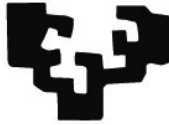


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DE UN PROTOTOTIPO DE HIDROGEL
DE POLIETILENGLICOL DIACRILATO (PEGDA) PARA SU USO COMO
IMPLANTE INTRAESTROMAL CORNEAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL

Aritz Bidaguren Urbieta

Donostia-San Sebastián, 2017

Trabajo de investigación financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia.
(Expediente: MEC06/13708)

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral es el resultado de un proyecto iniciado hace ya varios años, a lo largo de los cuales han sido muchas las personas que me han ofrecido su ayuda, han colaborado desinteresadamente y a las que agradezco enormemente su apoyo y confianza durante este largo camino.

De entre todas las personas a las que quisiera agradecer su ayuda para la finalización de este trabajo, mi primer agradecimiento es para Javier Mendicute. Él fue quien me introdujo en este proyecto cuando aún era residente y me ofreció la oportunidad de participar en un proyecto de investigación cuando apenas sabía nada sobre la oftalmología. Además de director de esta tesis y un referente profesional, no puedo dejar de agradecer todo lo que de él he aprendido y las muchas oportunidades que me ha brindado. Gracias Javier.

A Juan Durán, codirector de esta tesis, por sus sugerencias y sus buenos consejos en lo relacionado con esta tesis.

Agradezco también a Nerea Garagorri e Iratxe Madarieta, de la fundación Inasmet (Tecnalia), con quienes compartimos numerosas horas planificando las diferentes fases del proyecto, su ayuda en todo lo relacionado con el desarrollo de los implantes. Muchas gracias a las dos.

A todas las personas de la unidad experimental del Hospital Donostia. A Ana Belén Asensio por su ayuda con las múltiples gestiones realizadas en las fases iniciales del proyecto y por explicarme los vericuetos de la burocracia asociada a la investigación. A Iñaki, M^a Asun y Eli por su colaboración durante las innumerables horas de trabajo en la unidad experimental, que casi se convirtió en mi segunda casa.

Me gustaría también agradecer a todos mis compañeros del servicio de oftalmología del Hospital Donostia. De todos ellos he recibido apoyo y he aprendido a lo largo de todos estos años. Quiero acordarme de forma especial de aquellos con quienes compartí mi residencia y tantos momentos en esa época tan bonita e importante de mi vida.

Quisiera acordarme, también, de Cristina Sarasqueta, del departamento de epidemiología del Instituto Bionostia, por su ayuda con el análisis estadístico de los datos y su gran

accesibilidad y de Irune Ruiz, del departamento de anatomía patológica del HUD, por su ayuda con la interpretación de la histología.

Un agradecimiento especial a mis padres por todo su apoyo y por los sacrificios realizados durante estos años que nunca podré agradecerles lo suficiente. A mi aita, por su ejemplo de integridad y a mi ama, por hacer que tantas cosas fueran posibles. Todo esto no hubiera sido posible sin ellos y es a quienes me gustaría dedicar esta tesis.

No puedo olvidarme de mis hermanas Ainhoa y Miren, y de Jose, por su apoyo y amistad incondicional. Gracias por todos los momentos que compartimos, por las conversaciones, discusiones y desacuerdos (radicales) y por ser un ejemplo del que aprendo todos los días.

Mi último y el mayor de mis agradecimientos es para ti, Marta. Además de editora, revisora de estilo y secretaria de esta tesis que también es, en parte, tuya, no puedo más que agradecerte tu apoyo y la fuerza para ayudarme a seguir en los momentos difíciles. Gracias por escucharme, por tu alegría, por hacerme reír, por la ilusión y el entusiasmo en todo lo que haces, por ser como eres y sobre todo, por compartirlo conmigo.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. LA CÓRNEA	3
1.1. Anatomía de la córnea	3
1.1.1. Estratos corneales	4
1.1.1.1. Epitelio	4
1.1.1.2. Membrana de Bowman	5
1.1.1.3. Estroma	5
1.1.1.4. Capa de Dua	7
1.1.1.5. Membrana de Descemet	7
1.1.1.6. Endotelio	8
1.2. Nutrición y metabolismo de la córnea.....	9
1.3. Inervación corneal	9
2. EL OJO DE CONEJO	10
2.1. Anatomía del globo ocular en el conejo	10
2.2. Histología de la córnea de conejo	11
2.3. El conejo como modelo experimental	12
3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS CORNEALES	12
3.1. Biomicroscopía con lámpara de hendidura	13
3.2. Paquimetría corneal	13
3.2.1. Paquimetría óptica	13
3.2.2. Paquimetría ultrasónica	14
3.2.3. Otras tecnologías de no contacto	14
3.2.4. Paquimetría por microscopía confocal	14
3.3. Microscopía Confocal	15
3.3.1. Historia	15
3.3.2. Principios de la microscopía confocal	16
3.3.3. Modelos de microscopio confocal	16
3.3.3.1. <i>Tandem Scanning Confocal Microscope</i> (TSCM)	17
3.3.3.2. <i>Slit Scanning Confocal Microscope</i> (SSCM)	17
3.3.3.3. <i>Laser Scanning Confocal Microscope</i> (LSCM)	17
3.3.4. Imagen corneal normal	18
3.3.4.1. Epitelio	18
3.3.4.2. Membrana de Bowman	19
3.3.4.3. Estroma	19
3.3.4.4. Membrana de Descemet	20
3.3.4.5. Endotelio	20
3.3.5. Capacidades del microscopio confocal	21
3.3.5.1. Cualitativas	21
3.3.5.2. Cuantitativas	21

3.3.5.2.1. Grosor corneal	21
3.3.5.2.2. Densidad de queratocitos	22
3.3.5.2.3. Densidad de células endoteliales	22
3.3.5.2.4. Densidad del plexo nervioso.....	24
3.3.6. Aplicaciones clínicas de la microscopía confocal in vivo	24
3.4. Estudio de la expresión de proteínas de matriz extracelular por RT-PCR.....	25
4. CIRUGÍA REFRACTIVA CORNEAL	25
4.1. Técnicas de cirugía incisional.....	25
4.2. Técnicas substractivas corneales.....	26
4.2.1. Fotoablación.....	26
4.3. Técnicas aditivas corneales.....	28
4.3.1. Inicios de la cirugía aditiva corneal.....	28
4.3.2. Implantes corneales homoplásticos: queratofaquia.....	29
4.3.3. Implantes corneales aloplásticos.....	30
4.3.3.1. Materiales impermeables.....	30
4.3.3.2. Hidrogeles.....	31
4.3.4. Actualidad de los implantes intraestromales.....	36
4.3.4.1. Implantes con efecto estenopeico.....	36
4.3.4.2. Implantes refractivos.....	37
4.3.4.3. Implantes que modifican la morfología corneal.....	37
5. TÉCNICAS SUSTITUTIVAS CORNEALES: QUERATOPRÓTESIS Y CÓRNEA ARTIFICIAL.....	38
II. OBJETIVOS.....	41
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	47
1.1. Bases y planteamiento general.....	47
1.2. Grupos.....	47
1.3. Codificación.....	48
1.3.1. En función del grupo al que pertenecen.....	48
1.3.2. En función del momento posoperatorio.....	48
1.4. Calendario.....	49
2. DESARROLLO DE MATERIALES: IMPLANTES INTRAESTROMALES.....	50
2.1. Síntesis del hidrogel de polietilenglicol diacrilato (PEGDA).....	50
2.2. Estudio <i>in vitro</i> de las características del hidrogel de PEGDA.....	51
2.2.1. Estudio de las propiedades ópticas del hidrogel.....	51
2.2.2. Estudio de la absorción del hidrogel.....	51
2.2.3. Estudio de la permeabilidad a la glucosa del hidrogel	52
2.3. Desarrollo de materiales: LIE con microesferas de PLGA-Dexametasona.....	53
2.3.1. Síntesis de microesferas de PLGA.....	53
2.3.2. Caracterización morfológica de las microesferas <i>in vitro</i>	54
2.3.3. Encapsulación de microesferas.....	54
2.4. Fabricación de los implantes.....	55

2.4.1.	Grupo lente intraestromal	55
2.4.2.	Grupo lente intraestromal con microesferas de PLGA-Dexametasona.....	55
2.5.	Esterilidad de los implantes	55
3.	EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	56
3.1.	El modelo animal	56
3.2.	Estabulación/Alimentación	56
4.	ANESTESIA	56
5.	PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	57
5.1.	Técnica quirúrgica.....	57
5.2.	Secuencia quirúrgica.....	57
5.3.	Variables e incidencias quirúrgicas	59
6.	SEGUIMIENTO	59
6.1.	Calendario de seguimiento.....	59
6.2.	Tratamiento	59
6.3.	Sacrificios	60
7.	VALORACIÓN/ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	60
7.1.	Recogida de datos	60
7.2.	Estado de los conejos y peso	60
7.3.	Exploración biomicroscópica (variables clínicas)	61
7.3.1.	Estudio biomicroscópico corneal	61
7.3.1.1.	Estroma.....	61
7.3.1.2.	Entrecara.....	62
7.3.1.3.	Conjuntiva.....	62
7.3.1.4.	Análisis global de los marcadores de inflamación.....	63
7.3.2.	Estudio de las características y del comportamiento de las LIE.....	63
7.3.2.1.	Transparencia del implante.....	63
7.3.2.2.	Descentramiento e desplazamiento del implante.....	63
7.3.2.3.	Deterioro del implante.....	64
7.3.2.4.	Depósitos.....	64
7.3.2.5.	Migración anterior y extrusión de los implante.....	64
7.4.	Fotografía.....	64
7.5.	Paquimetría.....	67
7.6.	Microscopía confocal <i>in vivo</i> (MCIV)	67
7.6.1.	El microscopio confocal.....	67
7.6.2.	Calendario de realización de la MCIV.....	68
7.6.3.	Procedimiento.....	68
7.6.4.	Análisis y procesamiento de las imágenes.....	69
7.6.4.1.	Endotelio. Análisis cualitativo y estudio de la densidad celular endotelial.....	70
7.6.4.2.	Estroma corneal. Análisis cualitativo y de la densidad de queratocitos.....	71
7.6.4.3.	Análisis de la interfase.....	72
7.6.4.4.	Paquimetría por MCVI.....	73

7.6.4.5. Grosor del implante intraestromal.....	73
7.6.4.6. Marcadores de inflamación.....	73
7.6.4.7. Análisis morfológico y descriptivo del epitelio.....	73
8. ANÁLISIS DE LAS CÓRNEAS POST MORTEM.....	74
8.1. Procesamiento de las córneas tras el sacrificio.....	74
8.2. Estudio histológico.....	74
8.2.1. Procesamiento de las muestras.....	74
8.2.2. Análisis de las muestras.....	75
8.3. Estudio de la expresión de proteínas de matriz extracelular por RT-qPCR.....	75
8.3.1. Procesamiento de las muestras.....	75
8.3.2. RT-PCR cuantitativa.....	75
8.3.3. Pasos del análisis de expresión genética.....	76
9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	76
IV. RESULTADOS.....	79
1. DESARROLLO DE LENTES INTRAESTROMALES.....	81
1.1. Características del hidrogel.....	81
1.1.1. Propiedades ópticas.....	81
1.1.2. Coeficiente de difusión de la permeabilidad de la glucosa (D).....	82
1.2. Tamaño y forma de los implantes.....	82
1.3. LIE con microesferas de PLGA-Dexametasona.....	82
2. CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN Y DEL PESO.....	84
3. TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	85
3.1. Medidas intraoperatorias.	85
3.1.1. Medida de los tiempos quirúrgicos.....	85
3.1.2. Longitud de la incisión.....	86
3.1.3. Diámetro del bolsillo estromal.....	86
3.1.4. Profundidad del bolsillo estromal.....	87
4. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICOS BIOMICROSCÓPICOS.....	87
4.1. Estudio biomicroscópico.....	88
4.1.1. Conjuntiva.....	88
4.1.1.1. Hiperemia conjuntival.....	88
4.1.1.2. Secreción conjuntival.....	89
4.1.2. Estroma.....	90
4.1.2.1. Edema corneal.....	90
4.1.2.2. Neovascularización corneal.....	91
4.1.2.3. Infiltración corneal.....	93
4.1.2.4. Úlcera y adelgazamiento corneal.....	93
4.1.2.5. Necrosis y lisis estromal.....	94
4.1.3. Entrecara.....	94
4.1.4. Análisis global de marcadores de inflamación.....	94
4.2. Estudio de las características y del comportamiento de las lentes intraestromales.....	95

4.2.1.	Transparencia del implante.....	95
4.2.2.	Descentramiento y desplazamiento del implante.....	96
4.2.3.	Deterioro e irregularidad de los implantes.....	99
4.2.4.	Depósitos.....	100
4.2.5.	Migración anterior y extrusión de los implantes.....	100
5.	PAQUIMETRÍA.....	100
5.1.	Paquimetría ultrasónica.....	100
5.2.	Paquimetría medida por MCIV.....	102
5.3.	Comparación de la paquimetría medida por ultrasonidos y MCIV.....	104
6.	MICROSCOPIA CONFOCAL <i>IN VIVO</i>.....	107
6.1.	Epitelio.....	107
6.2.	Endotelio.....	108
6.2.1.	Densidad de células endoteliales.....	109
6.2.2.	Área celular endotelial.....	110
6.2.3.	Coeficiente de variación del tamaño celular.....	110
6.2.4.	Número de lados de las células endoteliales.....	111
6.2.5.	Hexagonalidad.....	111
6.3.	Estroma.....	113
6.3.1.	Morfología.....	113
6.3.2.	Densidad de queratocitos.....	113
6.3.2.1.	Densidad de queratocitos en el estroma anterior.....	113
6.3.2.2.	Densidad de queratocitos en el estroma posterior.....	114
6.3.3.	Nervios estromales.....	116
6.4.	Interfase.....	117
6.4.1.	Reflectividad de la interfase.....	117
6.4.2.	Características morfológicas de la interfase.....	118
6.4.3.	Partículas hiperreflectivas en la interfase.....	125
6.5.	Grosor de los implantes.....	126
6.6.	Paquimetría por MCIV.....	126
7.	ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	127
7.1.	Epitelio.....	127
7.1.1.	Epitelio grupo 1.....	127
7.1.2.	Epitelio grupo 2.....	128
7.1.3.	Epitelio grupos 3, 4 y 5.....	128
7.2.	Endotelio y membrana de Descemet.....	129
7.3.	Estroma.....	130
7.3.1.	Estroma grupo 1.....	130
7.3.2.	Estroma grupo 2.....	130
7.3.3.	Estroma grupos 3, 4 y 5.....	133
7.4.	Implante intraestromal.....	136
7.5.	Casos de neovascularización e infiltración estromal.....	137
8.	EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEC POR RT-qPCR.....	142

8.1.	Expresión de colágeno-1A.....	143
8.2.	Expresión de MMP-1.....	143
8.3.	Expresión de Queratocán.....	144
V.	DISCUSIÓN.....	145
1.	DESARROLLO DE LENTES INTRAESTROMALES.....	147
1.1.	Material.....	147
1.1.1.	Hidrogeles.....	147
1.1.2.	Método de entrecruzamiento del hidrogel: fotopolimerización.....	147
1.1.3.	El hidrogel de PEGDA.....	148
1.1.3.1.	Propiedades ópticas.....	148
1.1.3.2.	Permeabilidad a la glucosa.....	149
1.1.3.3.	Las dimensiones del implante de PEGDA.....	149
1.2.	Microesferas de PLGA-Dexametasona.....	150
2.	DISCUSIÓN DE LOS ENSAYOS <i>IN VIVO</i>.....	153
2.1.	El modelo experimental: elección del modelo animal.....	153
2.2.	Anestesia.....	154
2.3.	Procedimiento quirúrgico.....	154
2.3.1.	Elección de la técnica quirúrgica.....	154
2.3.2.	Profundidad de la implantación.....	155
2.4.	Pauta terapéutica postoperatoria.....	156
2.5.	Seguimiento y sacrificios.....	157
3.	DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN.....	158
3.1.	Evaluación clínica biomicroscópica.....	158
3.2.	Paquimetría.....	158
3.3.	Microscopía confocal <i>in vivo</i>	159
3.3.1.	El modelo de microscopio confocal.....	159
3.3.2.	Metodología de trabajo empleada.....	159
3.3.2.1.	Mediciones por MCIV.....	159
3.3.2.2.	Valoración de las imágenes para el análisis cualitativo y cuantitativo.....	159
3.3.2.2.1.	Estudio de las células endoteliales.....	159
3.3.2.2.2.	Estudio de los queratocitos.....	160
3.3.2.2.3.	Análisis de la interfase.....	160
3.4.	Histología.....	161
3.5.	RT-qPCR.....	161
4.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	163
4.1.	Seguimiento y evolución del peso de los conejos.....	163
4.2.	Estudio biomicroscópico/clínico.....	163
4.2.1.	Variables quirúrgicas.....	163
4.2.2.	Variables clínicas.....	164
4.2.2.1.	Hiperemia y secreción conjuntival	164

