicidad endotelial, pero que la aplicación de MMC al 0,02% inducía rápidamente edema con marcados cambios ultraestructurales. Tanto Torres [411] como Song [366,391], hallaron concentraciones de MMC en humor acuoso mucho menores de 0,002%, cuando ésta se aplicaba al 0,02% durante 2 min, de lo cual se deduce que la dosis tópica habitual de MMC utilizada en cirugía refractiva no alcanza una concentración en el humor acuoso que sea tóxica para el endotelio. Sólo existe un caso de edema corneal permanente asociado a ablación de superficie y MMC, en el que el paciente se instiló MMC tópica al 0,02% dos veces al día 7 días tras PTK [425]. La dosis total fue muy superior a la habitualmente utilizada en cirugía refractiva, además de que no se trataba de un ojo completamente sano, dado que era un ojo que presentaba distrofia de membrana basal epitelial, huso de krukemberg y glaucoma cortisónico. De hecho Garweg et al. [415] mostraron que la citotoxicidad de la MMC aparecía si la exposición se mantenía crónicamente durante 7 días, incluso a bajas

concentraciones, lo que podría explicar el caso de edema corneal [425], aunque no queda claro que la MMC fuera la causa de la descompensación corneal [468]. No encontramos en la literatura ningún caso de descompensación corneal tras el uso de MMC intraoperatoria en cirugía refractiva a la concentración (0,02%) y tiempo de exposición (12 seg a 2 min) habitualmente utilizados y durante un seguimiento de hasta 5 años [365,390] **(Tabla 9)**.

Chang [395] estudió el efecto de MMC al 0,01 y 0,02% aplicada durante 2 min. en córneas de conejo y encontró que la MMC producía un edema transitorio dosis-dependiente, un descenso en la densidad de células endoteliales, así como un aumento en GCC, hallando mayor apoptosis endotelial, un endotelio inflamado, pleomórfico y con importante polimegatismo. Hernández-Galileo obtuvo resultados similares en su estudio in vitro en córneas de conejo [413]. Si bien los propios autores comentan que aunque las córneas de conejo se asemejan a las humanas tras PRK (más finas y sin Bowman) y por tanto la MMC puede atravesar la córnea y tener fácil acceso al endotelio; tienen un endotelio mitóticamente más activo y por tanto son más susceptibles de la toxicidad de la MMC. Los estudios realizados con modelos animales tienen limitaciones y hay que tener precaución al interpretar los resultados.

Existen dos estudios clínicos en córneas humanas específicamente diseñados para evaluar los efectos endoteliales de la MMC en cirugía de superficie que describen una pérdida significativa de células endoteliales. Morales et al. [418] reportan una pérdida endotelial de 14,7% al mes y 18,2% a los 3 meses tras PRK y MMC 0,02% 30 segs (la misma dosis que nuestro trabajo). No obstante, su estudio presenta datos de recuento endotelial con una alta desviación estándar, lo que conlleva una baja fiabilidad de sus resultados, dado que la probabilidad de que se deban al azar, sobre un tamaño muestral tan pequeño (9 ojos por grupo), es muy alta. Existen dos formas para aumentar la fiabilidad del estudio: bien disminuyendo la desviación estándar (aumentando la reproducibilidad de la medición) o bien aumentando el número de casos estudiados. Los propios autores sugieren que un mayor número de pacientes hubiera ayudado a mejorar la calidad de su trabajo. Nassiri et al. [419] describen mayor pérdida endotelial asociada al uso de MMC y al tiempo de exposición (entre 10-50 seg) de la misma, incluso a los 6 meses tras PRK. Los datos paquimétricos postoperatorios también difieren entre los grupos, siendo significativamente más delgados en el grupo que recibió MMC, porque

el defecto refractivo a tratar fue mayor (el doble que en el grupo control), quedando una córnea más delgada que pudiera facilitar el acceso de la MMC al endotelio [468,469]. En nuestro trabajo no se hallaron diferencias en la paquimetría ni pre ni postoperatoria. El mismo grupo, en un estudio más reciente no encuentran diferencias endoteliales entre los datos preoperatorios y a los 3 meses tras PRK y MMC [445].

La mayoría de los estudios citados presentan limitaciones: pequeño tamaño muestral, diferentes concentraciones de MMC, diferentes defectos refractivos corregidos y un seguimiento limitado. Estudios con un mayor seguimiento (más de 10 años según Wilson [470]) que investiguen la repetibilidad del recuento endotelial tras ablación de superficie, el efecto del tiempo de exposición y de diferentes concentraciones de MMC, deberían llevarse a cabo para evaluar de forma más apropiada los potenciales efectos de la MMC en la densidad y función endotelial [289].

En definitiva, la ausencia de evidencia clínica de toxicidad endotelial, sugiere que una única aplicación de MMC a baja dosis en cirugía refractiva es probablemente insuficiente para producir un efecto citotóxico significativo sobre el endotelio [37,365,390].

Tabla 9. Estudios clínicos del efecto de la MMC sobre el endotelio corneal en ablación de superficie.

Autores	Nº de ojos con MMC	Tipo de estudio	Dosis MMC (%)	Tiempo aplicación MMC	Seguimiento (meses)	Densidad endotelial	Morfología de las células endoteliales	Evidencia clínica de edema corneal
Diakonis et al. [418]	15	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02	15 seg	12	No reducida	Sin cambios	No
Gambato et al. [272]	36	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02	2 min	12-36	-	Sin cambios	No
Goldsberry et al. [419]	16	Series de casos prospectivos	0,02	12 seg	12-24	No reducida	Sin cambios	No
Leccisotti et al. [420]	52	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02	45 seg	12	No reducida	-	No
Lee et al [311]	359	Series de casos retrospectivos	0,02	30 seg–2 min	3-6	No reducida	Sin cambios	No
Morales et al [416]	9	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02	30 seg	3	Reducida	-	No
Nassaralla et al. [333]	22	Series de casos prospectivos	0,02	2 min	12	No reducida	-	No
Nassiri et al. [417]	76	Estudio prospectivo, no aleatorizado, comparativo	0,02	10-50 seg	6	Reducida	-	No
Wallau et al. [421]	44	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,002	1 min	6	No reducida	Sin cambios	No
Zhao et al.[422]	174	Series de casos prospectivos	0,02	15 seg	6	No reducida	Sin cambios	No
Gambato et al. [442]	28	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02%	2 min	60	No reducida	-	No
Zare et al. [466]	42	Series de casos prospectivos	0,02%	40 seg	6	No reducida	Sin cambios	No
Shojaei et al. [383]	93	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02%	5 seg	6	No reducida	Sin cambios	No
Hofmeister et al. [385]	28	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,01%	15, 30 y 60 seg	12	Reducida 1m en todos los grupos No reducida 6 y 12 m	-	No
Diakonis et al. [426]	13	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02%	15 seg	24	No reducida	-	No
Nassiri et al. [445]	88	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02%	10 -50 seg	3	No reducida	Sin cambios	No
Sia et al. [317]	84	Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo	0,02%	60 seg	12	No reducida	-	No

CONCLUSIONES

Como resumen del análisis de los resultados de esta tesis, se señalan las siguientes conclusiones como principales:

1. La aplicación intraoperatoria de MMC no tiene un efecto nocivo clínicamente relevante sobre la reepitelización corneal tras cirugía LASEK para la corrección de miopía.

2. La evolución postoperatoria del grosor epitelial central tras LASEK para corregir miopía, no parece alterarse cualitativamente con el uso de MMC como coadyuvante; existiendo un adelgazamiento inicial, posteriormente un engrosamiento significativo a los 3 meses y tendiendo a normalizarse a los 6 meses de la intervención. Sin embargo, se pierde el patrón epitelial corneal normal, haciendo que la diferencia entre el grosor epitelial central y periférico sea más acusada que en pacientes normales, pudiendo ser una de las causas de regresión refractiva.

3. La aplicación de MMC como coadyuvante a la ablación de superficie para corregir miopía, no parece alterar cualitativamente la evolución postoperatoria del recrecimiento corneal total.

4. La ablación de superficie con MMC intraoperatoria no produce una depleción queratocitaria permanente, pero parece conllevar una redistribución de la densidad celular en las diferentes capas de la córnea con un descenso temporal en los queratocitos de las capas más anteriores, compensado por un incremento en las capas profundas, seguido más a largo plazo de una normalización de la densidad corneal total, sugiriendo que la capacidad de los queratocitos para repoblar la córnea se mantiene tras la cirugía.

5. La aplicación intraoperatoria de MMC al 0,02% durante 30 segundos no produce cambios significativos en la densidad endotelial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sadler TW. *Langman´s medical embriology*. USA: Lippincott Williamson & Wilkins Inc, 2006.

2. Civis GW. *Fundamentals and principles of Ophthalmology.* Elsevier. Boston, 2007.

3. Uva MG, Reibaldi M, Longo A, et al. Intraocular pressure and central corneal thickness in premature and full-term newborns. *J AAPOS* 2011; 15: 367–369.

4. Jay H. Krachmer, Mark J. Mannis, Edward J. Holland. *Fundamentals of cornea and external diseases.* 3rd ed. China: Mosby/Elsevier, 2011.

5. Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol* 2000; 44: 367–408.

6. Jonuscheit S, Doughty MJ, Martin R. Peripheral nasal-temporal corneal asymmetry in relation to corneal thickness: a Scheimpflug imaging study. *Ophthalmic Physiol Opt* 2015; 35: 45–51.

7. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* 1997; 11: 465–71.

8. Arntz Bustos A, Duran de la Colina JA. *Anatomía funcional de la superficie ocular. LXXX Ponencia oficial de la Sociedad Española de Oftalmología*. Madrid: Mac Line, 2004.

9. Knupp C, Pinali C, Lewis PN, et al. The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2009; 78: 25–49.

10. Arffa R.C. *Grayson: Enfermedades de la córnea.* St. Louis, 1992.

11. Michael J. Hogan, Jorge A. Alvarado, Joan Esperson Weddell. *Histology of the human eye*. Saunders, 1971.

12. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science* 1991; 32: 96–105.

13. Kaufman PL, Alm A Adler. *Fisiología del ojo*. 10th ed. España: Elsevier, 2004.

14. Kantelip B. *Lépithélium cornée.* París: Masson, 1993.

15. Thoft RA, Friend J, Kenyon KR. Ocular surface response to trauma. *Int Ophthalmol Clin* 1979; 2: 111–31.

16. Daniels JT, Harris AR, Mason C. Corneal epithelial stem cells in health and disease. *Stem Cell Reviews* 2006; 2: 247–254.

17. Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2010; 67: 2879–2895.

18. Tamura Y, Konomi H, Sawada H, et al. Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32: 2636–2644.

19. Lagali N, Germundsson J, Fagerholm P. The Role of Bowman's Layer in Corneal Regeneration after Phototherapeutic Keratectomy: A Prospective Study Using In Vivo Confocal Microscopy. *Investigative Opthalmology & Visual Science* 2009; 50: 4192.