4.2.2.2. Edema corneal.....	165
4.2.2.3. Neovascularización corneal.....	166
4.2.2.4. Infiltración corneal	168
4.2.2.5. Úlcera corneal, lisis estromal y perforación	169
4.2.2.6. <i>Haze</i> /opacidad de la interfase.....	169
4.2.3. Estado de los implantes intraestromales.....	169
4.2.3.1. Transparencia	169
4.2.3.2. Deterioro e irregularidad de los implantes.....	169
4.2.3.3. Depósitos	170
4.2.3.4. Centrado de los implantes.....	170
4.2.3.5. Desplazamiento de los implantes (migración).....	171
4.2.3.6. Migración anterior y extrusión de los implantes.....	172
4.2.4. Análisis global de las variables clínicas y del estado de los implantes.....	173
4.3. Paquimetría.....	174
4.3.1. Paquimetría ultrasónica.....	174
4.3.2. Paquimetría por MCIV.....	175
4.3.3. Comparación de la paquimetría medida por ultrasonidos y MCIV.....	176
4.4. Microscopia confocal <i>in vivo</i>	178
4.4.1. Epitelio.....	178
4.4.2. Endotelio.....	179
4.4.3. Estroma.....	180
4.4.3.1. Densidad de queratocitos.....	181
4.4.3.2. Queratocitos activados.....	182
4.4.3.3. Estudio de la interfase.....	183
4.4.3.3.1. Reflectividad de la interfase.....	183
4.4.3.3.2. Características morfológicas de la interfase.....	184
4.4.3.3.3. Partículas hiperreflectivas en la interfase.....	185
4.4.3.4. Implantes intraestromales.....	187
4.4.4. Análisis global de los resultados de la MCIV.....	187
4.5. Histología.....	188
4.5.1. Epitelio.....	188
4.5.2. Endotelio.....	188
4.5.3. Estroma.....	189
4.5.3.1. Estroma grupo 2.....	189
4.5.3.2. Estroma grupos 3, 4 y 5.....	190
4.5.4. Casos con inflamación significativa.....	192
4.5.5. El papel de los corticoides.....	194
4.5.6. Análisis global de los resultados histológicos.....	194
4.6. Expresión de proteínas de MEC por RT-qPCR.....	195
4.6.1. Metaloproteasa de matriz tipo 1 (MMP-1)	195
4.6.2. Colágeno-1A.....	196
4.6.3. Queratocán.....	197

4.6.4. Análisis global de los resultados de RT-qPCR.....	198
VI. CONCLUSIONES.....	199
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	203

INDICE DE ABREVIATURAS

AMA: Alquil-metacrilato

ANOVA: Análisis de la varianza

ARVO: *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

ATP: Adenosin trifosfato

AVNC: Agudeza visual no corregida

BB: *Big bubble technique* (Técnica de la gran Burbuja)

CCI: Coeficiente de correlación intraclase

CD: Capa de Dua

CO₂: Dióxido de carbono

CS4: Confoscan 4

Ct: Ciclo humbral

CVTC: Coeficiente de variación del tamaño celular

DCE: Densidad de células endoteliales

DE: Desviación estándar

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAc: DNA (ácido desoxirribonucleico) complementario

DXM: Dexametasona

EE: Eficacia de encapsulación

HE: Hematoxilina-Eosina

HEMA: Hidroxietil-metacrilato

HRT II RCM: *Heidelberg Retina Tomograph Rocstock Correal Module*

HUD: Hospital Universitario Donostia

IR: Índice de Refracción

IC: Intervalo de confianza

KW: Kruskal-Wallis

LASEK: *Laser-assisted subepithelial keratomileusis* (Queratomileusis subepitelial asistida por láser).

LASIK: *Laser-assisted in situ keratomileusis*. (Queratomileusis in situ con láser)

LFS: Láser de Femtosegundo

LH: Lámpara de hendidura

LIE: Lente intraestromal

LPMN: Leucocitos polimorfonucleares

LRU: *Light reflectance units* (unidades de reflectancia de la luz)

LSCM: *Laser scanning confocal microscopy* (Microscopía confocal con escaneado laser)

ME: Microscopía especular

MD: Membrana de Descemet

MB: Membrana de Bowman

MC: Microscopía confocal

MCIV: Microscopía confocal *in vivo*

MEC: Matriz extracelular

MMA: Metil-metacrilato

MMP: *Matrix metalloproteinases* (Metaloproteasas de matriz extracelular)

OCT: *Optical cutting temperature compound*

OOQP: Osteo-odonto queratoprótesis

p: Nivel de significación estadística

PEG: Polietilenglicol

PEGDA: Polietilenglicol diacrilato

PHEMA: poli (2-hidroxietil-metacrilato)

PLGA: *Poly (lactic-co-glycolic) acid* (Ácido poliláctico-glicólico)

PMMA: Polimetilmetacrilato

PRK: *Photorefractive keratectomy* (Queratectomía fotorrefractiva)

PU: Paquimetría ultrasónica

Q: Hinchamiento volumétrico

QR: Queratotomía radial

RI: Rango intercuartílico

RNA: Ácido ribonucleico

RT-PCR: *Real time polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real)

RT-qPCR: *Real time quantitative polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real)

SEM: *Scanning electron microscopy* (Microscopio electrónico de barrido)

SSCM: *Slit scanning confocal microscopy* (Microscopía confocal con escaner en hendidura)

TMP: 3-(triclorosilil) propil metacrilato

TSCM: *Tandem scanning confocal microscopy* (Microscopía confocal en tandem)

UAE: Unidades arbitrarias de expresión

USP: *United States Pharmacopea* (Farmacopea de los Estados Unidos)

W/O: Emulsión primaria agua/aceite (*water/oil*)

W₁/O/W₂: Doble emulsión agua/aceite/agua (*water/oil/water*)

INDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

1. Diferencias en la córnea de conejo respecto a la del humano
2. Densidad de células endoteliales por MCIV
3. Materiales impermeables empleados en el desarrollo de LIE
4. Características de un implante intraestromal ideal para la corrección de defectos de refacción

MATERIAL Y METODOS

5. Codificación por grupos
6. Calendario de procedimientos
7. Parámetros del Confoscan-4 empleados en el estudio

RESULTADOS

8. Características de los implantes con microesferas de PLGA-Dexametasona
9. Peso medio de cada grupo de conejos
10. Duración media del acto quirúrgico
11. Longitud de la incisión
12. Diámetro bolsillo estromal
13. Hiperemia conjuntival
14. Secreción conjuntival
15. Signos biomicroscopicos de inflamación moderada o severa
16. Paquimetría ultrasónica
17. Paquimetría por MCIV
18. Comparación de la paquimetría ultrasónica y por MCIV
19. Densidad de células endoteliales
20. Área celular endotelial media
21. Coeficiente de variación del tamaño celular endotelial
22. Número de lados de las células endoteliales
23. Hexagonalidad de células endoteliales
24. Densidad de queratocitos en estroma anterior
25. Densidad de queratocitos en estroma posterior
26. Reflectividad de la interfase
27. Características morfológicas de la interfase

28. Porcentaje de casos con partículas hiperreflectivas en la interfase
29. Densidad de partículas hiperreflectivas en la interfase
30. Expresión de colágeno-1A, MMP-1 y queratocán por RT-qPCR
31. Valores referencia de expresión de colágeno-1A, MMP-1 y queratocán
(grupo1)

DISCUSIÓN

32. Grado de acuerdo para los valores del CCI propuesto por Landis y Koch

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

1. Plexo nervioso subasal
2. Epitelio por MCIV
3. Estroma por MCIV
4. Endotelio por MCIV
5. Contaje automatizado de células endoteliales por MCIV
6. Esquema de implantación de lente PermaVision
7. Imágenes de lente PermaVision en ojo humano

MATERIAL Y MÉTODOS

8. Secuencia quirúrgica
9. Hoja de seguimiento
10. Imagen biomicroscópica a 2,5 y 4 aumentos
11. Parquímetro ultrasónico
12. Imagen del microscopio confocal (Confoscan4)
13. Ejemplo de análisis semiautomático de las imágenes endoteliales por MCIV
14. Ejemplo del análisis de contaje manual de queratocitos por MCIV

RESULTADOS

15. Implante de PEGDA
16. Imagen por microscopía electrónica de las microesferas
17. Gráfico de la evolución del peso medio de los conejos
18. Secuencia biomicroscópica de los ojos de los grupos 2 a 5
19. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos de hiperemia conjuntival
20. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos de edema corneal
21. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos de neovascularización corneal
22. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos de infiltrado estromal
23. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos del implante pertenecientes al grupo 3 y 4
24. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos del implante pertenecientes al grupo 5
25. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos del descentramiento del implante
26. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos del desplazamiento del implante
27. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos de un implante con irregularidad en el reborde

28. Imágenes biomicroscópicas de ejemplos de neovascularización asociada a irregularidad/deterioro del implante
29. Grafica mostrando la evolución de la paquimetría ultrasónica
30. Grafica mostrando la evolución de la paquimetría por MCIV
31. Gráfico (Bland y Altman) de la diferencia paquimétrica (PU-MCIV) global
32. Gráfico (Bland y Altman) de la diferencia paquimétrica (PU-MCIV) en el grupo 1
33. Gráfico (Bland y Altman) de la diferencia paquimétrica (PU-MCIV) en el grupo 2
34. Gráfico (Bland y Altman) de la diferencia paquimétrica (PU-MCIV) en el grupo 3
35. Imágenes de epitelio por MCIV
36. Imágenes de endotelio corneal por MCIV en el grupo 1
37. Imágenes de estroma corneal
38. Gráfico representando la evolución de los queratocitos en el estroma anterior
39. Gráfico representando la evolución de los queratocitos en el estroma posterior
40. Imágenes de nervios estromales por MCIV
41. Grafico Z-scan de los grupos 2 y 3
42. Imágenes de la interfase corneal por MCIV grupo 2 día 7
43. Imágenes de la interfase corneal por MCIV grupo 2 día 30
44. Imágenes de la interfase corneal por MCIV grupo 2 día 60
45. Imágenes de la interfase corneal por MCIV grupo 3 día 7
46. Imágenes de la interfase corneal por MCIV grupo 3 día 30
47. Imágenes de la interfase corneal por MCIV grupo 3 día 60
48. Imagen de partículas hiperreflectivas en la interfase
49. Imagen histológica del epitelio corneal a 4 aumentos
50. Imagen histológica del epitelio corneal a 40 aumentos
51. Imágenes histológicas mostrando la hiperplasia epitelial en los grupos 3 a 5
52. Imagen histológica del endotelio corneal a 40 aumentos
53. Imágenes de cortes histológicos de todas las corneas del grupo 2
54. Imágenes de cortes histológicos de las corneas del grupo 2 mostrando cambios en la estructura estromal en el plano de disección
55. Imagen histológica del espacio generado por el implante de PEGDA en el estroma
56. Imágenes de cortes histológicos de las corneas del grupo 3 mostrando cambios en la estructura estromal en el plano de disección
57. Imágenes de cortes histológicos mostrando la compactación de fibras de colágeno
58. Imágenes de cortes histológicos de todas las corneas del grupo 4
59. Imágenes de cortes histológicos mostrando depósitos celulares en el espacio generado por el implante
60. Imágenes de cortes histológicos mostrando restos del implante de PEGDA

61. Imagen histológica-biomicroscópica del caso 216
62. Imágenes histológicas del caso 216
63. Imagen histológica-biomicroscópica del caso 310
64. Imagen histológica-biomicroscópica del caso 311
65. Imágenes histológicas a 63 aumentos del caso 311

INTRODUCCIÓN

1. LA CÓRNEA

La visión es una función compleja que requiere del correcto funcionamiento de todas las estructuras que componen la vía visual, desde el componente refractivo, pasando por el sistema receptor, la transmisión de los impulsos fotoeléctricos a través del nervio óptico hasta el cerebro y la integración y el análisis de la información en la corteza occipital.

La córnea, junto con la película lagrimal, actúa como principal elemento refractivo del eje visual. Además de su función refractiva, la córnea también participa en el sistema de defensa mecánica y biológica del ojo.¹ Igualmente, la anatomía del epitelio corneal con sus uniones intercelulares estrechas y junto con los componentes celulares y químicos de la conjuntiva y de la película lagrimal, proporciona un papel protector ante potenciales agentes patógenos.

Para el correcto desempeño de su función refractiva, la córnea posee una estructura única que le permite mantener la transparencia en condiciones fisiológicas, lo que permite una propagación eficiente de la luz. La arquitectura del estroma es, en gran medida, la responsable de estas características específicas que le confieren su transparencia, aunque el correcto funcionamiento tanto del endotelio como del epitelio es también esencial para mantenerla.

1.1 ANATOMÍA DE LA CÓRNEA

La córnea es un tejido avascular transparente en contacto con la película lagrimal por su cara externa y con el humor acuoso por su cara interna. Junto con la esclera, la córnea da forma a la estructura externa del globo ocular y juntas representan la estructura vital más importante expuesta al exterior de toda la anatomía. La zona de transición entre la córnea, la esclera y la conjuntiva se denomina limbo esclerocorneal, estructura anatómica en la que se encuentran las células pluripotenciales (*stem cell*) encargadas de los procesos de regeneración del epitelio corneal.²

La superficie corneal anterior es convexa y esférica y su morfología oval. Su diámetro horizontal mide entre 11 y 12 mm y es mayor que el vertical, cuyo diámetro medio oscila entre 9 y 11mm.^{3,4} Los radios de curvatura anterior y posterior de la córnea son de 7,8 y 6,5 mm de media, respectivamente, y son menores a los del componente escleral. Esta diferencia entre estos radios anterior y posterior de la córnea hace que sea más fina en el centro (0,52 mm) que en la periferia (0,70 mm).¹ Tanto la superficie anterior como la posterior de la córnea contribuyen a la función óptica que desempeña. Su índice de

refracción es de 1,376 y refleja la suma de las refracciones a nivel de la interfase lágrima-córnea y de la interfase córnea-humor acuoso.⁵ El dioptrio corneal anterior, con una potencia convergente de unas 48,33 dioptrías, contribuye a más de tres cuartas partes de la refracción total del ojo (unas 60 dioptrías). El dioptrio corneal posterior es divergente y su potencia es de unas -6,15 dioptrías.⁶

1.1.1. ESTRATOS CORNEALES

Histológicamente, la córnea humana está formada por seis capas: 1) epitelio, 2) membrana de Bowman, 3) estroma, 4) capa de Dua, 5) membrana de Descemet y 6) endotelio.

1.1.1.1. Epitelio

El epitelio corneal es un epitelio poliestratificado no queratinizado y cilíndrico de células escamosas y representa aproximadamente el 10% del espesor corneal total (50 μm).⁷ Sus características son similares a las de la epidermis cutánea con la salvedad de que, como ya se ha mencionado, el epitelio corneal no está queratinizado en condiciones fisiológicas. En su espesor podemos distinguir de 5 a 7 capas celulares con tres tipos celulares bien diferenciados: una monocapa de células columnares basales, de dos a tres capas de células intermedias aladas y dos o tres capas de células superficiales. Las células superficiales son aplanadas y poligonales, con un diámetro que oscila entre las 40 y 60 μm y un grosor de entre 2 y 6 μm y su superficie está cubierta de microvellosidades.⁸ Esta rugosidad contribuye a estabilizar la película lagrimal junto con las glicoproteínas de membrana que forman el glicocalix.⁹ Por microscopía electrónica se pueden distinguir dos tipos de células superficiales: células grandes oscuras y células pequeñas claras.¹⁰ Las células intermedias aladas presentan un estado de maduración intermedio entre las células basales y las superficiales. Es característico el gran número de desmosomas y uniones estrechas que hay entre este tipo de células. Las células basales presentan una monocapa de células de morfología cuboidea que se asienta sobre la membrana basal a la que se adhieren por hemidesmosomas. Estas células basales están unidas entre sí por desmosomas, uniones estrechas y uniones tipo zónula adherens.^{1,11}

Las células epiteliales proliferan a partir de células madre (*stem cells*) del limbo corneal y migran siguiendo un movimiento centrípeto hasta sustituir las células descamadas del ápex corneal. Este fenómeno migratorio centrípeto de las células epiteliales desde la periferia al centro es el responsable de la regeneración epitelial tanto en condiciones fisiológicas como en los procesos de reparación de un defecto epitelial.¹² La teoría X,Y,Z de Thoft y Friend que se basa en este proceso de proliferación, migración centrípeta y descamación preferencial, postula que las células descamadas son continuamente reemplazadas por

células tanto basales como periféricas (componentes X e Y).¹³ La teoría de las células madre o *stem cell*, vigente en la actualidad, destaca la importancia del limbo esclero-corneal como reservorio de esas células madre necesarias para el correcto funcionamiento de los procesos de regeneración del epitelio corneal.¹⁴

1.1.1.2 **Membrana de Bowman**

Situada justo inmediatamente por detrás de la membrana basal epitelial, la denominada membrana de Bowman (MB) no es una verdadera membrana basal.⁷ Se trata de una estructura acelular de unas 12 μm de grosor compuesta por fibras de colágeno tipo I y proteoglicano ordenadas de forma aleatoria. Su límite anterior está bien definido bajo la lámina densa de la membrana basal epitelial y es relativamente liso. Por el contrario, el límite posterior está peor definido y presenta abundantes imbricaciones con haces estromales que le confieren la gran cohesión existente entre el estroma corneal y la MB.¹⁵

Esta estructura característica de la córnea humana no está presente en todos los mamíferos y, de hecho, los ojos de conejo están desprovistos de ella. Sin embargo, y a pesar de ello, el epitelio corneal de estos ojos está bien organizado.

1.1.1.3. **Estroma**

El estroma corneal es la capa más gruesa y representa más del 90% del grosor corneal total. Muchas de las características específicas de la córnea, como son su gran resistencia, estabilidad, forma y transparencia, se deben en gran medida a las propiedades anatómicas y biomecánicas del estroma.⁷

El estroma corneal es un tejido conectivo denso que contiene matriz extracelular (MEC), queratocitos y fibras nerviosas. La córnea humana contiene entre 2 y 3,5 millones de queratocitos¹⁶ que representan entre un 9 y un 17% del volumen total del estroma.¹⁷ Los queratocitos presentan una estructura similar a los fibroblastos con un extenso citoesqueleto intracelular rico en actina. Esta organización les confiere una gran capacidad contráctil que es fundamental para la conservación de la morfología corneal. Igualmente, los queratocitos son esenciales para el mantenimiento de la matriz estromal ya que van a sintetizar el colágeno y los glucosaminoglicanos que la forman, así como las enzimas (metaloproteasas de matriz extracelular (MMP), entre otras) que la degradan. De este modo, la homeostasis estructural y biomecánica del estroma se mantiene por la regulación celular de la síntesis y degradación de los componentes de matriz extracelular.¹

La mayoría del volumen restante constituye la MEC, formada por colágeno y proteoglicanos. El colágeno representa más del 70% del peso seco de la córnea y es predominantemente del tipo I, aunque también hay colágeno III, V, VI y XII en menor medida.^{18,19,20} El colágeno tipo V se sitúa en el centro de las fibrillas mientras que el colágeno tipo I se encuentra en la superficie. Los proteoglicanos están compuestos de núcleos proteicos (lumicán, queratocán, mimecán) a los que se unen, mediante uniones covalentes, las cadenas de polisacáridos o glucosaminoglicanos responsables de mantener las distancias constantes entre las fibrillas de colágeno.¹ El glucosaminoglicano más frecuente es el queratán-sulfato, seguido por el dermatán-sulfato. Ambos se ligan a las fibrillas de colágeno y absorben gran cantidad de agua aunque la hidratación corneal esta mayoritariamente regulada por la bomba endotelial.¹ El queratán-sulfato, de localización posterior en el estroma, absorbe y cede agua con más facilidad que el dermatán-sulfato, de localización más anterior. Esto se ha relacionado con la dinámica de hidratación corneal en función de la profundidad estromal.²¹ Otros glucosaminoglicanos como el condroitín-sulfato, heparán-sulfato o el ácido hialurónico no se ligan a fibrillas de colágeno.¹

La transparencia del estroma corneal se debe en gran medida a la estructura tridimensional regular de las fibrillas de colágeno que se organizan en haces paralelos de 300-500 laminillas.^{22, 23} Cada laminilla tiene una orientación diferente a las que tiene por encima y por debajo y cualquier alteración en su estructura puede dar lugar a una pérdida de transparencia. Las fibras de colágeno de las laminillas tienen un diámetro de entre 22,5 y 35 nm y una longitud de entre 10 y 300 nm. Tal y como se ha mencionado previamente, están unidas entre sí por moléculas de proteoglicano que serán las responsables de mantener constante esta distancia ($41,4 \pm 0,5$ nm) entre fibras de colágeno.²⁴

Las teorías clásicas que explican la transparencia de la córnea, como la teoría de la Interfase "*the Interface Theory*" de Maurice⁵ del año 1957 o la de Goldman y Benedek²⁵ de 1967, se centran en la propagación de la luz a través de la MEC de la córnea. Según Maurice, la MEC es transparente debido a la disposición en enrejado uniforme que forman las fibras de colágeno y al diámetro constante de los espacios entre éstas, de manera que la luz dispersada por cada una de las fibrillas de colágeno es neutralizada por otra onda electromagnética en fase opuesta proveniente de una fibrilla de colágeno adyacente, mientras que la luz no dispersada puede ser propagada a través del estroma. Goldman y Benedek añadieron el criterio espacial a esta teoría de manera que, según ellos, la transparencia del estroma se debe a las fluctuaciones de los índices de refracción (IR) que ocurren en distancias muy pequeñas.²⁵ Sin embargo, ninguna de estas teorías tiene en cuenta el papel de los queratocitos, que han sido ignorados para reducir la complejidad de

los modelos de transparencia corneal.²⁶ Sabemos que los núcleos de los queratocitos pueden dispersar la luz y por lo tanto las teorías sobre transparencia han de tener en consideración los cambios en los IR y las propiedades de dispersión cuando la luz pasa desde la MEC, a través del plasmalema, el citoplasma, las estructuras sub-celulares y de nuevo en la dirección opuesta. De hecho, se conoce que una diferencia marcada entre los índices de refracción de los queratocitos y la MEC circundante puede dar lugar a la presencia de *haze* e importante pérdida de transparencia.^{27,28} Las cristalinas son unas proteínas globulares solubles en agua, muy abundantes en el citoplasma de los queratocitos, que poseen la capacidad de suavizar las fluctuaciones de IR dentro del citoplasma y ajustarlos con el IR de la MEC.²⁸

1.1.1.5. Capa de Dua (CD)²⁹

En un artículo reciente, Dua y colaboradores, tras analizar histológicamente mediante inmunohistoquímica y microscopía electrónica de transmisión una serie de especímenes corneales y anillos córneo-esclerales en los que se procedió a realizar una técnica de "gran burbuja" o *big bubble technique (BB)*, describen la presencia de una nueva capa en la córnea a la que denominan capa de Dua (CD).²⁹ La CD presenta un plano de clivaje con el estroma posterior que se pone de manifiesto tras la inyección de aire intraestromal mediante la técnica BB que disecciona un área central de unos 9 mm de diámetro entre el estroma posterior y la CD. Esta nueva capa (CD) está formada por múltiples lamelas finas (de 5 a 8) dispuestas en un patrón longitudinal, tangencial y oblicuo que se sitúa justo por encima de la membrana de Descemet. Su grosor medio es de 10,15 +/- 3,6 µm (rango 6,3-15,83 µm).

1.1.1.6. Membrana de Descemet

La membrana de Descemet (MD) es una gruesa lámina basal de entre 10 y 12 µm sintetizada por el endotelio y, a diferencia de la membrana de Bowman, es una verdadera membrana basal.³⁰ Su grosor aumenta en la periferia de la córnea, terminando en un haz de fibras circulares que conforman la línea de Schwalbe. Los análisis histológicos han mostrado que se trata de una estructura estratificada que se compone de diferentes capas: una capa fina sin bandas de 0,3 µm situada junto al estroma, otra capa anterior con bandas de entre 2 y 4 µm y una estructura amorfa posterior sin bandas de 4 µm.³¹

Se compone principalmente de fibrillas de colágeno tipo IV, laminina y fibronectina que se disponen formando una estructura tridimensional ordenada.^{32,33} Su función principal es estructural, permitiendo una distribución uniforme de la tensión a lo largo de la córnea e impidiendo las deformaciones groseras del tejido corneal.

1.1.1.7. Endotelio

El endotelio corneal es una monocapa de células hexagonales espaciadas regularmente y que forman la barrera entre la córnea y el humor acuoso. Las células que componen el endotelio corneal presentan un grosor medio de 5 μm y su diámetro medio ronda las 20 μm .³⁰ Estas células endoteliales contienen un gran núcleo y abundantes orgánulos citoplasmáticos (mitocondrias, ribosomas y órganos de Golgi) debido a su alta actividad metabólica y secretora.

La densidad media de las células endoteliales va disminuyendo a lo largo de la vida. Se estima que al nacimiento, el endotelio humano posee una media de 3500 células por mm^2 , cifra que se reduce en los primeros cinco años de vida.^{34,35} Posteriormente, a partir de los 18 años, se ha observado una reducción anual del 0,6% en la densidad endotelial, pérdida que se mantendrá de forma casi constante a lo largo de la vida.³⁶ Además de la edad, la inflamación, los traumas y la cirugía también han demostrado ser causantes de una reducción del número de células endoteliales.³⁷

El coeficiente de variación medio del área celular es un valor de gran utilidad clínica y es de 0,25 en una córnea normal. El incremento en la variabilidad de este coeficiente es lo que conocemos como polimegetismo. Del mismo modo, el porcentaje de hexagonalidad de las córneas sanas ronda el 80% y conocemos como pleomorfismo la desviación de esta hexagonalidad por debajo del 60%. La variación en el tamaño y forma de las células endoteliales son indicadores más específicos de daño que la propia densidad celular.³⁸ La pérdida o daño de las células endoteliales produce un aumento de la absorción de agua por el estroma corneal induciendo un edema estromal.

Además de su función como barrera mecánica, la principal función del endotelio corneal es la de actuar como bomba que regula el contenido de agua del estroma corneal.³⁹ Para ello, las células endoteliales poseen sistemas de transporte de iones: ATPasas de Na^+/K^+ en la membrana basolateral y canales de Na^+/H^+ que regulan el gradiente de sodio entre el humor acuoso (143 mEq/l) y el estroma (134 mEq/l). Existe también una difusión de CO_2 en el citoplasma de estas células que junto con agua forman iones de bicarbonato y que está catalizada por la enzima anhidrasa carbónica.¹ Más recientemente, se han descubierto canales proteicos de agua llamados acuoporinas.⁴⁰

1.2. NUTRICION/METABOLISMO DE LA CORNEA

La transparencia es esencial para el correcto desempeño de las funciones ópticas de la córnea. Esta transparencia corneal se consigue gracias a una ordenada estructura tisular y a la ausencia de vascularización en la córnea central. Los metabolitos (oxígeno (O₂) y glucosa) y los productos de desecho (CO₂ o lactato) difunden a través de la córnea desde la película lagrimal, el humor acuoso y los vasos esclerales cercanos al limbo esclerocorneal.⁴¹

El suministro de oxígeno al ojo varía en función de si el ojo está abierto o cerrado. Con el ojo abierto, el O₂ se suministra a través del O₂ atmosférico diluido en la película lagrimal donde se encuentra a una presión parcial de 155 mmHg y en menor medida a través del humor acuoso. Con el ojo cerrado, el O₂ proviene de los vasos esclerales y limbares y los vasos sanguíneos del borde libre palpebral (presión parcial de sangre venosa 55mmHg).⁴² Esta diferencia en el suministro de oxígeno con el ojo abierto y cerrado explica que por la noche se produzca un incremento del grosor corneal de aproximadamente un 4% junto con cambios en el endotelio corneal.^{43,44}

La glucosa es el principal sustrato metabólico de todas las células corneales y proviene principalmente del humor acuoso, desde donde se transporta a través de canales por el endotelio y por difusión pasiva a través del estroma⁴¹ y, en menor medida, por difusión a través de la película lagrimal y de los vasos limbares.⁴⁵ La córnea consume de 40 a 90 µg de glucosa por hora.⁴¹ En condiciones aerobias las células corneales obtienen la energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) a partir de la glicolisis aerobia. Los depósitos de glucógeno epiteliales se reservan para situaciones de metabolismo anaerobio en las que la disponibilidad de glucosa libre es insuficiente.⁴²

1.3. INERVACIÓN CORNEAL

A pesar de la naturaleza avascular de la córnea, se trata de un tejido ricamente innervado por terminaciones nerviosas sensitivas. La inervación corneal proviene mayoritariamente de las ramas maxilar y oftálmica del V nervio craneal o trigémino y posee también terminaciones nerviosas simpáticas. Estos troncos nerviosos penetran el estroma corneal y se distribuyen siguiendo un patrón radial paralelo a la superficie corneal. En su mayoría se encuentran en el estroma anterior desde donde emiten ramas, través de un giro de 90°, que penetran la membrana de Bowman y se distribuyen bajo el epitelio formando el plexo nervioso sub-basal (ver Figura 1).⁴⁶ Una vez los nervios penetran la córnea, pierden el recubrimiento de mielina y se hacen prácticamente invisibles clínicamente. Se estima que la

cornea humana posee aproximadamente 7000 nociceptores por mm² (entre 3 y 400 veces mayor que la epidermis).⁴⁶

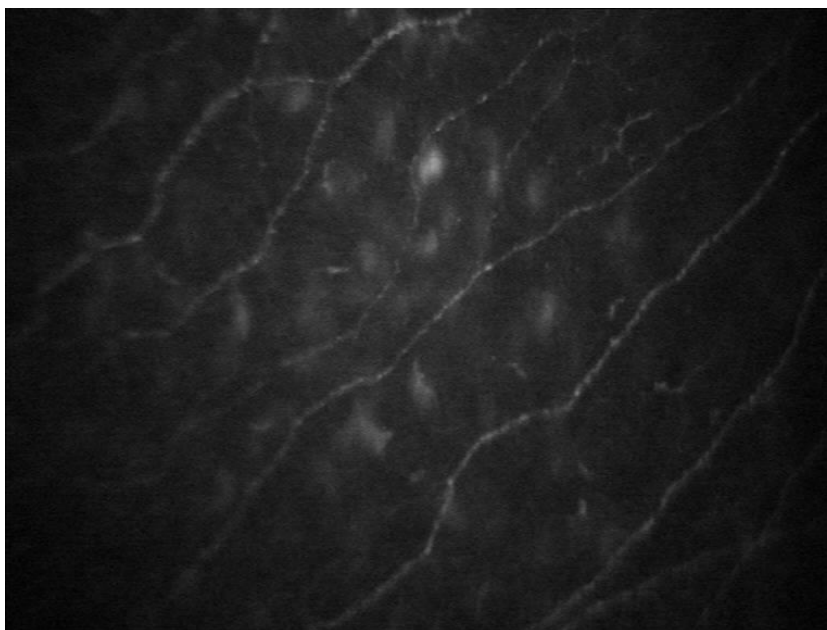


Figura 1. Imagen por MCIIV del plexo Nervioso sub-basal.

Los nervios corneales se encuentran habitualmente en estrecho contacto con los queratocitos. La comunicación, vía mediadores solubles tipo la sustancia P, entre las células nerviosas, células epiteliales, queratocitos y probablemente también con las células endoteliales, es esencial para la homeostasis y el correcto funcionamiento de la córnea.⁴⁷ La denervación corneal da lugar a un menor metabolismo celular y un aumento de la permeabilidad celular, lo que conduce a un menor nivel de neurotransmisores y una menor proliferación celular. De este modo puede haber erosiones epiteliales, sin evidencia de trauma, debido a un gran *turn-over* de células epiteliales.⁴⁸

2. EL OJO DE CONEJO

2.1. ANATOMÍA DEL GLOBO OCULAR EN EL CONEJO

El ojo de conejo es relativamente grande en relación al tamaño del animal y la proporción relativa del tamaño de sus estructuras difiere de la humana. La longitud axial media es de 16 mm, y los diámetros vertical y horizontal de 17 y 18 mm respectivamente.⁴⁹ Posteriormente, Bozkir describe una longitud axial media de 15,12 mm, un diámetro corneal horizontal medio de 13,41 y diámetro vertical medio de 13,02 mm en conejos New Zealand de entre 2 y 3 kg, siendo estas medidas sensiblemente superiores a los valores

medios en humanos.⁵⁰ Su grosor es variable entre el centro y la periferia, siendo 0,45 mm en área limbar y 0,37 mm en el centro.

Su radio de curvatura medio es de 7,26 mm y difiere de la del humano, presentando habitualmente una queratometría central de 46,5 dioptrías de media.⁵⁰ La cámara anterior es profunda en el centro y se estrecha considerablemente en periferia, mostrando un evidente abombamiento del iris. La cámara posterior es estrecha y los procesos ciliares invaden ampliamente la cara posterior del iris. El cristalino es más grande y esférico que el humano, especialmente en su cara posterior.

2.2. HISTOLOGÍA DE LA CÓRNEA DE CONEJO

El dato más característico de la histología corneal es la ausencia de membrana de Bowman (MB).⁴⁹ En ocasiones se han detectado condensaciones del estroma adyacentes al epitelio, pero en análisis detallados se aprecia que se trata de fibras bien definidas de tejido fibroso, al igual que en el resto del estroma, de manera que el epitelio asienta directamente sobre el estroma corneal. La ausencia de MB tiene importantes implicaciones en tanto que las lesiones experimentales infligidas sobre córneas de conejo pueden presentar un comportamiento diferente al de la córnea humana. Ejemplos de esto son la facilidad con la que el virus del Herpes invade la córnea del conejo o el comportamiento ante la exposición a luz ultravioleta.⁵¹

Epitelio corneal:

El epitelio corneal es un epitelio escamoso estratificado de aproximadamente seis capas celulares de entre 30 y 40 μm de espesor.⁵² El estrato basal, en contacto directo con el estroma debido a la ausencia de MB, consiste en una monocapa de células cilíndricas. La estructura histológica es similar a la del epitelio corneal humano.