20. Funderburgh JL. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 2000; 10: 951–8.

21. Tomás-Juan J, Murueta-Goyena Larrañaga A, Hanneken L. Corneal Regeneration After Photorefractive Keratectomy: A Review. *Journal of Optometry* 2015; 8: 149–169.

22. Wilson SE, Netto M, Ambrósio R. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. *American journal of ophthalmology* 2003; 136: 530–536.

23. Jester JV. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19: 82–93.

24. Barbosa FL, Chaurasia SS, Cutler A, et al. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp Eye Res* 2010; 91: 92–96.

25. Dawson DG, Edelhauser HF, Grossniklaus HE. Long-term histopathologic findings in human corneal wounds after refractive surgical procedures. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 168–178.

26. Dupps WJ, Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Experimental Eye Research* 2006; 83: 709–720.

27. Baldwin HC, Marshall J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. *Acta Ophthalmol Scand* 2002; 80: 238–247.

28. Zieske JD, Guimarães SR, Hutcheon AEK. Kinetics of Keratocyte Proliferation in Response to Epithelial Debridement. *Experimental Eye Research* 2001; 72: 33–39.

29. Daniels JT, Khaw PT. Temporal stimulation of corneal fibroblast wound healing activity by differentiating epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3754–3762.

30. Netto MV, Mohan RR, Ambrósio Jr R, et al. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* 2005; 24: 509–522.

31. Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res* 2003; 77: 581–592.

32. Coster DJ. *Cornea. Fundamentals of Clinical Ophthalmology.* BMJ Books. Londres, 2002.

33. Marcon AS, Rapuano CJ, Jones MR, et al. Descemet's membrane detachment after cataract surgery: management and outcome. *Ophthalmology*; 109: 2325–2330.

34. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 660–667.

35. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2005; 81: 629–638.

36. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22: 359–389.

37. Woodward MA, Edelhauser HF. Corneal endothelium after refractive surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2011; 37: 767–777.

38. Edelhauser HF. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea* 2000; 19: 263–273.

39. Sutphin JE. *Structure and function of the external eye and cornea. American Academy of ophthalmology*. Elsevier. Boston, 2007.

40. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, et al. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res* 2003; 76: 521–542.

41. Al-Aqaba MA, Fares U, Suleman H, et al. Architecture and distribution of human corneal nerves. *British Journal of Ophthalmology* 2010; 94: 784–789.

42. Müller LJ, Vrensen GF, Pels L, et al. Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 985–994.

43. Weissman BA, Fatt I, Rasson J. Diffusion of oxygen in human corneas in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science* 1981; 20: 123–125.

44. Arranz-Marquez E, Bolivar G, Piñero DP, et al. Orbscan topography in primary open-angle glaucoma. *Optometry & Vision Science* 2013; 90: 1098–1103.

45. López-Miguel A, Correa-Pérez ME, Miranda-Anta S, et al. Comparison of central corneal thickness using optical low-coherence reflectometry and spectral-domain optical coherence tomography. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38: 758–764.

46. Von Bahr G. Measurements of the thickness of the cornea. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1948; 26: 247–266.

47. Ishibazawa A, Igarashi S, Hanada K, et al. Central corneal thickness measurements with Fourier-domain optical coherence tomography versus ultrasonic pachymetry and rotating Scheimpflug camera. *Cornea* 2011; 30: 615–619.

48. Rio-Cristobal A, Martin R. Corneal assessment technologies: current status. *Surv Ophthalmol* 2014; 59: 599–614.

49. Kawana K, Tokunaga T, Miyata K, et al. Comparison of corneal thickness measurements using Orbscan II, non-contact specular microscopy, and ultrasonic pachymetry in eyes after laser in situ keratomileusis. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 466–468.

50. Wirbelauer C, Scholz C, Hoerauf H, et al. Noncontact corneal pachymetry with slit lamp-adapted optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 444–450.

51. Konstantopoulos A, Hossain P, Anderson DF. Recent advances in ophthalmic anterior segment imaging: a new era for ophthalmic diagnosis? *British Journal of Ophthalmology* 2007; 91: 551–557.

52. Møller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, et al. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Investigative ophthalmology & visual science* 1998; 39: 487–501.

53. Møller-Pedersen T, Vogel M, Li HF, et al. Quantification of stromal thinning, epithelial thickness, and corneal haze after photorefractive keratectomy using in vivo confocal microscopy. *Ophthalmology* 1997; 104: 360–368.

54. Li HF, Petroll WM, Møller-Pedersen T, et al. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr Eye Res* 1997; 16: 214–221.

55. Bourne RR, Alsbirk PH. Anterior chamber depth measurement by optical pachymetry: systematic difference using the Haag-Streit attachments. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 142–145.

56. Huang D, Wang J, Lin CP, et al. Micron-resolution ranging of cornea anterior chamber by optical reflectometry. *Lasers Surg Med* 1991; 11: 419–425.

57. Losada Bayo D, Ruiz Casas D, Almendral Gómez A, et al. OCT. Recuerdo histórico y bases teóricas de funcionamiento. In: *Tomografía de Coherencia Óptica. LXXXVII Ponencia Oficial de la Sociedad Española de Oftalmología*. Madrid: Mac Line, 2011, pp. 27–32.

58. Ramos JLB, Li Y, Huang D. Clinical and research applications of anterior segment optical coherence tomography - a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 2009; 37: 81–89.

59. Maldonado MJ, Ruiz-Oblitas L, Munuera JM, et al. Optical coherence tomography evaluation of the corneal cap and stromal bed features after laser in situ keratomileusis for high myopia and astigmatism. *Ophthalmology* 2000; 107: 81–87; discussion 88.

60. Fujimoto JG, Brezinski ME, Tearney GJ, et al. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat Med* 1995; 1: 970–972.

61. Sakata LM, Deleon-Ortega J, Sakata V, et al. Optical coherence tomography of the retina and optic nerve - a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 2009; 37: 90–99.

62. Hermann B, Fernández EJ, Unterhuber A, et al. Adaptive-optics ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Opt Lett* 2004; 29: 2142–2144.

63. Doors M, Berendschot TTJM, de Brabander J, et al. Value of optical coherence tomography for anterior segment surgery. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36: 1213–1229.

64. Garg A. Opthical Coherence Tomography: Currente tecnology and Future Applications. In: *Anterior and Posterior Segment Opthical Coherence Tomography: Currente tecnology and Future Applications.* Jaypee Brothers Medical Publishers, 2014, pp. 1–9.

65. Kostanyan T, Wollstein G, Schuman JS. New developments in optical coherence tomography. *Curr Opin Ophthalmol* 2015; 26: 110–115.

66. Jaffe GJ, Caprioli J. Optical coherence tomography to detect and manage retinal disease and glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2004; 137: 156–169.

67. Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, et al. Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in vivo with optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1584–1589.

68. Radhakrishnan S, Goldsmith J, Huang D, et al. Comparison of optical coherence tomography and ultrasound biomicroscopy for detection of narrow anterior chamber angles. *Arch Ophthalmol* 2005; 123: 1053–1059.

69. Goldsmith JA, Li Y, Chalita MR, et al. Anterior chamber width measurement by high-speed optical coherence tomography. *Ophthalmology* 2005; 112: 238–244.

70. AKKhurana AK, Khurana B. Fundamentals of Optical Coherence Tomography. *Anterior & Posterior Segment OCT: Current Technology & Future Applications* 2014; 10.

71. Hoerauf H, Wirbelauer C, Scholz C, et al. Slit-lamp-adapted optical coherence tomography of the anterior segment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238: 8–18.

72. Wirbelauer C, Scholz C, Hoerauf H, et al. Corneal optical coherence tomography before and immediately after excimer laser photorefractive keratectomy. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 693–699.

73. Correa-Pérez ME, López-Miguel A, Miranda-Anta S, et al. Precision of High Definition Spectral-Domain Optical Coherence Tomography for Measuring Central Corneal Thickness. *Investigative Opthalmology & Visual Science* 2012; 53: 1752.

74. Li Y, Shekhar R, Huang D. Corneal pachymetry mapping with high-speed optical coherence tomography. *Ophthalmology* 2006; 113: 792–799.

75. Mohamed S, Lee GK, Rao SK, et al. Repeatability and reproducibility of pachymetric mapping with Visante anterior segment–optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science* 2007; 48: 5499–5504.

76. Lai MM, Tang M, Andrade EMM, et al. Optical coherence tomography to assess intrastromal corneal ring segment depth in keratoconic eyes. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 1860–1865.

77. Prakash G, Agarwal A, Mazhari AI, et al. Reliability and Reproducibility of Assessment of Corneal Epithelial Thickness by Fourier Domain Optical Coherence Tomography. *Investigative Opthalmology & Visual Science* 2012; 53: 2580.

78. Ma XJ, Wang L, Koch DD. Repeatability of Corneal Epithelial Thickness Measurements Using Fourier-Domain Optical Coherence Tomography in Normal and Post-LASIK Eyes: *Cornea* 2013; 32: 1544–1548.

79. Wirbelauer C, Scholz C, Häberle H, et al. Corneal optical coherence tomography before and after phototherapeutic keratectomy for recurrent epithelial erosions(2). *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 1629–1635.

80. Ustundag C, Bahcecioglu H, Ozdamar A, et al. Optical coherence tomography for evaluation of anatomical changes in the cornea after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26: 1458–1462.

81. Stahl JE, Durrie DS, Schwendeman FJ, et al. Anterior segment OCT analysis of thin IntraLase femtosecond flaps. *J Refract Surg* 2007; 23: 555–558.

82. Cheng AC, Ho T, Lau S, et al. Measurement of LASIK flap thickness with anterior segment optical coherence tomography. *Journal of refractive surgery* 2008; 24: 879–884.

83. Schneider M, Borgulya G, Seres A, et al. Central corneal thickness measurements with optical coherence tomography and ultrasound pachymetry in healthy subjects and in patients after photorefractive keratectomy. *Eur J Ophthalmol* 2009; 19: 180–187.

84. von Jagow B, Kohnen T. Corneal architecture of femtosecond laser and microkeratome flaps imaged by anterior segment optical coherence tomography. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2009; 35: 35–41.

85. Ju W-K, Lee J-H, Chung T-Y, et al. Reproducibility of LASIK flap thickness using the zeiss femtosecond laser measured postoperatively by optical coherence tomography. *J Refract Surg* 2011; 27: 106–110.

86. Gauthier CA, Holden BA, Epstein D, et al. Role of epithelial hyperplasia in regression following photorefractive keratectomy. *Br J Ophthalmol* 1996; 80: 545–548.

87. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, et al. Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive

keratectomy: a 1-year confocal microscopic study. *Ophthalmology* 2000; 107: 1235–1245.