Estroma corneal:

La estructura histológica del estroma del conejo es similar a la del humano. Representa aproximadamente el 90% del volumen corneal total y en él se pueden apreciar queratocitos embebidos en una matriz extracelular con una estructura organizada de fibras de colágeno y nervios que atraviesan el estroma de la córnea.⁵²

Membrana de Descemet:

La membrana de Descemet (MD) del conejo es más gruesa que la del humano y su grosor varía con la edad, siendo más gruesa a mayor edad del conejo.⁵³ El grosor medio es de 14 μm (variable entre 7-22 μm) y esta variabilidad es mayor en periferia donde los grosores

oscilan entre 10 y 45 μm . Este grosor es irregular a nivel del ángulo. Por otro lado, los característicos engrosamientos periféricos detectados habitualmente en la MD de humanos no son visibles en ojos de conejo.

Endotelio:

Al igual que en el humano, el endotelio corneal del conejo es una monocapa de células hexagonales dispuestas en forma de panal. La densidad de células endoteliales en especímenes jóvenes (6 semanas) es de 4100 cel/ m^2 y al igual que ocurre en el humano, esta densidad de células endoteliales decrece con los años.⁵⁴ El endotelio corneal en el conejo tiene una mayor capacidad regeneradora que en otros mamíferos como el gato o el humano.⁵⁵

Tabla 1: Diferencias en la córnea de conejo respecto a la del humano

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Ausencia de membrana de Bowman.2. Mayor rapidez de regeneración y cicatrización tras procesos inflamatorios.3. Capacidad mitótica del endotelio corneal.⁵⁵4. Vascularización fisiológica en el estroma superficial en periferia corneal.⁵⁶ |
|--|

2.3. EL CONEJO COMO MODELO EXPERIMENTAL

El conejo es un modelo clásico de experimentación animal en oftalmología debido a su facilidad de manipulación. Del mismo modo, es un modelo representativo de la mayoría de los mamíferos, incluidos los primates, para el estudio de la fisiología corneal, debido a la mínima diversidad bioquímica y estructural de la organización del tejido existente entre especies. El conejo es, junto con el cerdo, el modelo animal más frecuentemente utilizado en estudios de investigación oftalmológica. Ambos presentan grandes similitudes con la córnea humana, siendo el grosor corneal la principal de las diferencias entre ambos modelos. El grosor corneal medio en ojos de conejo es de 375 μm mientras que el grosor de la córnea porcina está alrededor de las 850 μm .⁵⁰

3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS CORNEALES

Existen diferentes métodos para el estudio de la córnea. Desde las exploraciones más básicas mediante lámpara de hendidura hasta sofisticadas técnicas de microscopía confocal *in vivo* (MCIV), pasando por técnicas para la observación *ex vivo* de los especímenes corneales como la histología, o la determinación de la expresión de proteínas de la matriz extracelular mediante técnicas de PCR cuantitativa a tiempo real.

3.1. BIOMICROSCOPIA CON LÁMPARA DE HENDIDURA

La lámpara de hendidura (LH) es una de las principales herramientas de exploración en la práctica oftalmológica habitual. Nos proporciona una fuente de iluminación modificable y ampliable que nos permite aislar y visualizar con gran precisión detalles finos de la córnea.

La LH consta de dos componentes básicos: 1) el biomicroscopio y 2) la fuente de iluminación con hendidura. A estos dos componentes se les pueden sumar otros dispositivos accesorios. Ambos componentes se ensamblan sobre un eje que permite que pivoten uno sobre el otro permitiendo que el biomicroscopio y la fuente de luz tengan un mismo plano focal. La fuente de luz de la LH permite que ésta se transmita de forma difusa o como un haz estrecho. La luz difusa se emplea para realizar una evaluación macroscópica de la córnea y del segmento anterior del ojo. Un estrechamiento de la fuente de luz generando una hendidura permite realizar una sección óptica de las estructuras transparentes y translúcidas del segmento anterior del ojo al incidir sobre la córnea de forma oblicua. De esta manera, podemos visualizar un corte de la córnea y determinar la localización y la profundidad a la que se encuentran las diferentes estructuras en condiciones fisiológicas o en presencia de patología corneal.

3.2 PAQUIMETRÍA CORNEAL

La paquimetría es la medida del grosor de la corneal y su valor es un indicador importante del estado e integridad de la córnea. Asimismo, es un dato imprescindible previo a planear una cirugía refractiva, en la monitorización de patología corneal como el queratocono o para evaluar la función endotelial en casos de distrofia endotelial de Fuchs. El grosor corneal normal es variable entre individuos sanos y difiere entre el centro y la periferia. El grosor corneal mínimo suele localizarse 1,5 mm temporal al centro de la córnea. El grosor corneal central (4 mm centrales) es menor (520 μm) que el de la zona de media periferia corneal (de 4 a 9 mm) (520-570 μm) y ésta, a su vez, es más delgada que la cornea periférica (630-670 μm).⁵⁷

Diferentes métodos de contacto y no contacto han sido empleados para la medición del grosor corneal central. En un meta-análisis conducido por Doughty y Zaman se analizaron los diferentes métodos para el estudio del grosor corneal central así como la medidas obtenidas con cada uno de ellos.⁵⁸

3.2.1. PAQUIMETRÍA ÓPTICA

Las técnicas iniciales de paquimetría óptica son técnicas de no contacto cuya principal limitación es la imprecisión ya que se trata de técnicas muy observador-dependientes.⁵⁹

3.2.2. PAQUIMETRÍA ULTRASÓNICA (PU)

La PU, introducida por Kremer en 1980 es, a día de hoy, el *Gold Standard* para la medición del grosor corneal y se basa en el análisis de la velocidad del sonido al atravesar la córnea (1640 m/s).⁶⁰ Se trata de una técnica sencilla, precisa, reproducible y poco observador-dependiente. Por ello se considera de elección cuando lo que nos interesa son los cambios relativos en el grosor corneal (siempre que se utilice el mismo instrumento a lo largo del seguimiento).

Las principales fuentes de error a la hora de realizar mediciones mediante PU son las siguientes: 1) se trata de una técnica de contacto por lo que la medida obtenida puede ser ligeramente menor a la real, requiere del uso de anestesia tópica y existe riesgo de transmisión de enfermedades,⁶¹ 2) el centrado del terminal de ultrasonidos en el ápex corneal es muy técnico dependiente pudiendo esto modificar el dato de la medición que pudiera corresponder a un punto de córnea más periférica⁶¹ y 3) el grado de hidratación de la córnea puede modificar el grosor corneal central.⁶²

3.2.3. OTRAS TECNOLOGÍAS DE NO CONTACTO (Orbscan®/ Pentacam®)

Otras tecnologías de no contacto como el Orbscan® (Bausch and Lomb, Rochester, NY, USA) o basadas en una cámara de Scheimpflug como el Pentacam® (OCULUS Optikgerate GmbH, Wetzlar, Germany), menos técnico-dependientes, permiten realizar mapas paquimétricos con medidas del grosor corneal en diferentes puntos de la córnea central y periférica con gran reproducibilidad.⁶³ El Orbscan® nos proporciona un mapa tomográfico de la superficie anterior y posterior de la córnea así como el grosor entre la interfase aire-película lagrimal y la superficie posterior de la córnea y lo muestra en forma de mapa paquimétrico.⁶² Los sistemas basados en cámara de Scheimpflug proporcionan información tomográfica de la córnea, el estado de la cámara anterior y la paquimetría corneal. El mapa paquimétrico obtenido muestra los valores en círculos concéntricos en función de la distancia respecto del ápex corneal.⁶⁴

Diferentes estudios obtienen grosores corneales similares medidos por paquimetría ultrasónica y topografía de escaneo en hendidura (Orbscan®) aplicando un factor de corrección (0,92) al equivalente acústico.^{60,64,65,66,67}

3.2.4. PAQUIMETRÍA POR MICROSCOPIA CONFOCAL

(ver apartado 3.3.5.2.1)

3.3. MICROSCOPIA CONFOCAL (MC)

Durante los últimos años hemos asistido a un gran auge de las técnicas de diagnóstico por imagen en oftalmología que nos permiten obtener gran cantidad de información, tanto de ojos sanos como con diferentes patologías, mediante el uso de técnicas no invasivas. La córnea no ha sido ajena a este desarrollo y también han surgido numerosas técnicas que nos han permitido aumentar nuestro conocimiento acerca de la anatomía, fisiología y el comportamiento de la córnea ante diferentes situaciones. En este contexto, la microscopía confocal (MC) se desarrolla como una técnica no invasiva que nos permite obtener imágenes microscópicas de alta resolución y magnificación a nivel microestructural tanto de córneas sanas como con patología congénita y adquirida.^{68,69} Así, mediante el uso de los modernos microscopios confocales podemos realizar un análisis microestructural y a tiempo real de cada una de las capas corneales con una gran precisión.⁷⁰

Desde la presentación de los primeros casos aislados de las publicaciones iniciales, la técnica ha ido desarrollándose y, a día de hoy, disponemos de información cuantitativa que nos permite establecer los parámetros de normalidad y patología corneal en enfermedades como queratitis infecciosas o distrofias corneales.⁷¹

La microscopía confocal *in vivo* (MCIV) nos proporciona imágenes seriadas de secciones ópticas de la córnea en pacientes vivos. La naturaleza no invasiva de esta técnica nos permite estudiar la córnea en su estado fisiológico sin la existencia de artefactos asociados al estudio *ex-vivo*, así como realizar estudios longitudinales de la misma córnea para evaluar cambios ocurridos a lo largo del tiempo.⁷²

3.3.1. HISTORIA

El MC básico fue desarrollado en 1955 y patentado en 1957 por Marvin Minsky⁷³ (US Patent 30313467) y se utilizó inicialmente para el estudio de redes neuronales en el cerebro *in vivo*.⁷⁴ El MC "Confoscan" fue desarrollado por el Dr Thaeer entre los años 1968-1972 y en 1994 James Hill obtuvo la patente norteamericana (US Patent 5307203) para un MC que se comercializaría como: "*Tandem Scanning Confocal Microscope for Ophthalmology*".

La primera córnea *ex vivo* se examinó mediante MC en 1985 por Lemp y colaboradores⁷⁵ y las primeras imágenes de córnea *in vivo* se publicaron en 1990 por Canavagh.⁶⁸ Durante las siguientes décadas, nuestro conocimiento sobre la córnea ha aumentado considerablemente con el consiguiente desarrollo tecnológico y aumento de las aplicaciones clínicas de la MCIV.

3.3.2. PRINCIPIOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL

El principio de la microscopía confocal clásica consiste en la observación de una imagen reflejada a través de un objetivo que contiene una o más lentes tras iluminar el objeto a estudio mediante una fuente de luz. Desde la aparición de los primeros microscopios confocales ha habido muchos avances que, a día de hoy, nos permiten obtener imágenes con una resolución de entre 0,5 y 1 μm .⁷¹

La principal limitación de la observación de estructuras mediante microscopía óptica es la disminución de la resolución y del contraste, como consecuencia de la luz reflejada en las estructuras adyacentes que se sitúan fuera del plano del enfoque.⁶⁸ El principio de la MC se basa en eliminar la luz reflejada procedente de los planos fuera de ese enfoque. En el MC, la lente condensadora focaliza la fuente de luz en una pequeña área de tejido, mientras que la lente objetivo enfocará esa misma área.⁷⁴ Así, y debido a que tanto el condensador como la lente objetivo tienen un mismo punto focal, a este microscopio se le denominará confocal.⁷⁰

Mediante este sistema óptico la iluminación es más intensa en el punto focal y se atenúa, considerablemente, tanto delante como detrás del punto focal. De este modo, la luz proveniente del punto focal será detectada con mayor eficiencia. Este sistema focal proporciona dos importantes características a la hora de explorar la córnea: 1) una disminución de la profundidad de foco y 2) una mejora de la resolución axial y lateral.⁷² Los MC usados en clínica tienen una profundidad de campo de 10 a 26 μm y una resolución lateral de entre 1 y 2 μm .⁷⁶

La posibilidad de obtener imágenes microscópicas de las estructuras oculares a tiempo real ha sido una prioridad para los oftalmólogos. Sin embargo, hasta hace muy poco tiempo esto solo ha sido posible mediante el estudio de especímenes oculares fijados *ex vivo*. La MCIV posibilita un análisis microestructural de la córnea *in vivo*, permitiéndonos visualizar estructuras corneales en pacientes sanos así como en aquellos con patología corneal congénita o adquirida.⁷¹

3.3.3. MODELOS DE MICROSCOPIO CONFOCAL

Desde la aparición de los primeros prototipos de MC para estudio de córneas *in vivo* han surgido diferentes modelos. Los tres más comunes en la práctica clínica son los siguientes:

3.3.3.1. **Tandem Scanning confocal Microscope (TSCM)**

El primer TSCM a tiempo real fue desarrollado por Petran y Hadravsky en 1989.⁷⁷ Los especímenes corneales se escaneaban en paralelo, obteniendo una imagen en dos dimensiones y requerían un agujero estenopeico del menor diámetro posible que eliminara la mayor parte de luz reflejada. Como consecuencia de esto, solo un pequeño porcentaje de la luz emitida (entre el 0,25 y 1%) alcanzaba la córnea, lo que hacía necesario una fuente de luz de alta intensidad que resultaba ineficiente y muy molesta para los pacientes.⁷⁸ Su diseño original se basaba en la presencia de dos agujeros estenopeicos situados uno frente a otro, de manera que el segundo agujero estenopeico impedía el paso de la luz al fotomultiplicador.

3.3.3.2. **Slit Scanning confocal Microscope (SSCM)**

El primer modelo de SSCM (MC de escaneado en hendidura) fue desarrollado por Thaeer como alternativa a la versión anterior de TSCM y utiliza una fuente de luz en hendidura que se enfoca sobre el plano focal posterior del objetivo del microscopio.⁷⁹ Esto nos permite obtener múltiples puntos a lo largo del eje de la hendidura y reduce el tiempo de escaneo en comparación con los modelos anteriores de iluminación de un solo punto focal usados por el TSCM.^{70,80}

El Confoscan 4 (CS4) (Nidek Technologies) es un ejemplo de SSCM que utiliza una hendidura para la iluminación y la observación del campo a estudiar. Esta mayor anchura de la hendidura (300 μm en el CS4) permite un mayor paso de luz dando mayor brillo y contraste de campo en comparación con los modelos anteriores de TSCM. Como consecuencia de esto, las estructuras son visibles con mayor brillo, nitidez, detalle y contraste del campo obtenido, que se obtiene a expensas de una mayor profundidad de campo, que en el CS4 es de aproximadamente 26 μm .⁷⁶

3.3.3.3. **Laser Scanning Confocal Microscope (LSCM)**

El LSCM (MC de Barrido Laser) utiliza una fuente de luz coherente, de alta intensidad y la fuente del laser se escanea sobre la cara posterior del objetivo del microscopio mediante un *set* de espejos de galvanómetro.⁷⁰ El LSCM está disponible comercialmente como Módulo Corneal de Rostock (HRT II RCM) (Heidelberg Retina Tomograph Rostock Coreal Module [RCM]; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany).

Los prototipos de LSCM permiten obtener imágenes corneales de gran calidad e intensidad utilizando una fuente de luz laser de 670 nm.⁸¹ La resolución lateral y la profundidad de campo proporcionadas por el fabricante son de 1 μm y 4 μm , respectivamente.⁷¹ Las

imágenes obtenidas mediante CS4 y HRT II RCM muestran densidades celulares comparables a nivel endotelial y de células epiteliales basales. La densidad celular del estroma medio, medida en células/mm², fue aproximadamente el doble con el SSCM (CS4), probablemente debido al diferente grosor de la sección óptica.⁷¹

3.3.4. IMAGEN CORNEAL NORMAL

La MC *in vivo* (MCIV) nos muestra secciones corneales de varias μm de espesor desde el epitelio al endotelio. Estas secciones obtenidas en el plano rostro-caudal, desde el epitelio al endotelio, ofrecen una perspectiva diferente a las clásicas imágenes obtenidas mediante cortes histológicos en los que las muestras corneales se procesan en secciones longitudinales o transversales. Generalmente, la mayoría de las estructuras corneales son visibles y analizables mediante MCIV, incluso en aquellas córneas con niveles intermedios de transparencia corneal secundarios al edema corneal derivado de una patología endotelial.⁸²

3.3.4.1. Epitelio

El epitelio corneal normal está compuesto por tres tipos celulares claramente diferenciables: 1) células epiteliales superficiales, 2) células intermedias aladas y 3) células basales (ver Figura 2). Mediante MCIV las células epiteliales superficiales se visualizan como unas estructuras poligonales de densidad homogénea con bordes celulares bien definidos y con un núcleo central hiperreflectivo rodeado por un halo oscuro (hiporreflectivo) perinuclear.^{70,80} La densidad de las células epiteliales superficiales medida por MCIV varía en función de autores y del modelo de MC utilizado. Esta densidad oscilará entre $(1213 \pm 370 \text{ cel/mm}^2)^{83}$ y $(759 \pm 162 \text{ cel/mm}^2)^{84}$ medida con SSCM mientras que los valores medidos mediante LSCM muestran densidades que oscilan entre $(840 \pm 295 \text{ cel/mm}^2)^{85}$ y $(1098 \pm 315 \text{ cel/mm}^2)^{86}$. Las células intermedias aladas se caracterizan por la presencia de un borde celular y un núcleo hiperreflectivos y la ausencia del halo hiporreflectivo perinuclear característico de las células superficiales. Las células epiteliales basales son de menor diámetro (8-10 μm) y forman un patrón en mosaico en el que los bordes intercelulares son hiperreflectivos, los cuerpos celulares hiporreflectivos y los núcleos celulares no son evidentes.^{80,85} La densidad de las células epiteliales basales es mayor que la de las células superficiales y difiere en función de las diferentes series y del modelo de MC utilizado, variando desde $(3601 \pm 408 \text{ cel/mm}^2)^{87}$ hasta $(8996 \pm 1532 \text{ cel/mm}^2)^{85}$.

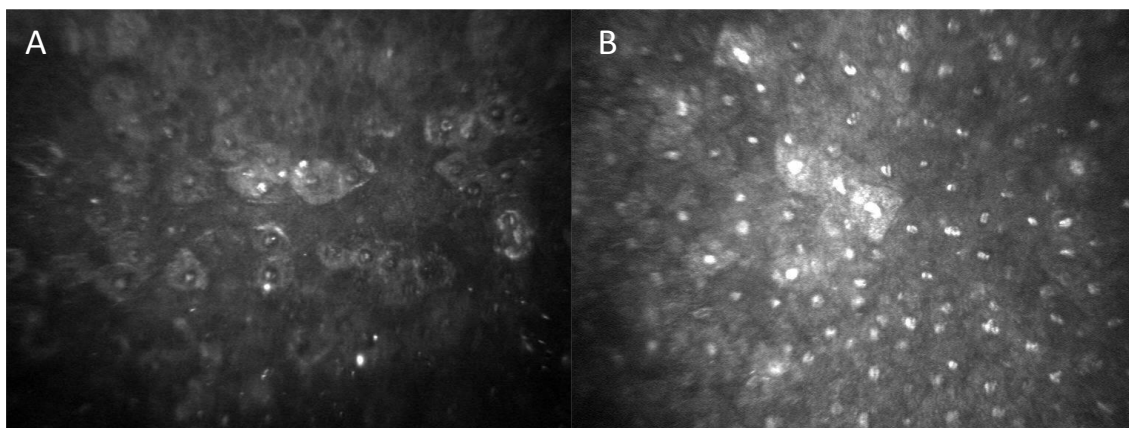


Figura 2. Imagen por MCIV de: A) células intermedias aladas; B) células superficiales.

3.3.4.2. **Membrana de Bowman:**

La membrana de Bowman (MB) no se visualiza de forma directa en córneas normales, aunque algunos autores la describen como una capa amorfa visible por MCIV.⁸³ Sin embargo, en ojos con patología de estas estructuras, se pueden apreciar características anómalas en las imágenes obtenidas mediante MCIV.

3.3.4.3. **Estroma**

La imagen típica del estroma corneal visto por MCIV es la de múltiples cuerpos irregulares de morfología oval (núcleos de queratocitos) dispersos en una matriz acelular transparente (negra-gris oscura) hiporreflectiva. Los procesos celulares se visualizan de manera pobre en córneas sanas pero resultan más visibles en caso de edema corneal o en los procesos de reparación corneal.^{27,69}

Por MCIV el estroma puede dividirse en tres sub-capas: 1) estroma anterior, 2) estroma medio, y 3) estroma posterior. La densidad de los queratocitos varía en cada estrato corneal, siendo mayor en el estroma anterior y disminuyendo progresivamente hacia el estroma posterior. Los queratocitos representan estructuras capaces de reflejar la luz. Los núcleos de los queratocitos son las principales estructuras capaces de reflejar la luz presentes en el estroma corneal, mientras que su citoplasma, en condiciones normales, es capaz de transmitir la luz completamente sin que ocurran fenómenos de reflexión.²⁶ La morfología de los núcleos de los queratocitos en el estroma anterior es redonda, mientras que estos núcleos adquieren una morfología más ovalada en el estroma posterior (ver Figura 3).

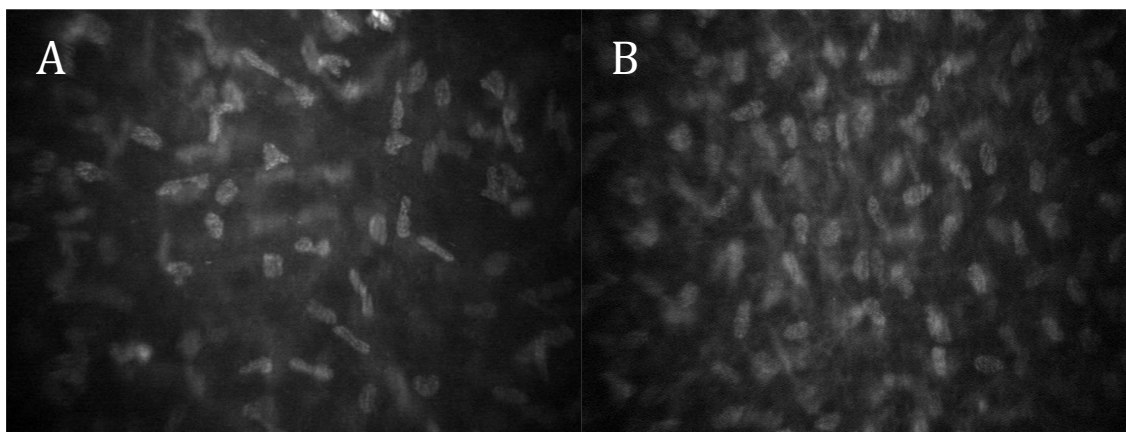


Figura 3. Imagen por MCIV de: A) estroma posterior y B) estroma anterior.

En el estroma anterior y medio pueden visualizarse nervios estromales pertenecientes al plexo corneal profundo.^{69,79} Estos nervios corneales se introducen a través del estroma medio y se ramifican hacia el centro de la cornea formando bifurcaciones en ángulo recto.⁸⁸ El grosor de los nervios varía, siendo los anteriores más finos que los posteriores. El estroma posterior está, habitualmente, desprovisto de nervios.

3.3.4.4. **Membrana de Descemet**

La Membrana de Descemet (MD) normal se describe como una membrana acelular localizada entre el estroma posterior y el endotelio que, en ocasiones, especialmente en sujetos jóvenes, puede no ser visible mediante MC.⁸³ Sin embargo, los cambios patológicos de la MD que ocurren en patologías como la distrofia endotelial de Fuchs o el glaucoma congénito si son apreciables mediante MC.⁸⁹

3.3.4.5. **Endotelio**

El endotelio es la capa más interna de la córnea y está compuesto por una monocapa de células provenientes de la cresta neural. Es fácilmente identificable por MC, que muestra una monocapa hiperreflectiva compuesta por células hexagonales o poligonales planas que se disponen de forma ordenada "en panal de abeja". Los núcleos celulares no son identificables y el cuerpo celular es blanco-gris brillante y homogéneo. Los bordes de las células endoteliales son visibles como líneas finas hiporreflectivas que forman un patrón poligonal alrededor de las células del endotelio (ver Figura 4).⁸⁹

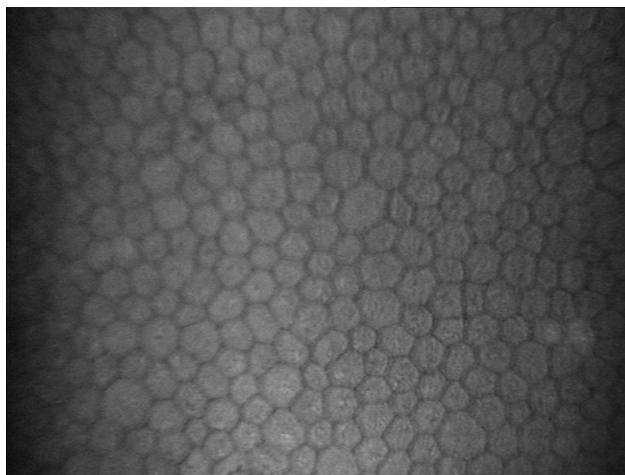


Figura 4. Imagen por MCIV del endotelio corneal.

La estructura del endotelio corneal y su densidad celular han sido ampliamente estudiadas por microscopía especular (ME). La MC, a diferencia de la ME, nos permite obtener imágenes de endotelio claras, incluso con grados variables de edema estromal corneal.⁸²

3.3.5. CAPACIDADES DEL MICROSCOPIO CONFOCAL

3.3.3.1. **Cualitativas**

Nos permite realizar un análisis cualitativo de la microestructura corneal. Se pueden caracterizar cambios morfológicos en las células corneales, así como describir estructuras anómalas presentes en cada uno de los estratos corneales.

3.3.3.2. **Cuantitativas**

Uno de los principales valores del MC es la posibilidad de proporcionar datos cuantitativos para el análisis y comparación de córneas normales, patológicas y sometidas a diferentes técnicas quirúrgicas.

3.3.3.2.1. Grosor Corneal

El MC permite obtener una medida del espesor corneal y de cada una de sus capas. El escaneo rápido de espesor completo de la córnea a velocidad constante utilizado por el sistema TSCM "Through focusing" nos permite realizar una medición más exacta del espesor corneal.^{90,91} Este sistema nos proporciona una curva de intensidad representada gráficamente como una función de "profundidad-z", mostrando un perfil de intensidad característico con picos a nivel del epitelio, plexo nervioso sub-basal y endotelio. El grosor corneal se calcula como la distancia entre el primer pico, que corresponde al endotelio, y el último pico, correspondiente al epitelio. Los movimientos axiales de la córnea durante el

escaneo van a condicionar la precisión de la medida paquimétrica obtenida mediante MC. Por ello, una menor distancia entre el objetivo del MC y la córnea permitirá un menor desplazamiento axial y mayor precisión. La distancia entre el objetivo y la córnea en el Confoscan 4 (CS4) es de 1,8 mm, sustancialmente mayor a la del TSCM que oscila entre 50 y 200 μm .^{72,92} El CS4 permite adaptar un dispositivo conocido como *z-ring* que permite estabilizar la córnea reduciendo el desplazamiento axial durante el escaneo en estos pacientes.⁷⁶

La diferencia del grosor corneal medido mediante TSCM y CS4 asociado al *Z-ring* no ha resultado estadísticamente significativa.⁷⁶ Sin embargo, el grosor corneal medido por MC ha demostrado ser entre 25 y 39 μm menor al medido por paquimetría ultrasónica.^{92,93}

3.3.3.2.2. Densidad de queratocitos

La densidad de queratocitos se ha estudiado por MC en pacientes con córneas sanas y patológicas. La densidad de los queratocitos en imágenes de MC puede medirse en forma de densidad por área (células/ mm^2) o de forma volumétrica (células/ mm^3), ya que a cada captura de imagen bidimensional obtenida mediante un MCIV le corresponde un volumen que variará en función del espesor de cada una de las secciones ópticas realizadas por el MC.⁹⁴ A su vez, el contaje celular de los queratocitos puede realizarse mediante métodos manuales o automatizados.

Los métodos automatizados pueden reducir la variabilidad intra e inter-observador descrita en la determinación de la densidad de queratocitos mediante métodos manuales, aunque existen limitaciones como: 1) la presencia de nervios estromales que dificultan las mediciones; y 2) la necesidad de programas de procesamiento de imágenes específicos para cada MC ya que estos no pueden aplicarse de forma indiscriminada para todos los tipos de MC debido a las diferentes propiedades ópticas de cada uno de ellos.⁹⁵

En relación a la correlación MCIV-histología, existe una buena correlación entre la densidad de queratocitos *in vivo* medida por MCIV y las medidas realizadas *ex vivo* a partir de técnicas histológicas,^{91,96} aunque hay autores que encuentran diferencias de hasta 2,377 cel/ mm^3 entre los datos obtenidos tras contaje manual en imágenes de MCIV y tras el análisis histológico de esas córneas.⁸⁴

3.3.3.2.3. Densidad de células endoteliales

Las imágenes del endotelio por MC nos revelan la presencia característica de una imagen de mosaico regular de células hexagonales en forma de panal, fácilmente reconocible. La

densidad de células endoteliales medida mediante MC ofrece una gran reproducibilidad con muy poca diferencia inter-observador.⁹⁷ Los datos de densidad de células endoteliales obtenidos mediante MC son intercambiables con los obtenidos mediante microscopía especular (ME) siempre que ambos aparatos estén calibrados respecto de la misma referencia.⁹⁸ La principal ventaja del MC respecto de la ME clásica es que nos permite obtener imágenes del endotelio corneal en situaciones clínicas con edema corneal moderado.⁸²

El MC nos permite realizar un conteo tanto manual como automático del área de interés a estudiar. El análisis manual de la densidad de células endoteliales implica el conteo una a una de las células de un área predefinida. De este análisis manual se puede obtener información acerca de la densidad celular endotelial, pero no aporta información adicional sobre la morfología celular. El CS4 incorpora un *software* (NAVIS: *Nidek Advanced Vision Information System software*) que permite realizar un conteo automatizado de las células endoteliales y nos proporciona información adicional como: 1) valores de densidad celular media, 2) rangos de densidad celular endotelial normal ajustados por edad, 3) coeficiente de variación del área celular, 4) porcentaje de hexagonalidad o 5) número medio de lados de las células endoteliales (ver Figura 5). Igualmente, el *software* incorpora un modo de análisis semiautomático de las imágenes que permite realizar correcciones en la delineación de las células propuesta por el *software* del CS4. De este modo, el operador puede modificar manualmente aquellos bordes celulares que estime inapropiados. Entre los posibles ajustes estarían: la división de células, la unión de células o su eliminación.⁹⁹

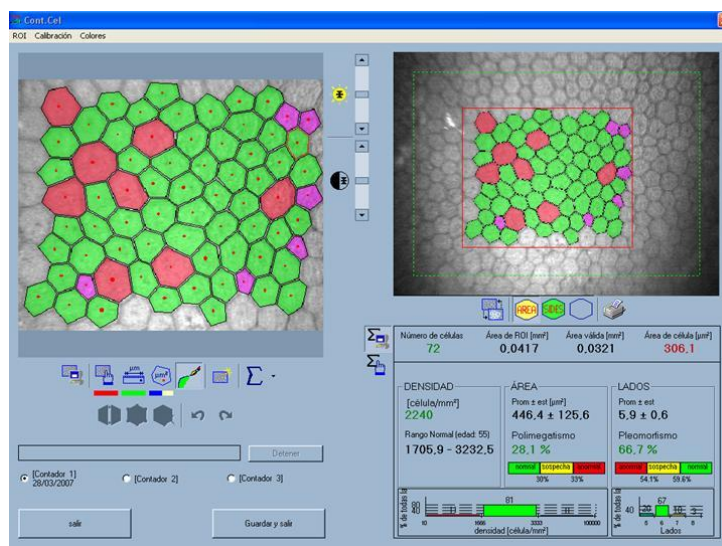


Figura 5. Imagen del software del CS4 en la que se muestran los parámetros del conteo automatizado de células endoteliales.

El área celular endotelial corneal media en adultos es de $334 \pm 51 \mu^2$ rango (273-553).⁸³ La densidad endotelial medida por SSCM varía entre autores (ver Tabla 2).

TABLA 2. Densidad de células endoteliales

AUTOR	Nº OJOS	DENSIDAD ENDOTELIAL (cel/mm ²)
Mustonen, RK. ⁸³	58	3055 ± 386
Imre, L. ⁹⁷	12	3125 ± 407
Hollingsworth, J. ¹⁰⁰	120	3061 ± 382
Vanathi, M. ⁸⁷	100	2818 ± 361
Hara, M. ⁸²	28	2916 ± 334
Klais, CM. ¹⁰¹	42	3069 ± 285
Popper, M. ⁸⁴	20	2743 ± 285
Muller, A. ¹⁰²	75	2488 ± 301
Kitzmann, AS. ⁹⁸	50	2664 ± 173
Sheng, H. ¹⁰³	30	2973 ± 347

3.3.5.2.4. Densidad del plexo nervioso

Diferentes investigadores han estudiado la densidad del plexo nervioso sub-basal mediante MCIV. La densidad de la capa del plexo nervioso sub-basal varía entre diferentes estudios y con diferentes prototipos de MC. Así las diferencias pueden variar desde $5,5 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ a $11,1 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ usando un TSCM y un SSCM, respectivamente,^{88,104} y puede ser de hasta $21,7 \mu\text{m}/\text{mm}^2$ si se mide con LSCM¹⁰⁵ (medida en longitud de fibras nerviosas visibles por unidad de área). Estas diferencias se deben a la disparidad del contraste de las imágenes y de la intensidad del brillo de fondo del campo de cada uno de los modelos de MC.