88. Hanna C, O'brien JE. Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea. *Arch Ophthalmol* 1960; 64: 536–539.

89. Zagon IS, Sassani JW, Ruth TB, et al. Epithelial adhesion complexes and organ culture of the human cornea. *Brain Res* 2001; 900: 205–213.

90. Li Y, Tan O, Brass R, et al. Corneal Epithelial Thickness Mapping by Fourier-Domain Optical Coherence Tomography in Normal and Keratoconic Eyes. *Ophthalmology* 2012; 119: 2425–2433.

91. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M. Corneal epithelial thickness profile in the diagnosis of keratoconus. *J Refract Surg* 2009; 25: 604–610.

92. Patel S, Marshall J, Fitzke FW. Refractive index of the human corneal epithelium and stroma. *J Refract Surg* 1995; 11: 100–105.

93. Simon G, Ren Q, Kervick GN, et al. Optics of the corneal epithelium. *Refract Corneal Surg* 1993; 9: 42–50.

94. Reinstein DZ, Silverman RH, Raevsky T, et al. Arc-scanning very high-frequency digital ultrasound for 3D pachymetric mapping of the corneal epithelium and stroma in laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2000; 16: 414–430.

95. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M, et al. Epithelial thickness in the normal cornea: three-dimensional display with Artemis very high-frequency digital ultrasound. *J Refract Surg* 2008; 24: 571–581.

96. Pérez JG, Méijome JMG, Jalbert I, et al. Corneal epithelial thinning profile induced by long-term wear of hydrogel lenses. *Cornea* 2003; 22: 304–307.

97. Feng Y, Simpson TL. Comparison of human central cornea and limbus in vivo using optical coherence tomography. *Optom Vis Sci* 2005; 82: 416–419.

98. Feng Y, Simpson TL. Corneal, limbal, and conjunctival epithelial thickness from optical coherence tomography. *Optom Vis Sci* 2008; 85: E880-883.

99. Haque S, Jones L, Simpson T. Thickness mapping of the cornea and epithelium using optical coherence tomography. *Optom Vis Sci* 2008; 85: E963-976.

100. Feng Y, Varikooty J, Simpson TL. Diurnal variation of corneal and corneal epithelial thickness measured using optical coherence tomography. *Cornea* 2001; 20: 480–483.

101. Zhao PS, Wong TY, Wong W-L, et al. Comparison of central corneal thickness measurements by visante anterior segment optical coherence tomography with ultrasound pachymetry. *American journal of ophthalmology* 2007; 143: 1047–1049.

102. Correa-Pérez ME, Olmo N, López-Miguel A, et al. Dependability of posterior-segment spectral domain optical coherence tomography for measuring central corneal thickness. *Cornea* 2014; 33: 1219–1224.

103. Li EYM, Mohamed S, Leung CKS, et al. Agreement among 3 Methods to Measure Corneal Thickness: Ultrasound Pachymetry, Orbscan II, and Visante Anterior Segment Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* 2007; 114: 1842–1847.e2.

104. Huang J-Y, Pekmezci M, Yaplee S, et al. Intra-examiner repeatability and agreement of corneal pachymetry map measurement by time-domain and Fourier-domain optical coherence tomography. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2010; 248: 1647–1656.

105. SIN S, Simpson TL. The repeatability of corneal and corneal epithelial thickness measurements using optical coherence tomography. *Optometry & Vision Science* 2006; 83: 360–365.

106. Kanellopoulos AJ, Asimellis G. In vivo three-dimensional corneal epithelium imaging in normal eyes by anterior-segment optical coherence tomography: a clinical reference study. *Cornea* 2013; 32: 1493–1498.

107. Du C, Wang J, Cui L, et al. Vertical and horizontal corneal epithelial thickness profiles determined by ultrahigh resolution optical coherence tomography. *Cornea* 2012; 31: 1036–1043.

108. Wang J, Fonn D, Simpson TL, et al. The measurement of corneal epithelial thickness in response to hypoxia using optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 315–319.

109. Kanellopoulos AJ, Asimellis G. In vivo 3-dimensional corneal epithelial thickness mapping as an indicator of dry eye: preliminary clinical assessment. *Am J Ophthalmol* 2014; 157: 63–68.e2.

110. Haque S, Simpson T, Jones L. Corneal and epithelial thickness in keratoconus: a comparison of ultrasonic pachymetry, Orbscan II, and optical coherence tomography. *J Refract Surg* 2006; 22: 486–493.

111. Gipson IK. Corneal epithelial and stromal reactions to excimer laser photorefractive keratectomy. I. Concerns regarding the response of the corneal epithelium to excimer laser ablation. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 1539–1540.

112. Lohmann CP, Reischl U, Marshall J. Regression and epithelial hyperplasia after myopic photorefractive keratectomy in a human cornea. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 712–715.

113. Huang D, Tang M, Shekhar R. Mathematical model of corneal surface smoothing after laser refractive surgery. *Am J Ophthalmol* 2003; 135: 267–278.

114. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M, et al. Epithelial Thickness After Hyperopic LASIK: Three-Dimensional Display with Artemis Very High-Frequency Digital Ultrasound. *Journal of Refractive Surgery* 2010; 26: 555–564.

115. Chen X, Stojanovic A, Liu Y, et al. Postoperative Changes in Corneal Epithelial and Stromal Thickness Profiles After Photorefractive Keratectomy in Treatment of Myopia. *Journal of Refractive Surgery* 2015; 31: 446–453.

116. De Benito-Llopis L, Teus MA, Drake-Casanova P. [Effect of mitomycin C on corneal regrowth after laser-assisted sub-epithelial keratectomy (LASEK)]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011; 86: 213–217.

117. McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea* 2008; 27: 1–16.

118. Swartz T, Marten L, Wang M. Measuring the cornea: the latest developments in corneal topography. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 325–333.

119. Cairns G, McGhee CNJ. Orbscan computerized topography: attributes, applications, and limitations. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31: 205–220.

120. Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Clinical confocal microscopy. *Curr Opin Ophthalmol* 1998; 9: 59–65.

121. Boyde A. Applications of tandem scanning reflected light microscopy and three-dimensional imaging. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 483: 428–439.

122. Minsky M. Memoir on inventing de confocal scanning microscope. *Scanning J* 1988; 10: 128–138.

123. Minsky M. *Microscopy apparatus*. Google Patentshttp://www.google.com/patents/US3013467 (1961).

124. Lemp MA, Dilly PN, Boyde A. Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea* 1985; 4: 205–209.

125. McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Automated Assessment of Keratocyte Density in Stromal Images from the ConfoScan 4 Confocal Microscope. *Investigative Opthalmology & Visual Science* 2010; 51: 1918.

126. Masters BR, Böhnke M. Confocal microscopy of the human cornea in vivo. *Int Ophthalmol* 2001; 23: 199–206.

127. Sheppard C. *[(Confocal Laser Scanning Microscopy)]*. New york: Bios Scientific Publishers Ltd, 1997.

128. Böhnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 553–628.

129. Guthoff RF, Baudouin C, Stave J. *Atlas of confocal laser scanning in-vivo microscopy in ophthalmology: principles and applications in diagnostic and therapeutic ophthalmology*. Berlin: Springer, 2006.

130. Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, et al. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2001; 78: 706–711.

131. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, et al. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998; 17: 485–492.

132. Patel S, McLaren J, Hodge D, et al. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 333–339.

133. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 2001; 20: 374–384.

134. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, et al. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243: 1056–1061.

135. Møller-Pedersen T. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging. *Cornea* 1997; 16: 333–338.

136. Li J, Jester JV, Cavanagh HD, et al. On-line 3-dimensional confocal imaging in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2945–2953.

137. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, et al. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2000; 19: 185–193.

138. Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, et al. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 320–326.

139. Berlau J, Becker H-H, Stave J, et al. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas: a study using scanning-slit confocal microscopy in vivo. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 611–616.

140. Imre L, Nagymihály A. Reliability and reproducibility of corneal endothelial image analysis by in vivo confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239: 356–360.

141. Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, et al. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 1993; 100: 1444–1454.

142. Ren DH, Yamamoto K, Ladage PM, et al. Adaptive effects of 30-night wear of hyper-O(2) transmissible contact lenses on bacterial binding and corneal epithelium: a 1-year clinical trial. *Ophthalmology* 2002; 109: 27-39-40.

143. Ku JYF, Niederer RL, Patel DV, et al. Laser Scanning In Vivo Confocal Analysis of Keratocyte Density in Keratoconus. *Ophthalmology* 2008; 115: 845–850.

144. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, et al. Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *British Journal of Ophthalmology* 2007; 91: 1165–1169.

145. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, et al. Corneal innervation and cellular changes after corneal transplantation: an in vivo confocal microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 621–626.

146. Vesaluoma M, Pérez-Santonja J, Petroll WM, et al. Corneal stromal changes induced by myopic LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 369–376.

147. Erie JC, Nau CB, McLaren JW, et al. Long-term keratocyte deficits in the corneal stroma after LASIK. *Ophthalmology* 2004; 111: 1356–1361.

148. Pisella PJ, Auzerie O, Bokobza Y, et al. Evaluation of corneal stromal changes in vivo after laser in situ keratomileusis with confocal microscopy. *Ophthalmology* 2001; 108: 1744–1750.

149. Rajan MS, Watters W, Patmore A, et al. In vitro human corneal model to investigate stromal epithelial interactions following refractive surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2005; 31: 1789–1801.

150. Ali Javadi M, Kanavi MR, Mahdavi M, et al. Comparison of keratocyte density between keratoconus, post-laser in situ keratomileusis keratectasia, and uncomplicated post-laser in situ keratomileusis cases. A confocal scan study. *Cornea* 2009; 28: 774–779.

151. Herrmann WA, Muecke M, Koller M, et al. Keratocyte density in the retroablation area after LASEK for the correction of myopia. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2007; 245: 426–430.

152. Moilanen JAO, Vesaluoma MH, Müller LJ, et al. Long-term corneal morphology after PRK by in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1064–1069.

153. Frueh BE, Cadez R, Böhnke M. In vivo confocal microscopy after photorefractive keratectomy in humans. A prospective, long-term study. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 1425–1431.

154. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, et al. Keratocyte density in the human cornea after photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 770–776.

155. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, et al. Corneal keratocyte deficits after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2006; 141: 799–809.

156. Bourne WM, McLaren JW. Clinical responses of the corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2004; 78: 561–572.

157. Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia* 1968; 24: 1094–1095.

158. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM. Clinical specular microscopy. I. Optical principles. *Arch Ophthalmol* 1979; 97: 1714–1719.

159. Sherrard ES, Buckley RJ. Clinical specular microscopy of the corneal endothelium. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1981; 101: 156–162.

160. Rao GN, Lohman LE, Aquavella JV. Cell size-shape relationships in corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 22: 271–274.

161. Matsuda M, Suda T, Manabe R. Serial alterations in endothelial cell shape and pattern after intraocular surgery. *Am J Ophthalmol* 1984; 98: 313–319.