3.3.6. APLICACIONES CLÍNICAS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

En los últimos años, el desarrollo de la MCIV nos ha permitido obtener imágenes de alta resolución de todos los estratos corneales. A pesar de la calidad de las imágenes su aplicación en la práctica clínica ordinaria de los servicios de oftalmología continúa siendo limitada y su uso se reduce, mayoritariamente, al área experimental. Entre las aplicaciones clínicas más generalizadas del MCIV en la práctica clínica se encuentran la visualización de organismos en queratitis fúngicas y por acanthamoeba, el estudio de distrofias y degeneraciones corneales, el estudio de la patología endotelial tanto primaria como secundaria y la valoración posoperatoria de pacientes de cirugía refractiva.⁷¹

3.4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR RT-qPCR

La "Reacción en cadena de la Polimerasa" (PCR) es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es amplificar un fragmento de DNA a partir de una copia única o cantidades mínimas de DNA. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) es una variante de la PCR que permite cuantificar la cantidad de DNA o RNA de la muestra. En la actualidad, resulta de elección a la hora de cuantificar RNA, especialmente en aquellos casos en los que su expresión es limitada y no es posible su cuantificación por otros medios.

4. CIRUGÍA REFRACTIVA CORNEAL

La superficie anterior de la córnea es la responsable de una gran parte del poder dióptrico del ojo y diversas técnicas de cirugía refractiva buscan alterar esa morfología en un intento de modificar la potencia dióptrica del ojo.

La cirugía refractiva corneal puede dividirse en tres grandes grupos de técnicas que conocemos como: 1) técnicas incisionales, 2) técnicas subtractivas y 3) técnicas aditivas.

4.1. TÉCNICAS DE CIRUGÍA INCISIONAL

Las técnicas de cirugía refractiva incisional representan la primera aproximación a la cirugía refractiva corneal mediante técnicas subtractivas. La queratotomía radial (QR) se desarrolla con el objetivo de conseguir un aplanamiento corneal que corrija defectos miópicos mediante la realización de una serie de incisiones radiales. En los años treinta, el oftalmólogo japonés Tatomu Sato realizó importantes aportaciones a la cirugía incisional corneal.¹⁰⁶ Observó que tras la cicatrización espontánea de las roturas de la membrana de Descemet (MD) en pacientes con *hydrops* se producía un aplanamiento corneal central así como una mejoría de la visión. Posteriormente diseñaría una técnica para provocar roturas artificiales en la MD, pero los resultados a medio plazo fueron malos debido al edema corneal diferido que aparecía en la práctica totalidad de pacientes. En los años sesenta y setenta del siglo pasado, Fyodorov empleó incisiones radiales en córnea anterior y estableció que el diámetro de la zona óptica central estaba inversamente relacionado con el grado de corrección refractiva.¹⁰⁷

En la actualidad la cirugía incisional para la corrección de miopía e hipermetropía ha ido quedando en desuso y se ha ido sustituyendo por el laser o el implante de lentes

intraoculares. A pesar de ello, la cirugía incisional sigue estando vigente en la actualidad, siendo sus indicaciones principales la corrección del astigmatismo primario y residual tras cirugía de catarata mediante incisiones limbares relajantes y el manejo del astigmatismo residual tras queratoplastias penetrantes en forma de queratotomía arcuata.

4.2. TÉCNICAS SUBSTRACTIVAS CORNEALES

4.2.1. FOTOABLACIÓN

La transición de las técnicas de cirugía refractiva incisional a las técnicas foto-ablativas ocurre durante los años ochenta del siglo XX con el desarrollo del láser *excimer*. Éste disminuye el error refractivo mediante la ablación del estroma corneal anterior modificando la curvatura corneal. Desde la aparición de los primeros prototipos, la fotoablación con láser ha ido evolucionando hasta convertirse en la principal técnica de cirugía refractiva corneal en la actualidad.

En el año 1983 Trokel y colaboradores estudiaron el efecto del láser *excimer* en córneas bovinas y demostraron que las emisiones de luz ultravioleta de entre 150 y 200 nm podían ablacinar estroma corneal sin generar traumatismo térmico en el tejido adyacente.¹⁰⁸ Estudios posteriores demostraron que la luz ultravioleta de 193 nm proveniente del láser argón-fluor dañaba menos el tejido corneal adyacente.¹⁰⁹

La fotoablación se produce debido al bajo nivel de transmisión corneal y al gran coeficiente de absorción de manera que un solo fotón a 193 nm tiene energía suficiente para romper los enlaces carbono-carbono y carbono-eno del colágeno corneal en un proceso conocido como "fotodescomposición ablativa" (*ablative photodescomposition*).^{109,110}

La queratectomía fotorrefractiva (*Photorefractive keratectomy*, PRK) fue la primera técnica de aplicación de láser excimer en córneas humanas.¹⁰⁸ En la PRK se realiza una ablación superficial de la córnea con láser *excimer*, previa desepitelización, en un intento de modificar la potencia refractiva. La PRK ha demostrado ser efectiva en la corrección de defectos de refracción, pero se asocia a una serie de inconvenientes, entre los que se encuentran el dolor posoperatorio, la regresión refractiva y la aparición de *haze* subepitelial.¹¹¹

La aparición de un *haze* estromal anterior derivado del proceso de cicatrización anormal secundario a la PRK parece deberse a un aumento del número y de la actividad de los queratocitos estromales.¹¹² Los estudios histológicos en córneas con *haze* muestran un

aumento de los glicosaminoglicanos y del colágeno en el estroma anterior que hace sospechar que la causa de estos depósitos extracelulares sea un aumento de la actividad de los queratocitos.¹¹³ La incidencia de *haze* subepitelial ha disminuido en los últimos años debido a la mejoría de los láseres, a la técnica quirúrgica y al uso profiláctico de mitomicina-C.¹¹⁴

El LASIK "*laser in situ keratomileusis*" (queratomileusis in situ con laser) surge en los años noventa y combina dos técnicas refractivas: la fotoablación con laser excimer junto a la creación de un *flap* corneal con un microqueratomo, que permite preservar la integridad del estroma corneal anterior y del epitelio.¹¹⁵ El término *queratomileusis* proviene de las palabras griegas: *Keratos* que significa córnea y *mileusis* que significa tallado. El procedimiento precisa de un microqueratomo nos permita realizar un *flap* corneal central. Posteriormente, este *flap* se levanta dejando expuesto el estroma corneal sobre el que se realiza la ablación laser que modificará la curvatura corneal. Una vez aplicado el laser se reposiciona el *flap* sobre el lecho estromal sin necesidad de suturas corneales. Las ventajas del LASIK sobre la PRK son: 1) la rapidez en la rehabilitación visual, 2) el menor disconfort posoperatorio, 3) la menor regresión refractiva, 4) la menor incidencia de *haze* subepitelial y 5) una refracción más estable tras tratamientos de corrección de la miopía y del astigmatismo.¹¹⁶

A pesar de las ventajas del LASIK sobre la PRK ya mencionadas, las complicaciones asociadas al LASIK pueden ser de mayor gravedad. Entre estas se incluyen: 1) complicaciones quirúrgicas derivadas de la realización de un *flap* cornea:¹¹⁷ pérdida de succión, *flap* incompleto, *flap* agujereado o perforación y entrada en cámara anterior y 2) complicaciones posoperatorias derivadas de la existencia de una interfase: el ojo seco,¹¹⁸ la presencia de *glare* o deslumbramiento, la queratitis lamelar difusa¹¹⁹ o el riesgo de ectasia corneal post-LASIK^{120,121,122}.

En los últimos años, debido a los problemas de cicatrización de las heridas y a otros problemas derivados de la creación de un *flap* corneal en pacientes intervenidos mediante técnicas de LASIK, ha resurgido el interés por las técnicas de ablación de superficie. En este contexto han aparecido nuevas técnicas de ablación de superficie que pretenden evitar los problemas de dolor posoperatorio y retraso en la epitelización generados por la PRK.^{123,124} Estas técnicas de preservación epitelial difieren en el método de retirar el epitelio corneal para evitar la desepitelización realizada en las técnicas de PRK.

En la técnica conocida como LASEK (*laser-assisted sub-epithelial keratomileusis*) o queratomileusis subepitelial asistida por laser, el epitelio se separa aplicando alcohol diluido al 20% y posteriormente se dobla una lámina intacta de epitelio mediante el uso de una espátula.¹²³ En el Epi-LASIK, el epitelio corneal se retira mecánicamente mediante el uso de un epiqueratomo en un intento de conservar un mayor número de células epiteliales viables.¹²⁴ Aunque el objetivo de estas técnicas es reducir el dolor posoperatorio manteniendo el epitelio corneal, en ocasiones el colgajo epitelial resultante resulta inviable por lo que termina deprendiéndose y retrasando la epitelización de estos pacientes. De hecho, varios estudios muestran que ambas técnicas presentan una incidencia de *haze* subepitelial, patrones de curación de la herida corneal y valores subjetivos de dolor posoperatorio similares a los observados mediante PRK.^{125,126}

4.3. TÉCNICAS ADITIVAS CORNEALES

Los errores refractivos pueden corregirse implantando tejidos biológicos o material sintético preformado sobre la córnea o en el interior del estroma corneal. Desde que en 1949 JI Barraquer realizara sus primeras investigaciones con implantes de lentes en el estroma corneal, los implantes intraestromales se han estudiado para su uso tanto refractivo como terapéutico.¹²⁷ Así, mediante el implante de lentes intraestromales (LIE), el objetivo es modificar el poder refractivo del ojo moldeando la curvatura de la córnea o modificando el índice de refracción (IR) de ésta (mediante lentes con un IR mayor al de la córnea). La principal ventaja de las técnicas aditivas es que se trata de un proceso reversible, ya que el material implantado puede extraerse en un segundo tiempo.

Más recientemente en los últimos años, debido al número creciente de pacientes presbítas que demandan alternativas quirúrgicas, el foco de interés de la cirugía refractiva se ha dirigido hacia la cirugía de corrección de la presbicia. En este contexto, el interés por las LIE como alternativa quirúrgica para modificar el poder refractivo de la córnea ha resurgido con la comercialización de nuevos modelos de implantes estromales.

4.3.1. INICIOS DE LA CIRUGÍA ADITIVA CORNEAL

En 1949 JI Barraquer realizó los primeros casos de implantes de LIE en córneas de conejos y de gatos a los que implantó lentes biconvexas de "*flint glass*" (vidrio pedernal) y posteriormente de "*plexiglas*" de 6mm de diámetro y observó que era posible modificar la curvatura corneal mediante implantes sólidos en el interior del estroma corneal.¹²⁷

La aparición de complicaciones graves como necrosis estromales y extrusión de los implantes de ambos materiales hizo que esta práctica se abandonara. Sin embargo, los

resultados de estos trabajos pusieron de manifiesto que los materiales impermeables implantados en el estroma impedían el intercambio metabólico entre la córnea posterior y anterior, esencial para su normal funcionamiento y nutrición. En un intento de dar solución al problema de la impermeabilidad de los materiales implantados, Barraquer implantó una LIE de gran diámetro con una gran fenestración central, con resultados clínicos insatisfactorios.¹²⁸ Estos resultados se atribuyeron inicialmente al gran tamaño de los implantes y a que su forma, diferente a la de la córnea, ejercía una presión excesiva en el tejido corneal.

Años más tarde, los trabajos de Knowles destacaron la importancia de la permeabilidad de fluidos y nutrientes a través de la córnea y la necesidad de permeabilidad de los implantes estromales para la correcta nutrición de los estratos corneales anteriores, suprayacentes al implante, y explicaron las complicaciones halladas como consecuencia de la implantación de materiales impermeables en el estroma corneal.¹²⁹ A partir de estos hallazgos, se demostró la necesidad de buscar materiales permeables al agua y los solutos para su uso como LIE.

4.3.2. IMPLANTES CORNEALES HOMOPLÁSTICOS: QUERATOFACUQUÍA

Tras el fracaso inicial obtenido con implantes sintéticos hasta ese momento, surgió una nueva técnica conocida como queratofacua. Esta nueva técnica, propuesta por J.I. Barraquer, plantea la posibilidad de usar córneas humanas (implantes homoplásticos) como alternativa a los materiales aloplásticos empleados previamente.¹²⁸ Para ello, Barraquer implanta unos lentículos de córnea en el estroma de conejos *in vivo* a los que previamente realiza un bolsillo estromal. A pesar de sus ventajas como material permeable a los nutrientes y el escaso riesgo de rechazo, la dificultad para obtención de córneas, para tallar un lentículo fino, así como la imprevisibilidad del resultado, no favorecieron la generalización de la técnica.¹²⁸

Troutman y colaboradores, en un estudio en 32 ojos tratados con queratofacua homoplástica, describen una baja predictibilidad refractiva (25% de los pacientes con más de 3 dioptrías de diferencia respecto de la refracción prevista) que, junto con las dificultades técnicas y la complejidad quirúrgica ya mencionadas, hicieron que la técnica se abandonara.¹³⁰

En los años ochenta Kauffmann y Werblin, con el objetivo de modificar la complejidad técnica asociada a la disección lamelar, modifican la técnica de queratofacua realizando un procedimiento superficial que denominaron epiqueratofacua.^{131,132,133,134} En la

epiqueratofaquia la córnea donante pre-tratada se sutura sobre la córnea del receptor que ha sido previamente desepitelizada y en la que la membrana de Bowman y el estroma están intactos. De este modo, se produce un cambio de curvatura corneal que puede corregir hasta 30 dioptrías y que se ha estudiado para corregir errores refractivos asociados a afaquia, miopía y queratocono.^{132,133,134} Las ventajas potenciales de este procedimiento son: la facilidad técnica, el bajo riesgo quirúrgico y la reversibilidad del proceso.¹³¹ A pesar de sus ventajas potenciales, los resultados de los estudios multicéntricos realizados mostraron una baja predictibilidad refractiva y una alta tasa de defectos en la re-epitelización que derivaron en necrosis y *melting* estromal del injerto, por lo que la técnica se abandonó.^{135,136,137}

4.3.3. IMPLANTES CORNEALES ALOPLÁSTICOS

4.3.3.1. Materiales impermeables

Desde los trabajos iniciales de Barraquer con *plexiglas* y *vidrio pedernal*,¹⁴⁹ diferentes materiales impermeables han sido utilizados para el diseño de lentes intraestromales (LIE), entre ellos la polisulfona o el polimetilmetacrilato (PMMA). El objetivo era buscar un material que permitiera desarrollar implantes finos y con un índice de refracción (IR) mayor al del tejido corneal. Así, se desarrollaron implantes de polisulfona y de PMMA con un IR de 1,633 y de 1,48, respectivamente. Estos materiales permitían desarrollar implantes finos de gran potencia dióptrica para la corrección de la hipermetropía y de la afaquia (ver Tabla 3).

Tabla 3. Materiales impermeables empleados en el desarrollo de LIE

MATERIALES IMPERMEABLES	
MATERIAL	REFERENCIAS
VIDRIO: (<i>vidrio pedernal, plexiglass</i>)	Barraquer 1949 ¹²⁷
POLISULFONA	Choyce 1985 ¹³⁸ , Kirkness 1985 ¹³⁹ , Lane 1986 ¹⁴⁰ , Climenhaga 1988 ¹⁴¹ , Deg 1988 ¹⁴² , McCarey 1988 ¹⁴³ , Rodrigues 1990 ¹⁴⁴ .
PMMA	Rodrigues 1990 ¹⁴¹ , Choyce 1982 ¹⁴⁵

Los resultados descritos con diferentes modelos de lentes de materiales impermeables fueron, en general, malos con presencia de opacidades y depósitos de materiales lipídicos y cristalinos en la interfase, adelgazamiento epitelial, necrosis estromal y extrusión de los implantes.^{138,140,142,146} Estos problemas se atribuyeron a una mala nutrición del tejido anterior a la lente debido a la presencia de un material sólido e impermeable en el estroma. La incorporación de micro-perforaciones de 35 µm de diámetro inicialmente y de

10 μm posteriormente en los implantes para mejorar la transferencia de nutrientes y fluidos a la córnea anterior aumentó la seguridad de los resultados, pero no resolvió los problemas anteriores.

De los resultados obtenidos con implantes fabricados con materiales impermeables derivó la importancia del transporte de nutrientes y fluido desde el humor acuoso al estroma corneal anterior a través del implante estromal. De los trabajos de Knowles conocemos que la existencia de una barrera impermeable en el estroma corneal limita el transporte de solutos a través de la córnea, de modo que la permeabilidad intrínseca del material de la lente, íntimamente ligado a su contenido en agua, será el principal condicionante para el funcionamiento de las LIE.¹²⁹

Trabajos posteriores de McCarey y Schmidt estudiaron la distribución de glucosa en córneas a las que se había implantado lentes intraestromales de diferente grosor y a distintas profundidades.⁴⁵ Los autores concluyeron que la permeabilidad del propio material a la glucosa era el principal condicionante para mantener una adecuada nutrición del estroma anterior y no así el diámetro o la profundidad a la que se implantaba. Posteriormente, Larrea y colaboradores desarrollaron un modelo tridimensional de transporte de solutos en la córnea en el que evalúan la difusión de oxígeno y glucosa a través de lentes intraestromales de diferente permeabilidad, implantadas a diferentes profundidades del estroma corneal.¹⁴⁷ Los autores concluyen que el estroma posterior (75% de profundidad) es el ideal para facilitar el aporte de oxígeno y de glucosa a través de la lente. Igualmente, recalcan la importancia del transporte de otros solutos del metabolismo celular como el lactato, que aumenta en condiciones de hipoxia, y que puede modificarse como consecuencia del implante de LIE, siendo causante del edema corneal en estos casos.