162. Tuft SJ, Coster DJ. The corneal endothelium. *Eye (Lond)* 1990; 4 (Pt 3): 389–424.

163. Krachmer J, Mannis M, Holland E, et al. *Refractive Surgery: past, present, and future*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005.

164. Thompson FB. A simplified scleral reinforcement technique. *Am J Ophthalmol* 1978; 86: 782–790.

165. Colin J, Robinet A. Clear lensectomy and implantation of low-power posterior chamber intraocular lens for the correction of high myopia. *Ophthalmology* 1994; 101: 107–112.

166. Menezo JL, Cisneros A, Harto M. Extracapsular cataract extraction and implantation of a low power lens for high myopia. *J Cataract Refract Surg* 1988; 14: 409–412.

167. Ali MH, Javaid M, Jamal S, et al. Femtosecond laser assisted cataract surgery, beginning of a new era in cataract surgery. *Oman J Ophthalmol* 2015; 8: 141–146.

168. Sato T, Akiyama K, Shibata H. A new surgical approach to myopia. *Am J Ophthalmol* 1953; 36: 823–829.

169. Fyodorov SN, Sarkizova MB, Kurasova TP. Corneal biomicroscopy following repeated radial keratotomy. *Ann Ophthalmol* 1983; 15: 403–407.

170. Sawelson H, Marks RG. Ten-year refractive and visual results of radial keratotomy. *Ophthalmology* 1995; 102: 1892–1901.

171. Faktorovich EG, Maloney RK, Price FW. Effect of astigmatic keratotomy on spherical equivalent: results of the Astigmatism Reduction Clinical Trial. *Am J Ophthalmol* 1999; 127: 260–269.

172. Inoue T, Maeda N, Sasaki K, et al. Factors that influence the surgical effects of astigmatic keratotomy after cataract surgery. *Ophthalmology* 2001; 108: 1269–1274.

173. Budak K, Friedman NJ, Koch DD. Limbal relaxing incisions with cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24: 503–508.

174. Price FW, Grene RB, Marks RG, et al. Astigmatism reduction clinical trial: a multicenter prospective evaluation of the predictability of arcuate keratotomy. Evaluation of surgical nomogram predictability. ARC-T Study Group. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 277–282.

175. McDonald MB, Hersh PS, Manche EE, et al. Conductive keratoplasty for the correction of low to moderate hyperopia: U.S. clinical trial 1-year results on 355 eyes. *Ophthalmology* 2002; 109: 1978-1989-1990.

176. Seiler T, Matallana M, Bende T. Laser thermokeratoplasty by means of a pulsed holmium:YAG laser for hyperopic correction. *Refract Corneal Surg* 1990; 6: 335–339.

177. Chen SS, Humphrey JD. Heat-induced changes in the mechanics of a collagenous tissue: pseudoelastic behavior at 37 degrees C. *J Biomech* 1998; 31: 211–216.

178. Esquenazi S, He J, Kim DB, et al. Wound-healing response and refractive regression after conductive keratoplasty. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 480–486.

179. Barraquer JI. [Autokeratoplasty with optical carving for the correction of myopia (Keratomileusis)]. *An Med Espec* 1965; 51: 66–82.

180. Barraquer JI. Keratomileusis for myopia and aphakia. *Ophthalmology* 1981; 88: 701–708.

181. Swinger CA, Barraquer JI. Keratophakia and keratomileusis--clinical results. *Ophthalmology* 1981; 88: 709–715.

182. Friedlander MH, Rich LF, Werblin TP, et al. Keratophakia using preserved lenticules. *Ophthalmology* 1980; 87: 687–692.

183. McDonald MB, Kaufman HE, Aquavella JV, et al. The nationwide study of epikeratophakia for myopia. *Am J Ophthalmol* 1987; 103: 375–383.

184. Lyle WA, Jin GJ. Initial results of automated lamellar keratoplasty for correction of myopia: one year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 1996; 22: 31–43.

185. Esquenazi S. Comparison of laser in situ keratomileusis and automated lamellar keratoplasty for the treatment of myopia. *J Refract Surg* 1997; 13: 637–643.

186. Trokel SL, Srinivasan R, Braren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 1983; 96: 710–715.

187. Krueger RR, Trokel SL. Quantitation of corneal ablation by ultraviolet laser light. *Arch Ophthalmol* 1985; 103: 1741–1742.

188. Krueger RR, Saedy NF, McDonnell PJ. Clinical analysis of steep central islands after excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 377–381.

189. Fiore T, Carones F, Brancato R. Broad beam vs. flying spot excimer laser: refractive and videokeratographic outcomes of two different ablation profiles after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2001; 17: 534–541.

190. Pettit GH. The Alcon/Summit/Autonomous perspective on fixed vs. variable spot ablation. *J Refract Surg* 2001; 17: S592-593.

191. Gobbi PG, Carones F, Brancato R, et al. Automatic eye tracker for excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1995; 11: S337-342.

192. Munnerlyn CR, Koons SJ, Marshall J. Photorefractive keratectomy: a technique for laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 1988; 14: 46–52.

193. Sher NA, Frantz JM, Talley A, et al. Topical diclofenac in the treatment of ocular pain after excimer photorefractive keratectomy. *Refract Corneal Surg* 1993; 9: 425–436.

194. Hsu JKW, Johnston WT, Read RW, et al. Histopathology of corneal melting associated with diclofenac use after refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 250–256.

195. Gabison EE, Chastang P, Menashi S, et al. Late corneal perforation after photorefractive keratectomy associated with topical diclofenac: involvement of matrix metalloproteinases. *Ophthalmology* 2003; 110: 1626–1631.

196. Gartry DS, Kerr Muir MG, Marshall J. Excimer laser photorefractive keratectomy. 18-month follow-up. *Ophthalmology* 1992; 99: 1209–1219.

197. Rajan MS, Jaycock P, O'Brart D, et al. A long-term study of photorefractive keratectomy; 12-year follow-up. *Ophthalmology* 2004; 111: 1813–1824.

198. Kremer I, Kaplan A, Novikov I, et al. Patterns of late corneal scarring after photorefractive keratectomy in high and severe myopia. *Ophthalmology* 1999; 106: 467–473.

199. Møller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res* 2004; 78: 553–560.

200. Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Siganos DS, et al. A corneal flap technique for laser in situ keratomileusis. Human studies. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1699–1702.

201. Pérez-Santonja JJ, Bellot J, Claramonte P, et al. Laser in situ keratomileusis to correct high myopia. *J Cataract Refract Surg* 1997; 23: 372–385.

202. Farah SG, Azar DT, Gurdal C, et al. Laser in situ keratomileusis: literature review of a developing technique. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24: 989–1006.

203. Salah T, Waring GO, el Maghraby A, et al. Excimer laser in situ keratomileusis under a corneal flap for myopia of 2 to 20 diopters. *Am J Ophthalmol* 1996; 121: 143–155.

204. Gris O, Güell JL, Muller A. Keratomileusis update. *J Cataract Refract Surg* 1996; 22: 620–623.

205. Pallikaris IG, Kymionis GD, Astyrakakis NI. Corneal ectasia induced by laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27: 1796–1802.

206. Rad AS, Jabbarvand M, Saifi N. Progressive keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2004; 20: S718-722.

207. Seiler T, Koufala K, Richter G. Iatrogenic keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 1998; 14: 312–317.

208. Seiler T, Quurke AW. Iatrogenic keratectasia after LASIK in a case of forme fruste keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 1998; 24: 1007–1009.

209. Tabbara KF, Kotb AA. Risk factors for corneal ectasia after LASIK. *Ophthalmology* 2006; 113: 1618–1622.

210. Rao SN, Raviv T, Majmudar PA, et al. Role of Orbscan II in screening keratoconus suspects before refractive corneal surgery. *Ophthalmology* 2002; 109: 1642–1646.

211. Randleman JB. Post-laser in-situ keratomileusis ectasia: current understanding and future directions. *Curr Opin Ophthalmol* 2006; 17: 406–412.

212. Lin RT, Maloney RK. Flap complications associated with lamellar refractive surgery. *Am J Ophthalmol* 1999; 127: 129–136.

213. Melki SA, Azar DT. LASIK complications: etiology, management, and prevention. *Surv Ophthalmol* 2001; 46: 95–116.

214. Carpel EF, Carlson KH, Shannon S. Folds and striae in laser in situ keratomileusis flaps. *J Refract Surg* 1999; 15: 687–690.

215. Helena MC, Meisler D, Wilson SE. Epithelial growth within the lamellar interface after laser in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea* 1997; 16: 300–305.

216. Smith RJ, Maloney RK. Diffuse lamellar keratitis. A new syndrome in lamellar refractive surgery. *Ophthalmology* 1998; 105: 1721–1726.

217. Pérez-Santonja JJ, Sakla HF, Abad JL, et al. Nocardial keratitis after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 1997; 13: 314–317.

218. Wilson SE, Ambrósio R. Laser in situ keratomileusis-induced neurotrophic epitheliopathy. *Am J Ophthalmol* 2001; 132: 405–406.

219. Benitez-del-Castillo JM, del Rio T, Iradier T, et al. Decrease in tear secretion and corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis. *Cornea* 2001; 20: 30–32.

220. Kakaria S, Hoang-Xuan T, Azar D. *LASIK: fundamentals, surgical techniques and complications. Microkeratomes*. New York: Marcel Dekker, 2003.

221. Soong HK, Malta JB. Femtosecond lasers in ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 2009; 147: 189–197.e2.

222. Nordan LT, Slade SG, Baker RN, et al. Femtosecond laser flap creation for laser in situ keratomileusis: six-month follow-up of initial U.S. clinical series. *J Refract Surg* 2003; 19: 8–14.

223. Kurtz RM, Liu X, Elner VM, et al. Photodisruption in the human cornea as a function of laser pulse width. *J Refract Surg* 1997; 13: 653–658.

224. Kurtz RM, Horvath C, Liu HH, et al. Lamellar refractive surgery with scanned intrastromal picosecond and femtosecond laser pulses in animal eyes. *J Refract Surg* 1998; 14: 541–548.

225. Netto MV, Mohan RR, Medeiros FW, et al. Femtosecond laser and microkeratome corneal flaps: comparison of stromal wound healing and inflammation. *J Refract Surg* 2007; 23: 667–676.

226. Sutton G, Hodge C. Accuracy and precision of LASIK flap thickness using the IntraLase femtosecond laser in 1000 consecutive cases. *J Refract Surg* 2008; 24: 802–806.

227. Vryghem JC, Devogelaere T, Stodulka P. Efficacy, safety, and flap dimensions of a new femtosecond laser for laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36: 442–448.

228. Stonecipher K, Ignacio TS, Stonecipher M. Advances in refractive surgery: microkeratome and femtosecond laser flap creation in relation to safety, efficacy, predictability, and biomechanical stability. *Curr Opin Ophthalmol* 2006; 17: 368–372.