4.3.3.2. Hidrogeles

Así, de la experiencia reciente con lentes intraestromales de diferentes materiales en animales de experimentación y en humanos, se ha visto que los derivados de hidrogeles presentan una mayor biocompatibilidad y se consideran de elección para su uso como LIE a día de hoy. Estas lentes de hidrogel tienen un índice de refracción (IR) similar al de la córnea, por lo que su efecto óptico dependerá, principalmente, de su capacidad para modificar la curvatura corneal.

Los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros hidrofílicos formadas a partir de monómeros acrílicos unidos mediante enlaces covalentes a partir de un proceso de co-

polimerización. Son capaces de absorber y retener gran cantidad de agua y líquidos entre las cadenas poliméricas, permitiendo el paso de solutos a través de estos materiales al tiempo que mantienen su estructura debido a la presencia de puntos de entrecruzamiento.¹⁴⁸ Son materiales porosos que permiten el paso de fluido por los poros en ambas direcciones y el tamaño de éstos varía en función de la hidratación del material. El contenido en agua de los hidrogeles es variable y refleja la permeabilidad a los solutos. Asimismo, son polímeros de alto peso molecular que pueden absorber líquido al introducirse en medios con alto contenido acuoso. De este modo, se pueden desarrollar hidrogeles con grados variables de hidratación para formar materiales blandos y flexibles con diferentes finalidades de forma que su contenido en agua será directamente proporcional al coeficiente de difusión del material.

En el año 1965 Refojo analizó la permeabilidad al agua y a los solutos de diferentes hidrogeles y describió que los hidrogeles hidratados en más del 74% permitían el paso de agua en condiciones que se asemejan al estroma corneal.¹⁴⁹ Igualmente, observó que la difusión de agua y solutos de aquellos hidrogeles con hidrataciones menores al 63% estaba disminuida. De aquellos trabajos se deduce que los implantes de hidrogel ideales para su uso como LIE deberían estar hidratados por encima del 74%. Años después Beekhuis y McCarey, en un experimento dirigido a estudiar la estabilidad de las lentes de hidrogel, observaron que las dimensiones físicas de las lentes de hidrogel con hidrataciones iguales o menores al 69,5% se mantenían estables en la córnea *in vivo* expuesta a una presión de intumescencia estromal fisiológica ("*physiologic stromal swelling pressure*") de 55 mmHg.¹⁵⁰ Por el contrario, las lentes de hidrogel de hidratación igual o superior al 70% se deshidrataban parcialmente, dando lugar a una pérdida de volumen y, consecuentemente, un adelgazamiento y acortamiento del diámetro de los implantes en condiciones fisiológicas de presión de intumescencia estromal. De este trabajo, se deduce que la estabilidad de los hidrogeles para su uso como LIE requeriría una hidratación menor a 69,5%. De este modo, y en base a los conocimientos previos, se concluye que para la obtención de un hidrogel que: 1) permita una difusión de agua y solutos similar al estroma corneal y 2) mantenga sus características estructurales íntegras, su hidratación ideal ha de rondar el 70%.

Las propiedades ópticas y la permeabilidad de los hidrogeles se conocen desde los años 60 en los que se utilizaron para la fabricación de lentes de contacto. Pero no fue hasta 1967 cuando Dohlman utilizara por primera vez un hidrogel para desarrollar una LIE.¹⁵¹ Desde entonces se han desarrollado y comercializado diferentes modelos de lentes de hidrogel hasta la actualidad. La importancia de la permeabilidad al agua y los solutos de los

materiales a implantar, destacada por Dohlman y colaboradores, llevó a McCarey y Andrews a usar, por primera vez, una lente de hidrogel de hidroxietil-metacrilato (HEMA) (Permalens®) como LIE.¹⁵² La lente Permalens, fabricada por Cooper Vision Optics, tenía los siguientes parámetros: 6 mm de diámetro, zona óptica de 4,7 mm, 0,25 mm de grosor central, 0,05 mm de grosor periférico y 15 dioptrías de potencia. Tras estos ensayos iniciales, diferentes hidrogeles con contenido variable en agua se probaron para su uso como LIE en modelos animales y humanos. Entre estos hidrogeles se encuentran: el perfilcon A de HEMA (Permalens®), lidofilcon A de metil-metacrilato (MMA) (Sauflon 70®), el lidofilcon B de MMA, etafilcon A de HEMA o el surfilcon A de alquil-metacrilato (AMA) (Permafleflex®). Los resultados con estos implantes demostraron una buena biocompatibilidad y fueron, en general, satisfactorios.^{153,154,155,156}

En el año 1993 McDonald y colaboradores describieron los resultados a 5 años con un hidrogel copolímero de HEMA hidratado al 71% (Permalens®).¹⁵⁷ Reportaron una excelente biocompatibilidad, mostrando una córnea clara sin signos de respuesta inflamatoria, un endotelio sano y ausencia de neovasos corneales. Sin embargo, el grosor necesario de estas lentes para poder ejercer su función refractiva, de entre 270 y 340 μm , limitaba su uso debido a que el paso de glucosa disminuía significativamente. De este modo, el grosor de las lentes de hidrogel representaba un factor limitante para su uso como técnica refractiva en el tratamiento de la hipermetropía.

La lente de hidrogel fenestrada PermaVisión® (ANAMED Inc. Technology Drive, USA) se desarrolló para intentar solucionar los problemas derivados del grosor relativamente alto de las anteriores lentes de hidrogel. Estas lentes presentaban un IR de 1,376 (similar al de la córnea) y una hidratación del 70%, de manera que su espesor variaba entre 15 y 45 μm en función de la potencia dióptrica deseada. Igualmente, la lente presentaba unas fenestraciones para facilitar el paso de nutrientes en un intento de asemejarse al propio parénquima corneal. Estas lentes permitirían, teóricamente, la corrección de defectos refractivos hipermetrópicos de entre 1 y 6 dioptrías (ver Figuras 6 y 7). En el año 2002, Ismail describe los resultados a seis meses tras el implante de en 20 ojos de conejo de estas lentes PermaVisión® de 40 μm de espesor.¹⁵⁸ Las lentes se implantaron en el estroma corneal anterior tras realizar un *flap* de 150 μm con microqueratomo. Los resultados de este estudio a 6 meses mostraron un único caso de descentramiento leve y otro caso de edema corneal que se resolvió a las 6 semanas de la cirugía. Estos buenos resultados se atribuyeron al grosor de los lentículos que permitía un adecuado paso de solutos y de líquido. Dos años más tarde, Michieletto y colaboradores publican los resultados a los 6 meses de implantar lentes PermaVisión® de entre 25 y 60 μm de espesor

en 10 ojos de 6 pacientes con buenos resultados refractivos y un único caso de descentramiento precoz del lentículo que se mantuvo estable tras ser recolocado.¹⁵⁹ Sin embargo, un estudio posterior en ojos de humanos (23 ojos de 20 pacientes) a los que se implantó una lente PermaVisión® de entre 15 y 45 μm de espesor y una hidratación del 78% con un seguimiento de 2 años, mostraron un número significativo de complicaciones: cinco casos de opacificación, dos casos de descentramiento y 1 caso de inflamación de la interfase con crecimiento epitelial que requirió su explante.¹⁶⁰

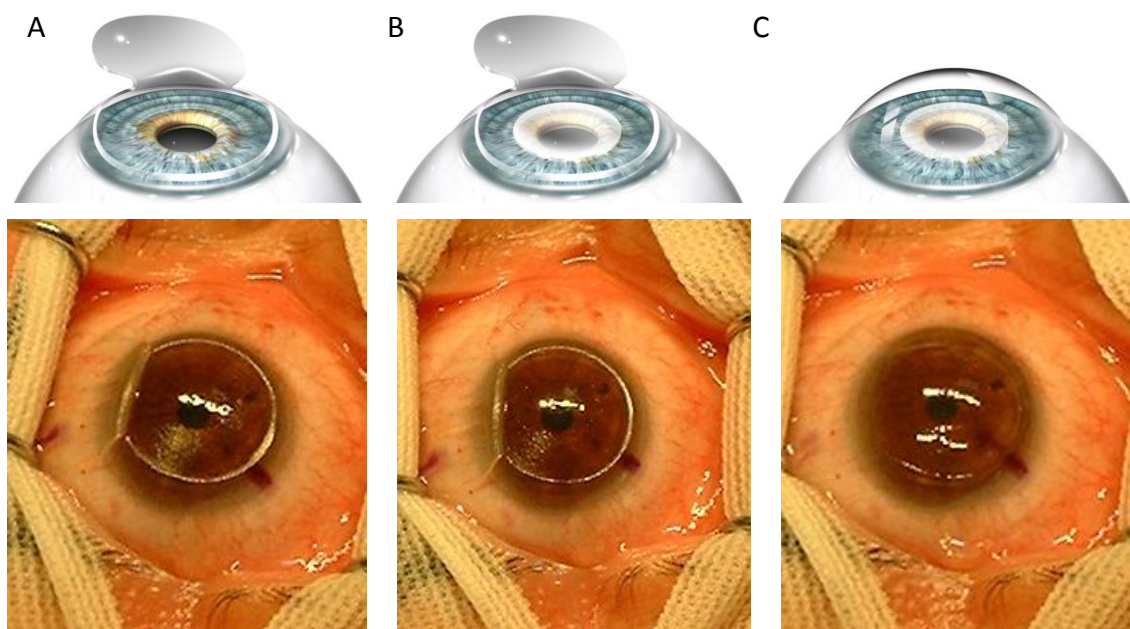


Figura 6. Imágenes A, B y C correspondientes a esquemas de la implantación de una lente PermaVision junto a fotografías quirúrgicas correspondientes al implante de la misma en un ojo humano (cortesía del Dr Mendicute).

Más recientemente, se han publicado estudios que incluyen series de casos con resultados tras la implantación de lentes PermaVisión® en humanos con un periodo de seguimiento más largo. Estos estudios muestran incidencias de complicaciones y resultados variables, pero coinciden en la alta tasa de necesidad de realizar explantes electivos. Verity y colaboradores evalúan los resultados a tres años tras el implante de lentes PermaVisión® en 15 ojos de 15 pacientes hipermétropes de entre 1 y 5 dioptrías y describen la presencia de 3 casos con complicaciones.¹⁶¹ Éstas consistieron en un caso de dislocación precoz del *flap* y extrusión de la lente al día de la cirugía, un caso de migración y crecimiento intraepitelial en la interfase a la semana de la cirugía y un tercer caso de ulceración del estroma corneal anterior al implante al año de la cirugía. Diez de los quince casos precisaron un explante electivo.¹⁶¹ Mullet y colaboradores evaluaron los resultados a cinco

años tras el implante de lentes PermaVisión® en 34 ojos de 21 pacientes.¹⁶² En 20 de los 34 ojos (58,8%) se realizó un explante electivo de la lente debido a: hipocorrección, depósitos intraestromales en el eje visual, astigmatismo irregular, disminución de la agudeza visual, *haze* severo, descentramiento de la lente u opacidad perilenticular.¹⁶²

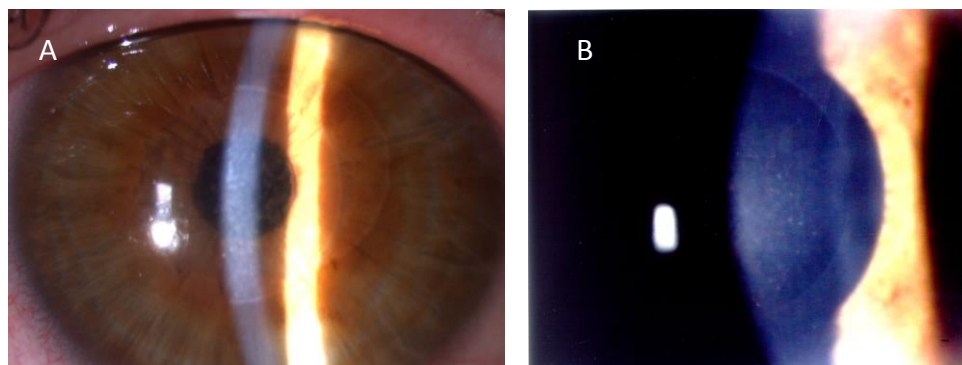


Figura 7. Imágenes A y B correspondientes a un paciente con una lente PermaVision (cortesía del Dr Mendicute).

Posteriormente, Saelens publica los resultados a 22 años tras la implantación de lentes intraestromales de hidrogel (lidofilcon) hidratadas al 68% en dos pacientes afáquicos y describen la aparición tardía (6-13 años) de opacidades intraestromales y disminución secundaria de la agudeza visual en córneas que habían permanecido transparentes durante años tras la implantación de las LIE.¹⁶³

Tabla 4: Características de un implante intraestromal ideal para la corrección de defectos de refracción.¹⁶⁴

1. Transparencia del material.
2. Diseño fino, flexible y pequeño de la lente.
3. Óptica fina y con bordes adecuados.
4. Permeabilidad del material que permita el flujo de nutrientes y la reinervación corneal.
5. Químicamente inactivo.
6. Biocompatibilidad: el material no debe inducir una respuesta biológica o inmunológica.
7. Superficies diseñadas para minimizar la fibrosis.
8. Debe minimizar el estrés mecánico en la cornea.
9. Facilidad para manejar, orientar e implantar por parte del cirujano.
10. Adecuado para una intervención quirúrgica rápida.

Los resultados de estas series de casos muestran una alta incidencia de complicaciones severas, precoces y tardías, y la necesidad de explantar los lentículos en un alto porcentaje de pacientes debido a opacidad, presencia de depósitos o extrusión, por lo que su aplicación para la corrección de defectos refractivos ha caído en desuso.

4.3.4. ACTUALIDAD DE LOS IMPLANTES INTRAESTROMALES

En la actualidad, con el foco de la cirugía refractiva dirigida a desarrollar nuevas tecnologías encaminadas a la corrección de la presbicia, varias compañías comercializan implantes intraestromales con esta finalidad. Su potencial reversibilidad, así como la posibilidad de beneficiarse de futuras técnicas refractivas, han favorecido la popularización de estos implantes.

Existen tres grupos de implantes dirigidos a: 1) modificar el índice de refracción ocular, 2) aumentar la profundidad de foco por medio de un agujero estenoico o 3) modificar la morfología anterior de la córnea.¹⁶⁵

4.3.4.1. **Implantes con efecto estenoico**

- **KAMRA:**

El implante KAMRA, antes conocido como AcuFocus corneal Inlay ACI 7000 (AcuFocus, Inc.) es un implante intraestromal para la corrección de la presbicia en pacientes emétopes, intervenidos de LASIK o que requieran un tratamiento combinado de LASIK-KAMRA. Este dispositivo está fabricado a partir de un polímero (polivinilidene fluoride) biocompatible ultrafino de 5 μm ¹⁶⁶ (10 μm los de primera generación)¹⁶⁷ con 8400 microperforaciones de 3,8 mm de diámetro para permitir el flujo de nutrientes, y una apertura central de 1,6mm. El dispositivo se implanta en el ojo no dominante de los pacientes, para lo que se realiza un *flap* corneal de 200-230 μm de grosor y se coloca el implante en el lecho estromal centrado sobre la pupila (reflejo de purkinje).^{167,168} Posteriormente, se ha modificado la técnica con el tallado de un bolsillo intraestromal con el laser de femtosegundo (LFS) a 200 μm de profundidad que favorece el centrado de la lente.¹⁶⁶ El implante no añade potencia refractiva y funciona como un agujero estenoico que, aumentando la profundidad de foco, consigue mejorar la agudeza visual cercana.

La experiencia con estos implantes a 3 años de la cirugía mostró un incremento de la agudeza visual no corregida (AVNC) en visión cercana de J6 a J1 y de 20/40 a 20/25 de AVNC en visión intermedia, mientras que la AVNC lejana fue superior a 20/32 en el

100% de los casos. Hubo un caso de crecimiento intraepitelial que se resolvió favorablemente y no hubo necesidad de explantar ningún lentículo.¹⁶⁹ Los resultados a 60 meses tras la cirugía mostraron un incremento de la AVNC cercana de J6 a J2, de AVNC en visión intermedia de 20/32 a 20/25, mientras que la AVNC lejana empeoró.¹⁷⁰ Estos estudios a largo plazo no han mostrado casos de pérdida severa de la agudeza visual y solo una lente fue explantada a los 36 meses de la cirugía debido a insatisfacción por parte del paciente.¹⁷⁰

4.3.4.2. **Implantes refractivos**

Los implantes refractivos tienen como objetivo modificar el IR de la córnea. Para ello disponen de una zona central dirigida a la visión lejana que no añade potencia dióptrica y un anillo periférico que añade potencia refractiva para la visión cercana. Dentro de este grupo se encuentran los implantes Flexivue, sus precursores, las lentes Invue,¹⁷¹ o los implantes Icolens (Neoptics AG, Hunenberg, Switzerland).¹⁷²

- **FLEXIVUE:**

La lente Presbia Flexivue Microlens™ (Presbia Coöperatief UA, Amsterdam-Los Angeles, California, USA) es una lente de hidrogel acrílico de 3 mm de diámetro y 15-20 µm de grosor para la corrección de la presbicia en pacientes emétopes. Presenta un diámetro central plano de 1,6 mm, un sector periférico con adición para la visión próxima y un orificio de 0,15 mm en el centro del disco que permite el tránsito de oxígeno y nutrientes a través de la córnea. El rango de potencias oscila entre +1,25 D y +3,50 D con incrementos de 0,25 D.^{173,174} Esta lente está diseñada para ser implantada en el estroma del ojo no dominante de los pacientes présbitas emétopes sin astigmatismo (<1 D). Para su implante se talla un bolsillo a 280-300 µm con LFS.