229. Binder PS. Flap dimensions created with the IntraLase FS laser. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 26–32.

230. Muñoz G, Albarrán-Diego C, Sakla HF, et al. Transient light-sensitivity syndrome after laser in situ keratomileusis with the femtosecond laser Incidence and prevention. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 2075–2079.

231. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M. Small incision lenticule extraction (SMILE) history, fundamentals of a new refractive surgery technique and clinical outcomes. *Eye Vis (Lond)* 2014; 1: 3.

232. Piñero DP, Teus MA. Clinical outcomes of small-incision lenticule extraction and femtosecond laser-assisted wavefront-guided laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2016; 42: 1078–1093.

233. Shahinian L. Laser-assisted subepithelial keratectomy for low to high myopia and astigmatism. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 1334–1342.

234. Shah S. The epithelial flap for photorefractive keratectomy. *British Journal of Ophthalmology* 2001; 85: 393–396.

235. Nakamura K. Intact corneal epithelium is essential for the prevention of stromal haze after laser assisted in situ keratomileusis. *British Journal of Ophthalmology* 2001; 85: 209–213.

236. Azar DT, Ang RT, Lee JB, et al. Laser subepithelial keratomileusis: electron microscopy and visual outcomes of flap photorefractive keratectomy. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 323–328.

237. Camellin M. LASEK: nuova tecnica di chirurgia refrattiva mediane laser ad eccimeri. *Viscochirurgia* 1998; 3: 39–43.

238. Camellin M. Laser epithelial keratomileusis for myopia. *J Refract Surg* 2003; 19: 666–670.

239. Taneri S, Zieske JD, Azar DT. Evolution, techniques, clinical outcomes, and pathophysiology of LASEK: review of the literature. *Surv Ophthalmol* 2004; 49: 576–602.

240. Browning AC, Shah S, Dua HS, et al. Alcohol debridement of the corneal epithelium in PRK and LASEK: an electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 510–513.

241. Litwak S, Zadok D, Garcia-de Quevedo V, et al. Laser-assisted subepithelial keratectomy versus photorefractive keratectomy for the correction of myopia. A prospective comparative study. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 1330–1333.

242. O'Keefe M, Kirwan C. Laser epithelial keratomileusis in 2010 - a review: Laser epithelial keratomileusis. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 2010; 38: 183–191.

243. de Benito-Llopis L, Teus MA. Epi-LASIK versus LASEK and PRK. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38: 732; author reply 732-733.

244. Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Experimental eye research* 2003; 76: 71–87.

245. Wilson SE, Salomao MQ. Corneal molecular and cellular biology update for the refractive surgeon. *Journal of refractive surgery (Thorofare, NJ: 1995)* 2009; 25: 459.

246. Wilson SE, Mohan RR, Hutcheon AEK, et al. Effect of ectopic epithelial tissue within the stroma on keratocyte apoptosis, mitosis, and myofibroblast transformation. *Exp Eye Res* 2003; 76: 193–201.

247. Rocha KM, Kagan R, Smith SD, et al. Thresholds for Interface Haze Formation After Thin-Flap Femtosecond Laser In Situ Keratomileusis for Myopia. *American Journal of Ophthalmology* 2009; 147: 966–972.e1.

248. Campos M, Raman S, Lee M, et al. Keratocyte loss after different methods of de-epithelialization. *Ophthalmology* 1994; 101: 890–894.

249. Campos M, Szerenyi K, Lee M, et al. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 254–260.

250. Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 293–309.

251. Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, et al. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 1109–1116.

252. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 311–356.

253. Stramer BM, Zieske JD, Jung J-C, et al. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4237–4246.

254. Lee JB, Seong GJ, Lee JH, et al. Comparison of laser epithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27: 565–570.

255. Gabler B, Winkler von Mohrenfels C, Dreiss AK, et al. Vitality of epithelial cells after alcohol exposure during laser-assisted subepithelial keratectomy flap preparation. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28: 1841–1846.

256. Pallikaris IG, Naoumidi II, Kalyvianaki MI, et al. Epi-LASIK: comparative histological evaluation of mechanical and alcohol-assisted epithelial separation. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 1496–1501.

257. Pallikaris IG, Katsanevaki VJ, Kalyvianaki MI, et al. Advances in subepithelial excimer refractive surgery techniques: Epi-LASIK. *Curr Opin Ophthalmol* 2003; 14: 207–212.

258. Torres LF, Sancho C, Tan B, et al. Early postoperative pain following Epi-LASIK and photorefractive keratectomy: a prospective, comparative, bilateral study. *J Refract Surg* 2007; 23: 126–132.

259. O'Doherty M, Kirwan C, O'Keeffe M, et al. Postoperative pain following epi-LASIK, LASEK, and PRK for myopia. *J Refract Surg* 2007; 23: 133–138.

260. Esquenazi S, He J, Bazan NG, et al. Comparison of corneal wound-healing response in photorefractive keratectomy and laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31: 1632–1639.

261. Laube T, Wissing S, Theiss C, et al. Decreased keratocyte death after laser-assisted subepithelial keratectomy and photorefractive keratectomy in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 1998–2004.

262. Javier JAD, Lee JB, Oliveira HB, et al. Basement membrane and collagen deposition after laser subepithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy in the leghorn chick eye. *Arch Ophthalmol* 2006; 124: 703–709.

263. Vinciguerra P, Torres I, Camesasca FI. Applications of confocal microscopy in refractive surgery. *J Refract Surg* 2002; 18: S378-381.

264. Rokita-Wala I, Gierek-Ciaciura S, Mrukwa-Kominek E. [In vivo evaluation of corneal structure changes after refractive procedures]. *Klin Oczna* 2002; 104: 332–340.

265. Pirouzian A, Thornton JA, Ngo S. A randomized prospective clinical trial comparing laser subepithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 2004; 122: 11–16.

266. Lee HK, Lee KS, Kim JK, et al. Epithelial healing and clinical outcomes in excimer laser photorefractive surgery following three epithelial removal techniques: Mechanical, alcohol, and excimer laser. *American Journal of Ophthalmology* 2005; 139: 56–63.

267. Hashemi H, Fotouhi A, Foudazi H, et al. Prospective, randomized, paired comparison of laser epithelial keratomileusis and photorefractive keratectomy for myopia less than -6.50 diopters. *J Refract Surg* 2004; 20: 217–222.

268. Autrata R, Rehurek J. Laser-assisted subepithelial keratectomy for myopia: two-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 661–668.

269. Netto MV, Wilson SE. Indications for excimer laser surface ablation. *J Refract Surg* 2005; 21: 734–741.

270. Hjortdal JØ, Ehlers N. Treatment of post-keratoplasty astigmatism by topography supported customized laser ablation. *Acta Ophthalmol Scand* 2001; 79: 376–380.

271. de Benito-Llopis L, Alió JL, Ortiz D, et al. Ten-year Follow-up of Excimer Laser Surface Ablation for Myopia in Thin Corneas. *American Journal of Ophthalmology* 2009; 147: 768–773.e2.

272. de Benito-Llopis L, Teus MA, Sánchez-Pina JM. Comparison Between LASEK With Mitomycin C and LASIK for the Correction of Myopia of–7.00 to–13.75 D. *Journal of Refractive Surgery* 2008; 24: 516–523.

273. Vandorselaer T, Hermiat JJ, Schraepen P, et al. Lasek for myopia: first results. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 2003; 59–68.

274. Lin N, Yee SB, Mitra S, et al. Prediction of corneal haze using an ablation depth/corneal thickness ratio after laser epithelial keratomileusis. *J Refract Surg* 2004; 20: 797–802.

275. Gambato C, Ghirlando A, Moretto E, et al. Mitomycin C modulation of corneal wound healing after photorefractive keratectomy in highly myopic eyes. *Ophthalmology* 2005; 112: 208–218.

276. Carones F, Vigo L, Scandola E, et al. Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2002; 28: 2088–2095.

277. Argento C, Cosentino MJ, Ganly M. Comparison of laser epithelial keratomileusis with and without the use of mitomycin C. *J Refract Surg* 2006; 22: 782–786.

278. O'Connor J, O'Keeffe M, Condon PI. Twelve-year follow-up of photorefractive keratectomy for low to moderate myopia. *J Refract Surg* 2006; 22: 871–877.

279. Donnenfeld ED, O'Brien TP, Solomon R, et al. Infectious keratitis after photorefractive keratectomy. *Ophthalmology* 2003; 110: 743–747.

280. Rodriguez B, Holzinger KA, Le LH, et al. Mycobacterium chelonae keratitis after laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 1059–1061.

281. Teal P, Breslin C, Arshinoff S, et al. Corneal subepithelial infiltrates following excimer laser photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 1995; 21: 516–518.

282. Lemp MA. Advances in understanding and managing dry eye disease. *Am J Ophthalmol* 2008; 146: 350–356.

283. Reznik J, Salz JJ, Klimava A. Development of unilateral corneal ectasia after PRK with ipsilateral preoperative forme fruste keratoconus. *J Refract Surg* 2008; 24: 843–847.

284. Malecaze F, Coullet J, Calvas P, et al. Corneal Ectasia after Photorefractive Keratectomy for Low Myopia. *Ophthalmology* 2006; 113: 742–746.

285. Fagerholm P, Hamberg-Nyström H, Tengroth B. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1994; 72: 229–234.

286. Wang S-L, Han J-F, He X-Y, et al. Genetic variation of human cytochrome p450 reductase as a potential biomarker for mitomycin C-induced cytotoxicity. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 176–179.

287. Cummings J, Spanswick VJ, Tomasz M, et al. Enzymology of mitomycin C metabolic activation in tumour tissue: implications for enzyme-directed bioreductive drug development. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 405–414.

288. Verweij J, Pinedo HM. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. *Anticancer Drugs* 1990; 1: 5–13.

289. Santhiago MR, Netto MV, Wilson SE. Mitomycin C: biological effects and use in refractive surgery. *Cornea* 2012; 31: 311–321.

290. Rang HP, Dale MM. *Quimioterapia anticancerígena.* Farmacología 2ª ed. Madrid: Churchill Livinstone, 1995.

291. Singh G, Wilson MR, Foster CS. Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. *Ophthalmology* 1988; 95: 813–821.

292. Frucht-Pery J, Ilsar M. The use of low-dose mitomycin C for prevention of recurrent pterygium. *Ophthalmology* 1994; 101: 759–762.

293. Rubinfeld RS, Pfister RR, Stein RM, et al. Serious complications of topical mitomycin-C after pterygium surgery. *Ophthalmology* 1992; 99: 1647–1654.

294. Fujitani A, Hayasaka S, Shibuya Y, et al. Corneoscleral ulceration and corneal perforation after pterygium excision and topical mitomycin C therapy. *Ophthalmologica* 1993; 207: 162–164.

295. Cano-Parra J, Diaz-Llopis M, Maldonado MJ, et al. Prospective trial of intraoperative mitomycin C in the treatment of primary pterygium. *Br J Ophthalmol* 1995; 79: 439–441.

296. Lam DS, Wong AK, Fan DS, et al. Intraoperative mitomycin C to prevent recurrence of pterygium after excision: a 30-month follow-up study. *Ophthalmology* 1998; 105: 901-904-905.

297. Palmer SS. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. *Ophthalmology* 1991; 98: 317–321.

298. Fontana H, Nouri-Mahdavi K, Caprioli J. Trabeculectomy with mitomycin C in pseudophakic patients with open-angle glaucoma: outcomes and risk factors for failure. *Am J Ophthalmol* 2006; 141: 652–659.

299. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, et al. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993; 111: 263–267.

300. Rubinfeld RS, Stein RM. Topical mitomycin-C for pterygia: is single application appropriate? *Ophthalmic Surg Lasers* 1997; 28: 662–669.

301. Dougherty PJ, Hardten DR, Lindstrom RL. Corneoscleral melt after pterygium surgery using a single intraoperative application of mitomycin-C. *Cornea* 1996; 15: 537–540.

302. Anand N, Arora S, Clowes M. Mitomycin C augmented glaucoma surgery: evolution of filtering bleb avascularity, transconjunctival oozing, and leaks. *British Journal of Ophthalmology* 2006; 90: 175–180.

303. Mietz H, Roters S, Krieglstein GK. Bullous keratopathy as a complication of trabeculectomy with mitomycin C. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2005; 243: 1284–1287.

304. Frucht-Pery J, Sugar J, Baum J, et al. Mitomycin C treatment for conjunctival-corneal intraepithelial neoplasia: a multicenter experience. *Ophthalmology* 1997; 104: 2085–2093.

305. Heigle TJ, Stulting RD, Palay DA. Treatment of recurrent conjunctival epithelial neoplasia with topical mitomycin C. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 397–399.

306. Wilson MW, Hungerford JL, George SM, et al. Topical mitomycin C for the treatment of conjunctival and corneal epithelial dysplasia and neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1997; 124: 303–311.

307. Rozenman Y, Frucht-Pery J. Treatment of conjunctival intraepithelial neoplasia with topical drops of mitomycin C. *Cornea* 2000; 19: 1–6.

308. Daniell M, Maini R, Tole D. Use of mitomycin C in the treatment of corneal conjunctival intraepithelial neoplasia. *Clin Experiment Ophthalmol* 2002; 30: 94–98.

309. Shields CL, Naseripour M, Shields JA. Topical mitomycin C for extensive, recurrent conjunctival-corneal squamous cell carcinoma. *Am J Ophthalmol* 2002; 133: 601–606.

310. Chalasani R, Giblin M, Conway RM. Role of topical chemotherapy for primary acquired melanosis and malignant melanoma of the conjunctiva and cornea: review of the evidence and recommendations for treatment. *Clin Experiment Ophthalmol* 2006; 34: 708–714.

311. Khong JJ, Muecke J. Complications of mitomycin C therapy in 100 eyes with ocular surface neoplasia. *British Journal of Ophthalmology* 2006; 90: 819–822.

312. Talamo JH, Gollamudi S, Green WR, et al. Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1141–1146.

313. Lee DH, Chung HS, Jeon YC, et al. Photorefractive keratectomy with intraoperative mitomycin-C application. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2005; 31: 2293–2298.

314. Bedei A, Marabotti A, Giannecchini I, et al. Photorefractive keratectomy in high myopic defects with or without intraoperative mitomycin C: 1-year results. *Eur J Ophthalmol* 2006; 16: 229–234.

315. Lacayo III GO, Majmudar PA. How and when to use mitomycin-C in refractive surgery. *Current opinion in ophthalmology* 2005; 16: 256–259.

316. Hashemi H, Taheri SMR, Fotouhi A, et al. Evaluation of the prophylactic use of mitomycin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy in high myopia: a prospective clinical study. *BMC Ophthalmol* 2004; 4: 12.

317. Thornton I, Puri A, Xu M, et al. Low-dose mitomycin C as a prophylaxis for corneal haze in myopic surface ablation. *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 673–681.

318. Shalaby A, Kaye GB, Gimbel HV. Mitomycin C in photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2009; 25: S93-97.

319. Sia RK, Ryan DS, Edwards JD, et al. The U.S. Army Surface Ablation Study: comparison of PRK, MMC-PRK, and LASEK in moderate to high myopia. *J Refract Surg* 2014; 30: 256–264.

320. Majmudar PA, Forstot SL, Dennis RF, et al. Topical mitomycin-C for subepithelial fibrosis after refractive corneal surgery. *Ophthalmology* 2000; 107: 89–94.

321. Netto MV, Mohan RR, Sinha S, et al. Effect of prophylactic and therapeutic mitomycin C on corneal apoptosis, cellular proliferation, haze, and long-term keratocyte density in rabbits. *J Refract Surg* 2006; 22: 562–574.

322. Porges Y, Ben-Haim O, Hirsh A, et al. Phototherapeutic keratectomy with mitomycin C for corneal haze following photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg* 2003; 19: 40–43.

323. Vigo L, Scandola E, Carones F. Scraping and mitomycin C to treat haze and regression after photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg* 2003; 19: 449–454.

324. Carones F, Vigo L, Carones AV, et al. Evaluation of photorefractive keratectomy retreatments after regressed myopic laser in situ keratomileusis. *Ophthalmology* 2001; 108: 1732–1737.

325. Trattler W, Salz JJ. Surface ablation over LASIK flaps. *Int Ophthalmol Clin* 2006; 46: 117–122.

326. Srinivasan S, Drake A, Herzig S. Photorefractive keratectomy with 0.02% mitomycin C for treatment of residual refractive errors after LASIK. *J Refract Surg* 2008; 24: S64-67.

327. Muller LT, Candal EM, Epstein RJ, et al. Transepithelial phototherapeutic keratectomy/photorefractive keratectomy with adjunctive mitomycin-C for complicated LASIK flaps. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31: 291–296.

328. Taneri S, Koch JM, Melki SA, et al. Mitomycin-C assisted photorefractive keratectomy in the treatment of buttonholed laser in situ keratomileusis flaps associated with epithelial ingrowth. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31: 2026–2030.

329. Lane HA, Swale JA, Majmudar PA. Prophylactic use of mitomycin-C in the management of a buttonholed LASIK flap. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29: 390–392.

330. Chalita MR, Roth AS, Krueger RR. Wavefront-guided surface ablation with prophylactic use of mitomycin C after a buttonhole laser in situ keratomileusis flap. *J Refract Surg* 2004; 20: 176–181.

331. Solomon R, Donnenfeld ED, Perry HD. Photorefractive keratectomy with mitomycin C for the management of a LASIK flap complication following a penetrating keratoplasty. *Cornea* 2004; 23: 403–405.

332. Solomon R, Donnenfeld ED, Thimons J, et al. Hyperopic photorefractive keratectomy with adjunctive topical mitomycin C for refractive error after penetrating keratoplasty for keratoconus. *Eye Contact Lens* 2004; 30: 156–158.

333. Hodge C, Sutton G, Lawless M, et al. Photorefractive keratectomy with mitomycin-C after corneal transplantation for keratoconus. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37: 1884–1894.

334. Forseto A dos S, Marques JC, Nosé W. Photorefractive keratectomy with mitomycin C after penetrating and lamellar keratoplasty. *Cornea* 2010; 29: 1103–1108.

335. Nassaralla BA, McLeod SD, Nassaralla JJ. Prophylactic mitomycin C to inhibit corneal haze after photorefractive keratectomy for residual myopia following radial keratotomy. *J Refract Surg* 2007; 23: 226–232.

336. Yee RW, Yee SB. Update on laser subepithelial keratectomy (LASEK). *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 333–341.

337. Fantes FE, Hanna KD, Waring GO, et al. Wound healing after excimer laser keratomileusis (photorefractive keratectomy) in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 665–675.

338. Stephenson CG, Gartry DS, O'Brart DP, et al. Photorefractive keratectomy. A 6-year follow-up study. *Ophthalmology* 1998; 105: 273–281.

339. Epstein D, Fagerholm P, Hamberg-Nyström H, et al. Twenty-four-month follow-up of excimer laser photorefractive keratectomy for myopia. Refractive and visual acuity results. *Ophthalmology* 1994; 101: 1558-1563-1564.

340. Lohmann CP, Timberlake GT, Fitzke FW, et al. Corneal light scattering after excimer laser photorefractive keratectomy: the objective measurements of haze. *Refract Corneal Surg* 1992; 8: 114–121.

341. Qazi MA, Johnson TW, Pepose JS. Development of late-onset subepithelial corneal haze after laser-assisted subepithelial keratectomy with prophylactic intraoperative mitomycin-C. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2006; 32: 1573–1578.

342. Lipshitz I, Loewenstein A, Varssano D, et al. Late onset corneal haze after photorefractive keratectomy for moderate and high myopia. *Ophthalmology* 1997; 104: 369-373-374.

343. Kuo IC, Lee SM, Hwang DG. Late-onset corneal haze and myopic regression after photorefractive keratectomy (PRK). *Cornea* 2004; 23: 350–355.

344. Stojanovic A, Nitter TA. Correlation between ultraviolet radiation level and the incidence of late-onset corneal haze after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27: 404–410.

345. Pineda R, Talamo JH. Late onset of haze associated with viral keratoconjunctivitis following photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1998; 14: 147–151.

346. Sharif K. Regression of myopia induced by pregnancy after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1997; 13: S445-446.

347. Cua IY, Pepose JS. Late corneal scarring after photorefractive keratectomy concurrent with development of systemic lupus erythematosus. *J Refract Surg* 2002; 18: 750–752.

348. Møller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, et al. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. *Cornea* 1998; 17: 627–639.

349. Tabbara KF, El-Sheikh HF, Sharara NA, et al. Corneal haze among blue eyes and brown eyes after photorefractive keratectomy. *Ophthalmology* 1999; 106: 2210–2215.

350. Nagy ZZ, Hiscott P, Seitz B, et al. Clinical and morphological response to UV-B irradiation after excimer laser photorefractive keratectomy. *Surv Ophthalmol* 1997; 42 Suppl 1: S64-76.

351. Shah RA, Wilson SE. Use of mitomycin-C for phototherapeutic keratectomy and photorefractive keratectomy surgery: *Current Opinion in Ophthalmology* 2010; 1.

352. Kaji Y, Amano S, Oshika T, et al. Effect of anti-inflammatory agents on corneal wound-healing process after surface excimer laser keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26: 426–431.

353. Bilgihan K, Ozdek S, Ozoğul C, et al. Topical vitamin E and hydrocortisone acetate treatment after photorefractive keratectomy. *Eye (Lond)* 2000; 14 (Pt 2): 231–237.

354. Vetrugno M, Maino A, Quaranta GM, et al. The effect of early steroid treatment after PRK on clinical and refractive outcomes. *Acta Ophthalmol Scand* 2001; 79: 23–27.

355. O'Brart DP, Lohmann CP, Klonos G, et al. The effects of topical corticosteroids and plasmin inhibitors on refractive outcome, haze, and visual performance after photorefractive keratectomy. A prospective, randomized, observer-masked study. *Ophthalmology* 1994; 101: 1565–1574.

356. Aras C, Ozdamar A, Aktunç R, et al. The effects of topical steroids on refractive outcome and corneal haze, thickness, and curvature after photorefractive keratectomy with a 6.0-mm ablation diameter. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29: 621–627.

357. Corbett MC, O'Brart DP, Marshall J. Do topical corticosteroids have a role following excimer laser photorefractive keratectomy? *J Refract Surg* 1995; 11: 380–387.

358. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2906–2914.

359. Lee HK, Kim JK, Kim SS, et al. Effect of amniotic membrane after laser-assisted subepithelial keratectomy on epithelial healing: clinical and refractive outcomes. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 334–340.

360. Vetrugno M, Maino A, Cardia G, et al. A randomised, double masked, clinical trial of high dose vitamin A and vitamin E supplementation after photorefractive keratectomy. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 537–539.

361. Stojanovic A, Ringvold A, Nitter T. Ascorbate prophylaxis for corneal haze after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2003; 19: 338–343.

362. Thom SB, Myers JS, Rapuano CJ, et al. Effect of topical anti-transforming growth factor-beta on corneal stromal haze after photorefractive keratectomy in rabbits. *J Cataract Refract Surg* 1997; 23: 1324–1330.

363. Myers JS, Gomes JA, Siepser SB, et al. Effect of transforming growth factor beta 1 on stromal haze following excimer laser photorefractive keratectomy in rabbits. *J Refract Surg* 1997; 13: 356–361.

364. Schipper I, Suppelt C, Gebbers JO. Mitomycin C reduces scar formation after excimer laser (193 nm) photorefractive keratectomy in rabbits. *Eye (Lond)* 1997; 11 (Pt 5): 649–655.

365. Teus MA, de Benito-Llopis L, Alió JL. Mitomycin C in corneal refractive surgery. *Surv Ophthalmol* 2009; 54: 487–502.

366. Song J-S, Kim J-H, Yang M, et al. Mitomycin-C concentration in cornea and aqueous humor and apoptosis in the stroma after topical mitomycin-C application: effects of mitomycin-C application time and concentration. *Cornea* 2007; 26: 461–467.

367. Lai Y-H, Wang H-Z, Lin C-P, et al. Mitomycin C alters corneal stromal wound healing and corneal haze in rabbits after argon-fluoride excimer laser photorefractive keratectomy. *J Ocul Pharmacol Ther* 2004; 20: 129–138.

368. Kim T, Tchah H, Lee S, et al. Apoptosis in keratocytes caused by mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 1912–1917.

369. Kim T-I, Pak JH, Lee SY, et al. Mitomycin C-induced reduction of keratocytes and fibroblasts after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2978–2984.

370. Kim T, Lee SY, Pak JH, et al. Mitomycin C, ceramide, and 5-fluorouracil inhibit corneal haze and apoptosis after PRK. *Cornea* 2006; 25: 55–60.

371. Xu H, Liu S, Xia X, et al. Mitomycin C reduces haze formation in rabbits after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2001; 17: 342–349.

372. Rajan MS, O'Brart DPS, Patmore A, et al. Cellular effects of mitomycin-C on human corneas after photorefractive keratectomy. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2006; 32: 1741–1747.

373. Rockwell S, Kim SY. Cytotoxic potential of monoalkylation products between mitomycins and DNA: studies of decarbamoyl mitomycin C in wild-type and repair-deficient cell lines. *Oncol Res* 1995; 7: 39–47.

374. Netto MV, Chalita MR, Krueger RR. Corneal haze following PRK with mitomycin C as a retreatment versus prophylactic use in the contralateral eye. *J Refract Surg* 2007; 23: 96–98.

375. Maldonado MJ. Intraoperative MMC after excimer laser surgery for myopia. *Ophthalmology* 2002; 109: 826; author reply 826-828.

376. Sadeghi HM, Seitz B, Hayashi S, et al. In vitro effects of mitomycin-C on human keratocytes. *J Refract Surg* 1998; 14: 534–540.

377. Mladenov E, Tsaneva I, Anachkova B. Activation of the S phase DNA damage checkpoint by mitomycin C. *J Cell Physiol* 2007; 211: 468–476.

378. Chou S-F, Chang S-W, Chuang J-L. Mitomycin C upregulates IL-8 and MCP-1 chemokine expression via mitogen-activated protein kinases in corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2009–2016.

379. Seong GJ, Park C, Kim CY, et al. Mitomycin-C induces the apoptosis of human Tenon's capsule fibroblast by activation of c-Jun N-terminal kinase 1 and caspase-3 protease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 3545–3552.

380. Crowston JG, Chang LH, Constable PH, et al. Apoptosis gene expression and death receptor signaling in mitomycin-C-treated human tenon capsule fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 692–699.

381. Goeptar AR, Groot EJ, Scheerens H, et al. Cytotoxicity of mitomycin C and adriamycin in freshly isolated rat hepatocytes: the role of cytochrome P450. *Cancer Res* 1994; 54: 2411–2418.

382. Daniels JT, Occleston NL, Crowston JG, et al. Effects of antimetabolite induced cellular growth arrest on fibroblast-fibroblast interactions. *Exp Eye Res* 1999; 69: 117–127.

383. Camellin M. Laser epithelial keratomileusis with mitomycin C: indications and limits. *Journal of Refractive Surgery* 2004; 20: S693–S698.

384. Virasch VV, Majmudar PA, Epstein RJ, et al. Reduced application time for prophylactic mitomycin C in photorefractive keratectomy. *Ophthalmology* 2010; 117: 885–889.

385. Shojaei A, Ramezanzadeh M, Soleyman-Jahi S, et al. Short-time mitomycin-C application during photorefractive keratectomy in patients with low myopia. *J Cataract Refract Surg* 2013; 39: 197–203.

386. Thornton I, Xu M, Krueger RR. Comparison of standard (0.02%) and low dose (0.002%) mitomycin C in the prevention of corneal haze following surface ablation for myopia. *J Refract Surg* 2008; 24: S68-76.

387. Hofmeister EM, Bishop FM, Kaupp SE, et al. Randomized dose-response analysis of mitomycin-C to prevent haze after photorefractive keratectomy for high myopia. *J Cataract Refract Surg* 2013; 39: 1358–1365.

388. Razmjoo H, Kooshanmehr MR, Peyman A, et al. Comparison of standard and low dose intraoperative mitomycin C in prevention of corneal haze after photorefractive keratectomy. *Int J Prev Med* 2013; 4: 204–207.

389. Shi J, Yuan Y, Zhao S, et al. Effects of differenta mitomycin C concentrations on laser-assisted subepithelial keratectomy. *Exp Ther Med* 2014; 7: 1591–1594.

390. Majmudar PA, Schallhorn SC, Cason JB, et al. Mitomycin-C in Corneal Surface Excimer Laser Ablation Techniques. *Ophthalmology* 2015; 122: 1085–1095.

391. Song J-S, Kim J-H, Yang M, et al. Concentrations of mitomycin C in rabbit corneal tissue and aqueous humor after topical administration. *Cornea* 2006; 25: S20-23.

392. Mirza MA, Qazi MA, Pepose JS. Treatment of dense subepithelial corneal haze after laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 709–714.

393. Smith S, D'Amore PA, Dreyer EB. Comparative toxicity of mitomycin C and 5-fluorouracil in vitro. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 332–337.

394. Wu KY, Hong SJ, Huang HT, et al. Toxic effects of mitomycin-C on cultured corneal keratocytes and endothelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 1999; 15: 401–411.

395. Chang S-W. Early corneal edema following topical application of mitomycin-C. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 1742–1750.

396. Kymionis GD, Tsiklis NS, Ginis H, et al. Dry eye after photorefractive keratectomy with adjuvant mitomycin C. *J Refract Surg* 2006; 22: 511–513.

397. Patel SV, Erie JC, McLaren JW, et al. Confocal microscopy changes in epithelial and stromal thickness up to 7 years after LASIK and photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg* 2007; 23: 385–392.

398. Gauthier CA, Holden BA, Epstein D, et al. Factors affecting epithelial hyperplasia after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 1997; 23: 1042–1050.

399. Hamberg-Nyström H, Gauthier CA, Holden BA, et al. A comparative study of epithelial hyperplasia after PRK: Summit versus VISX in the same patient. *Acta Ophthalmol Scand* 1996; 74: 228–231.

400. Erie JC. Corneal wound healing after photorefractive keratectomy: a 3-year confocal microscopy study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003; 101: 293–333.

401. Ivarsen A, Fledelius W, Hjortdal JØ. Three-year changes in epithelial and stromal thickness after PRK or LASIK for high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 2061–2066.

402. Kozak I, Hornak M, Juhas T, et al. Changes in central corneal thickness after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2003; 19: 149–153.

403. Lohmann CP, Patmore A, Reischl U, et al. The importance of the corneal epithelium in excimer-laser photorefractive keratectomy. *Ger J Ophthalmol* 1996; 5: 368–372.

404. Beuerman RW, McDonald MB, Shofner RS, et al. Quantitative histological studies of primate corneas after excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 1103–1110.

405. Chen W-L, Chang H-W, Hu F-R. In vivo confocal microscopic evaluation of corneal wound healing after epi-LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 2416–2423.

406. Kaluzny BJ, Szkulmowski M, Bukowska DM, et al. Spectral OCT with speckle contrast reduction for evaluation of the healing process after PRK and transepithelial PRK. *Biomedical Optics Express* 2014; 5: 1089.

407. Chang S-W. Corneal keratocyte apoptosis following topical intraoperative mitomycin C in rabbits. *J Refract Surg* 2005; 21: 446–453.

408. Jester JV, Nien CJ, Vasiliou V, et al. Quiescent keratocytes fail to repair MMC induced DNA damage leading to the long-term inhibition of myofibroblast differentiation and wound healing. *Molecular vision*; 18https://escholarship.org/uc/item/0rr3b4j8.pdf (2012, accessed 3 May 2016).

409. Laing RA, Neubauer L, Oak SS, et al. Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium. *Ophthalmology* 1984; 91: 1129–1134.

410. Joyce NC, Navon SE, Roy S, et al. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Investigative ophthalmology & visual science* 1996; 37: 1566–1575.

411. Torres RM, Merayo-Lloves J, Daya SM, et al. Presence of mitomycin-C in the anterior chamber after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32: 67–71.

412. Nuyts RM, Pels E, Greve EL. The effects of 5-fluorouracil and mitomycin C on the corneal endothelium. *Curr Eye Res* 1992; 11: 565–570.

413. Hernández-Galilea E, Sánchez F, Guzmán K, et al. [Effect of mitomycin C on corneal endothelium cells. In vitro study]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000; 75: 515–521.

414. McDermott ML, Wang J, Shin DH. Mitomycin and the human corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 533–537.

415. Garweg JG, Wegmann-Burns M, Goldblum D. Effects of daunorubicin, mitomycin C, azathioprine and cyclosporin A on human retinal pigmented epithelial, corneal endothelial and conjunctival cell lines. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244: 382–389.

416. Roh DS, Cook AL, Rhee SS, et al. DNA cross-linking, double-strand breaks, and apoptosis in corneal endothelial cells after a single exposure to mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 4837–4843.

417. Roh DS, Funderburgh JL. Impact on the corneal endothelium of mitomycin C during photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2009; 25: 894–897.

418. Morales AJ, Zadok D, Mora-Retana R, et al. Intraoperative mitomycin and corneal endothelium after photorefractive keratectomy. *Am J Ophthalmol* 2006; 142: 400–404.

419. Nassiri N, Farahangiz S, Rahnavardi M, et al. Corneal endothelial cell injury induced by mitomycin-C in photorefractive keratectomy: Nonrandomized controlled trial. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2008; 34: 902–908.

420. Diakonis VF, Pallikaris A, Kymionis GD, et al. Alterations in Endothelial Cell Density After Photorefractive Keratectomy With Adjuvant Mitomycin. *American Journal of Ophthalmology* 2007; 144: 99–103.e1.

421. Goldsberry DH, Epstein RJ, Majmudar PA, et al. Effect of mitomycin C on the corneal endothelium when used for corneal subepithelial haze prophylaxis following photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2007; 23: 724–727.

422. Leccisotti A. Mitomycin C in photorefractive keratectomy: effect on epithelialization and predictability. *Cornea* 2008; 27: 288–291.

423. Wallau AD, Campos M. Photorefractive keratectomy with mitomycin C versus LASIK in custom surgeries for myopia: a bilateral prospective randomized clinical trial. *J Refract Surg* 2008; 24: 326–336.

424. Zhao L-Q, Wei R-L, Ma X-Y, et al. Effect of intraoperative mitomycin-C on healthy corneal endothelium after laser-assisted subepithelial keratectomy. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* 2008; 34: 1715–1719.

425. Pfister RR. Permanent corneal edema resulting from the treatment of PTK corneal haze with mitomycin: a case report. *Cornea* 2004; 23: 744–747.

426. Azar DT. Laser Assisted subepithelial Keratomileusis (LASEK). In: *Cornea*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005, pp. 1873–92.

427. McLaren JW, Nau CB, Kitzmann AS, et al. Keratocyte density: comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens* 2005; 31: 28–33.

428. Diakonis VF, Kankariya VP, Kounis G, et al. Contralateral-eye study of surface refractive treatments: clinical and confocal microscopy evaluation. *J Cataract Refract Surg* 2014; 40: 224–231.

429. Blanco-Mezquita T, Espandar L, Torres R, et al. Does Mitomycin C Cause Toxicity in the Cornea After Photorefractive Keratectomy? A Comparative Wound-Healing Study in a Refractive Surgery Animal Model. *Cornea* 2014; 33: 1225–1231.

430. Kremer I, Ehrenberg M, Levinger S. Delayed epithelial healing following photorefractive keratectomy with mitomycin C treatment. *Acta Ophthalmol* 2012; 90: 271–276.

431. Eliaçik M, Bayramlar H, Erdur S, et al. Anterior segment optical coherence tomography evaluation of corneal epithelium healing time after 2 different surface ablation methods. *Saudi Medical Journal* 2015; 36: 67–72.

432. Li H, Leung CKS, Wong L, et al. Comparative Study of Central Corneal Thickness Measurement with Slit-Lamp Optical Coherence Tomography and Visante Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* 2008; 115: 796–801.e2.

433. Hong JP, Nam SM, Kim T-I, et al. Reliability of RTVue, Visante, and Slit-Lamp Adapted Ultrasonic Pachymetry for Central Corneal Thickness Measurement. *Yonsei Medical Journal* 2012; 53: 634.

434. Antonios R, Fattah MA, Maalouf F, et al. Central Corneal Thickness After Cross-linking Using High-Definition Optical Coherence Tomography, Ultrasound, and Dual Scheimpflug Tomography: A Comparative Study Over One Year. *Am J Ophthalmol* 2016; 167: 38–47.

435. Randleman JB, Lynn MJ, Perez-Straziota CE, et al. Comparison of central and peripheral corneal thickness measurements with scanning-slit, Scheimpflug and Fourier-domain ocular coherence tomography. *British Journal of Ophthalmology* 2015; 99: 1176–1181.

436. Northey LC, Gifford P, Boneham GC. Comparison of Topcon optical coherence tomography and ultrasound pachymetry. *Optometry & Vision Science* 2012; 89: 1708–1714.

437. Sun L, Song Y, Zhang R, et al. Comparison of intraoperative ultrasound pachymetry and postoperative optical coherence tomography of anterior segment in the measurement of flap thickness in eyes receiving laser in situ keratomileusis. *Eye Sci* 2012; 27: 60–63.

438. Lohmann CP, Güell JL. Regression after LASIK for the treatment of myopia: the role of the corneal epithelium. *Semin Ophthalmol* 1998; 13: 79–82.

439. Vogt A. *Textbook and Atlas of Slit Lamp Microscopy of the Living Eye: Principles and methods cornea and anterior chamber*. Wayenborgh, 1930.

440. Dillon EC, Eagle RC, Laibson PR. Compensatory epithelial hyperplasia in human corneal disease. *Ophthalmic Surg* 1992; 23: 729–732.

441. Dierick HG, Missotten L. Is the corneal contour influenced by a tension in the superficial epithelial cells? A new hypothesis. *Refract Corneal Surg* 1992; 8: 54–59; discussion 60.

442. Einollahi B, Baradaran-Rafii A, Rezaei-Kanavi M, et al. Mechanical Versus Alcohol-assisted Epithelial Debridement During Photorefractive Keratectomy: A Confocal Microscopic Clinical Trial. *Journal of Refractive Surgery* 2011; 27: 887–893.

443. Ghirlando A, Gambato C, Midena E. LASEK and photorefractive keratectomy for myopia: clinical and confocal microscopy comparison. *J Refract Surg* 2007; 23: 694–702.

444. Gambato C, Miotto S, Cortese M, et al. Mitomycin C-assisted photorefractive keratectomy in high myopia: a long-term safety study. *Cornea* 2011; 30: 641–645.

445. Nassiri N, Sheibani K, Safi S, et al. Alcohol-assisted debridement in PRK with intraoperative mitomycin C. *Optom Vis Sci* 2014; 91: 1084–1088.

446. Güell JL, Lohmann CP, Malecaze FA, et al. Intraepithelial photorefractive keratectomy for regression after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 1999; 25: 670–674.

447. Wang J, Abou Shousha M, Perez VL, et al. Ultra-high resolution optical coherence tomography for imaging the anterior segment of the eye. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2011; 42 Suppl: S15-27.

448. Spadea L, Fasciani R, Necozione S, et al. Role of the corneal epithelium in refractive changes following laser in situ keratomileusis for high myopia. *J Refract Surg* 2000; 16: 133–139.

449. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, et al. Effect of myopic laser in situ keratomileusis on epithelial and stromal thickness: a confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2002; 109: 1447–1452.

450. Amoozadeh J, Aliakbari S, Behesht-Nejad A-H, et al. Confocal microscopy of corneal stroma and endothelium after LASIK and PRK. *J Refract Surg* 2009; 25: S963-967.

451. Midena E, Gambato C, Miotto S, et al. Long-term effects on corneal keratocytes of mitomycin C during photorefractive keratectomy: a randomized contralateral eye confocal microscopy study. *J Refract Surg* 2007; 23: S1011-1014.

452. Perez-Gomez I, Efron N. Change to corneal morphology after refractive surgery (myopic laser in situ keratomileusis) as viewed with a confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2003; 80: 690–697.

453. Lee SJ, Kim JK, Seo KY, et al. Comparison of Corneal Nerve Regeneration and Sensitivity Between LASIK and Laser Epithelial Keratomileusis (LASEK). *American Journal of Ophthalmology* 2006; 141: 1009–1015.e1.

454. Watsky MA. Keratocyte gap junctional communication in normal and wounded rabbit corneas and human corneas. *Investigative ophthalmology & visual science* 1995; 36: 2568–2576.

455. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 2557–2567.

456. Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Confocal imaging of the human keratocyte network using the vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate. *Clin Experiment Ophthalmol* 2003; 31: 147–154.

457. Ebihara N, Yamagami S, Yokoo S, et al. Involvement of C-C chemokine ligand 2-CCR2 interaction in monocyte-lineage cell recruitment of normal human corneal stroma. *J Immunol* 2007; 178: 3288–3292.

458. Shimmura S, Kawakita T. Accessory cell populations in the cornea. *Ocul Surf* 2006; 4: 74–80.

459. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006; 38: 1625–1631.

460. Sosnová M, Bradl M, Forrester JV. CD34+ corneal stromal cells are bone marrow-derived and express hemopoietic stem cell markers. *Stem Cells* 2005; 23: 507–515.

461. Wilson SE, Mohan RR, Netto M, et al. RANK, RANKL, OPG, and M-CSF expression in stromal cells during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2201–2211.

462. Hori J, Streilein JW. Dynamics of donor cell persistence and recipient cell replacement in orthotopic corneal allografts in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1820–1828.

463. Zhivov A, Stachs O, Stave J, et al. In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of corneal surface and epithelium. *British Journal of Ophthalmology* 2009; 93: 667–672.

464. McLaren JW, Patel SV, Nau CB, et al. Automated assessment of keratocyte density in clinical confocal microscopy of the corneal stroma. *J Microsc* 2008; 229: 21–31.

465. Pérez-Santonja JJ, Sahla HF, Alió JL. Evaluation of endothelial cell changes 1 year after excimer laser in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 841–846.

466. Wiffen SJ, Hodge DO, Bourne WM. The effect of contact lens wear on the central and peripheral corneal endothelium. *Cornea* 2000; 19: 47–51.

467. Isager P, Hjortdal JO, Ehlers N. Magnification changes in specular microscopy after corneal refractive surgery. *Acta Ophthalmol Scand* 1999; 77: 391–393.

468. Zare M, Jafarinasab M-R, Feizi S, et al. The effect of mitomycin-C on corneal endothelial cells after photorefractive keratectomy. *J Ophthalmic Vis Res* 2011; 6: 8–12.

469. Kymionis GD, Diakonis VF, Panagopoulou SI, et al. Mitomycin C aqueous humor concentration after photorefractive keratectomy: an experimental study. *Eur J Ophthalmol* 2009; 19: 738–742.

470. Wilson SE. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency. *Exp Eye Res* 2012; 99: 78–88.