Los resultados con la lente Flexivue en las series más largas publicadas no han sido muy satisfactorios. En un estudio con 47 pacientes emétopes a los que se les implantó una lente Flexivue la agudeza visual no corregida (AVNC) en visión cercana fue de 20/32 en el 75% de los casos mientras que la AVNC lejana descendió 3 líneas al año de la cirugía.¹⁷³ En otro estudio, en 6 de los 52 casos se requirió el explante del lentículo por disminución de la agudeza visual lejana.¹⁷⁴

4.3.4.3. **Implantes que modifican la morfología corneal**

Su finalidad es modificar la curvatura corneal anterior generando un efecto de multifocalidad para mejorar la agudeza visual cercana e intermedia.

- **RAINDROP**

El implante Raindrop, anteriormente conocido como Presbylens y posteriormente como Vue+ (Re Vision Optics, Lake Forest, California, USA) es una lente de hidrogel de 2 mm de diámetro y un espesor de entre 24 y 40 μm en el centro y 10 μm en periferia diseñado para la corrección de la presbicia. El dispositivo se implanta en el ojo no dominante de los pacientes bajo un *flap* de LASIK o introducido en un bolsillo estromal tallado con LFS a 120-130 μm . El funcionamiento de estas lentes se basa en aumentar el volumen corneal, lo que genera una córnea hiperprolata que induce un diferencial en la curvatura corneal anterior y aumenta la aberración esférica negativa. El implante no añade potencia refractiva.^{175,176}

El estudio multicéntrico más extenso, con 373 pacientes emétopes a los que se les implantó una lente Raindrop, mostró ganancias de 5,1 líneas de agudeza visual no corregida (AVNC) en visión cercana y de 2,5 líneas de AVNC en visión intermedia, mientras que la AVNC lejana descendió 1,2 líneas al año de la cirugía. En 11 de los 373 casos se requirió el explante del lenticulo a pesar de lo cual la agudeza visual final fue igual o superior a 20/25 en el 100% de los casos a los 3 meses.¹⁷⁷

5. TÉCNICAS SUSTITUTIVAS CORNEALES: QUERATOPRÓTESIS Y CÓRNEA ARTIFICIAL

Además de la finalidad refractiva descrita anteriormente, el desarrollo de materiales para su implantación intraestromal tiene una segunda vertiente terapéutica en el desarrollo de queratoprótesis (QP) o córneas artificiales. En la actualidad, el alotrasplante de córnea continúa siendo la principal alternativa quirúrgica para el tratamiento de la disfunción visual de origen corneal. La necesidad de alternativas a la queratoplastia convencional con córnea de donante humano deriva de: 1) la escasez de tejido para el número global de disfunciones corneales que precisan de un sustituto corneal (que representan la cuarta causa mundial de ceguera con una incidencia de 1,5 a 2 millones de nuevos casos de ceguera de origen corneal al año)¹⁷⁸ y 2) la inviabilidad funcional de la queratoplastia convencional (+/- asociada a trasplante de limbo) para la corrección de algunos tipos de desorden corneal. Esto ha derivado en numerosos intentos de desarrollar QP y córneas artificiales en los últimos años.

Las QP son sustitutos corneales sintéticos empleados para restaurar la visión. Una QP ideal sería aquella no rechazada por el sistema inmune del paciente, capaz de mantener la

transparencia a largo plazo, barata, fácil de implantar y que permitiera la exploración de la retina.¹⁶⁴ A lo largo de los años, se han diseñado numerosos modelos de QP con diseños y materiales variados, de los cuales los más extendidos en la práctica clínica han sido: la osteo-odonto queratoprótesis (OOQP),¹⁷⁹ la queratoprótesis de Boston¹⁸⁰ y la queratoprótesis AlphaCor¹⁸¹.

Las QP se componen de un dispositivo óptico o *Core* central transparente y un componente de anclaje. Los sistemas de anclaje al receptor en los diferentes modelos de QP pueden ser: 1) biológicos: tejido dental en la OOQP o córnea de donante *crosslink*-ada en la QP de Boston o 2) sintéticos como el *Skirt* poroso de PHEMA empleado en la QP AlphaCor. El sistema óptico o *Core* central de la queratoprótesis de Boston y de la OOQP es de PMMA.¹⁸² Este material posee gran estabilidad química y permite mantener la transparencia, pero su inconveniente principal es su rigidez, que ha derivado en el fallo anatómico de estas QP en varios casos. La QP AlphaCor, por el contrario, posee un *Core* de hidrogel de PHEMA elástico y poroso que, sin embargo, no ha evitado las complicaciones a medio y largo plazo observadas con modelos de QP anteriores.^{179,183}

La retención de la QP en ojos en los que la ésta es su última alternativa para la recuperación de la visión, continúa siendo un reto.^{183,184,185,186} Se ha podido observar que los mejores resultados se obtienen en aquellos casos en los que la selección del paciente es adecuada y en los que el seguimiento posoperatorio es cercano y de por vida.¹⁸⁷ Por todo ello, el desarrollo de materiales biocompatibles a largo plazo y de sistemas de anclaje estables continúa siendo necesario. A partir de la idea introducida por el modelo de QP *core y skirt* AphaCor, se han desarrollado nuevas propuestas basadas en hidrogeles y otros materiales blandos mediante diferentes estrategias de preparación que incluyen homopolímeros sintéticos, copolímeros, copolímeros biosintéticos basados en colágeno o redes poliméricas interpenetradas cuyo objetivo final es el de desarrollar un hidrogel que mimetice las propiedades de la córnea natural.¹⁸⁸

En los últimos años, los avances en el campo de la bioingeniería han permitido el desarrollo de corneas artificiales a partir de polímeros sintéticos, sustitutos corneales compuestos por polímeros naturales y componentes biológicos o matrices biosintéticas que posibilitan la regeneración del tejido corneal del receptor.^{189,190} De este modo, se han desarrollado modelos de córnea artificial fabricando MEC *in vitro* a partir de células corneales, mientras que otros grupos han empleado macromoléculas de MEC para formar un soporte que mimetiza el de la córnea y que induce la migración hacia el implante de las células corneales.¹⁹¹

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el auge de los implantes intracorneales para la corrección de la presbicia, así como la creciente necesidad de alternativas viables a la queratoplastia con córnea de donante, han impulsado el interés por el desarrollo de materiales y dispositivos biocompatibles para su uso como implante intraestromal con finalidad tanto refractiva como terapéutica. El siguiente trabajo, que forma parte de una línea de investigación más amplia cuyo propósito final es el desarrollo de una queratoprótesis *core-skirt* basada en el modelo *AlphaCor*, tiene como objetivo principal el estudio de la biocompatibilidad de un prototipo de hidrogel de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) para su uso como implante intraestromal.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

La finalidad de la presente tesis es evaluar la biocompatibilidad de un implante de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) para su uso como implante intraestromal corneal. Para ello, se realizará un análisis de los cambios inducidos en la córnea mediante el estudio clínico biomicroscópico, así como por microscopía confocal *in vivo* (MCIV) y posterior correlación con los resultados histológicos y de expresión de proteínas de matriz extracelular mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) de los especímenes corneales obtenidos tras el sacrificio.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar implantes de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) por fotopolimerización para su uso como implante intraestromal corneal con fines óptico-refractivos y/o terapéuticos.
2. Evaluar la técnica quirúrgica de disección estromal experimental para implantar lentes intraestromales.
3. Estudio clínico-biomicroscópico de la biocompatibilidad del implante intraestromal de PEGDA en un modelo experimental de conejo *in vivo*.
4. Analizar mediante el uso de microscopía confocal *in vivo* (MCIV) los cambios morfológicos inducidos en la córnea tras el implante de una lente intraestromal de PEGDA.
5. Analizar la eficacia de la corticoterapia en el control de la inflamación con: 1) dexametasona tópica y 2) la liberación por microesferas de PLGA cargadas con dexametasona encapsuladas en el hidrogel de PEGDA. El análisis se fundamentará en:
 - a. Estudio clínico-biomicroscópico.
 - b. Estudio de expresión de proteínas de matriz extracelular por RT-qPCR.
 - c. Estudio histológico de los cortes de córnea de conejo *ex vivo*.
6. Estudiar, mediante el análisis histológico de los cortes de córnea de conejo *ex vivo*, los cambios inducidos en las córneas tras la implantación de una lente intraestromal de PEGDA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

1.1 BASES Y PLANTEAMIENTO GENERAL

El presente trabajo forma parte de una línea de investigación surgida de la colaboración entre el servicio de oftalmología del Hospital Universitario Donostia (HUD) y la división de salud del área de Biomateriales de la fundación Inasmet (Teknalia) (Parque tecnológico de Donostia-San Sebastián) y ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (Expediente: MEC06/13708).

1.2 GRUPOS

1. GRUPO 1: CONTROL.

El grupo 1 (Grupo control) incluye los 21 ojos no intervenidos (izquierdos) de los conejos del grupo 2.

2. GRUPO 2: TÉCNICA QUIRÚRGICA (TQ).

El grupo 2 (Grupo de técnica quirúrgica) incluye 21 ojos (derechos) a los que se les realizó una técnica de disección corneal lamelar o técnica de bolsillo corneal y a los que no se implantó ningún lentículo intraestromal.

3. GRUPO 3: LENTE INTRAESTROMAL (LIE).

El grupo 3 (Grupo LIE) incluye 21 ojos (derechos) a los que, tras realizar una técnica de disección lamelar corneal o técnica de bolsillo corneal, se les implantó un lentículo intraestromal de polietileno glicol diacrilato (PEGD).

4. GRUPO 4: LENTE INTRAESTROMAL + DEXAMETASONA (DXM).

El grupo 4 (Grupo DXM) incluye 13 ojos (derechos) a los que se les realizó una técnica de disección corneal lamelar y se les implantó un lentículo intraestromal de polietileno glicol diacrilato (PEGD) (de las mismas características que los del grupo LIE) y que fueron tratados con dexametasona tópica para controlar la inflamación postquirúrgica.

5. GRUPO 5: LENTE INTRAESTROMAL CON MICROESFERAS DE PLGA-DEXAMETASONA (MESF).

El grupo 5 (Grupo MESF) incluye 3 ojos (derechos) a los que se les realizó una técnica de disección corneal lamelar y se les implantó un lentículo intraestromal de PEG con microesferas de PLGA-dexametasona encapsuladas.

1.3 CODIFICACIÓN

La codificación de los datos se realizó en función del grupo al que pertenecía cada uno de los ojos y del momento posoperatorio al que corresponden los datos de cada exploración.

1.3.1. EN FUNCIÓN DEL GRUPO AL QUE PERTENECEN

1. GRUPO 1: CONTROL.

Los ojos se codificaron con la siguiente numeración: 101 a 121

2. GRUPO 2: TÉCNICA QUIRÚRGICA (TQ).

Los ojos se codificaron con la siguiente numeración: 201 a 221

3. GRUPO 3: LENTE INTRAESTROMAL (LIE).

Los ojos se codificaron con la siguiente numeración: 301 a 321

4. GRUPO 4: LENTE INTRAESTROMAL + DEXAMETASONA (DXM).

Los ojos se codificaron con la siguiente numeración: 401 a 412

5. GRUPO 5: LENTE INTRAESTROMAL CON MICROESFERAS DE PLGA-DEXAMETASONA (MESF).

Los ojos se codificaron con la siguiente numeración: 501 a 503

1.3.2. EN FUNCIÓN DEL MOMENTO POSOPERATORIO

Cada dato asociado a un ojo en cada uno de los momentos posoperatorios se especifica añadiendo un segundo número correspondiente al día del posoperatorio al que pertenece cada una de las exploraciones. De manera que cada dato se codificará de la siguiente forma: n del 1 al 5 en función del grupo al que pertenezca cada uno de los ojos, seguido de un número del 01 al 21 en función del número de casos dentro de cada grupo. Si el dato corresponde a un momento posoperatorio concreto, se añadirá un segundo número precedido por un guión (ver Tabla 5).

Tabla 5. Codificación por grupos

n01- pre: preoperatorio
n01-post: posoperatorio inmediato
n01-1: 1 día tras la intervención
n01-8: 8 días tras la intervención
n01-15: 15 días tras la intervención
n01-30: 30 días tras la intervención
n01-60: 60 días tras la intervención

1.4 CALENDARIO

	Preop.				Postop.				Día 1						Día 7						Día 15						Día 30						Día 60															
	Constantes	Foto	BMC	Paquimetría	Constantes	Foto	BMC	Paquimetría	Constantes	Foto	BMC	Paquimetría	Sacrificio	Extracción	Constantes	Foto	BMC	Paquimetría	Confocal	Sacrificio	Extracción	Constantes	Foto	BMC	Paquimetría	Sacrificio	Extracción	Constantes	Foto	BMC	Paquimetría	Confocal	Sacrificio	Extracción	Constantes	Foto	BMC	Paquimetría	Confocal	Sacrificio	Extracción							
1	X	X	X	X	X				X				1	1	X				X	2	2	X				2	2	X					2	2	X					2	2	X					14	14
2	X	X	X	X	X				X				1	1	X				X	2	2	X				2	2	X					2	2	X					2	2	X					14	14
3	X	X	X	X	X				X				1	1	X				X	2	2	X				2	2	X				X	2	2	X					2	2	X					6	6
4	X	X	X	X	X				X				1	1	X				X	2	2	X				2	2	X					2	2	X					6	6	X					6	6
5	X	X	X	X	X				X				-	-	X				X	1	1	X				-	-	X					1	1	X					1	1	X					1	1

Tabla 6. La Tabla 6 muestra el calendario y los procedimientos realizados a cada uno de los ojos en los diferentes momentos del seguimiento.

5. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Todos los ojos fueron intervenidos en las instalaciones de la unidad experimental del HUD de San Sebastián por un solo cirujano. Las intervenciones se realizaron bajo microscopio quirúrgico (Microscopio Leica M651, Leica Microsystems, Heerbrug, Suiza) y en condiciones de asepsia quirúrgica.

En todos los grupos, las cirugías se realizaron en los ojos derechos de los conejos. Los ojos izquierdos de los conejos del grupo técnica quirúrgica (grupo 2) se utilizaron como control (grupo 1).

5.1 TÉCNICA QUIRÚRGICA

La técnica quirúrgica empleada se conoce como *técnica de bolsillo* (ver Figura 8) y consiste en la realización de una disección lamelar intraestromal. Esta técnica, descrita previamente por el grupo investigador,^{199,200} ha permitido obtener resultados predecibles y mejores resultados en cuanto a incidencia de complicaciones postquirúrgicas como extrusión, infección corneal o pérdida del lentículo.

5.2 SECUENCIA QUIRÚRGICA

- Colocación del blefarostato.
- Lavado de la superficie ocular con suero salino fisiológico.
- Medida de grosor corneal central mediante 25 determinaciones de paquimetría ultrasónica (PU).
- Incisión precalibrada de 3 a 5 mm de longitud a 250 μm del espesor corneal en córnea clara próxima a limbo nasal mediante uso de un bisturí de diamante.
- Marcado del plano de disección mediante un disector.
- Disección manual del estroma corneal mediante el set de espátulas de queratoplastia lamelar de Melles (DORC International. Zuitland, Holand) hasta disecar un bolsillo intraestromal de entre 7 y 11 mm de diámetro.
- Lavado con suero fisiológico del bolsillo corneal para retirar las partículas generadas durante la disección lamelar.
- Implantación de las lentes intraestromales (LIE) en los grupos 3, 4 y 5 (en el grupo 2 no se realizó ningún implante intraestromal).

- Sutura de la incisión corneal con un punto suelto de Nylon de 10/0 (Dermalon 10/0 Braun-Dexon®, ref. 1338-18. Braun-Dexon S.A. Cyanamid of GB, Londres, Reino Unido) y posterior enterramiento del nudo para asegurar la estanqueidad de la herida quirúrgica y evitar inflamación asociada por el roce de los cabos de la sutura. La sutura se retiró a la semana de la intervención.
- Instilación del tratamiento antibiótico con tobramicina tópica (Tobrex® Alcon Cusi, El Masnou, Barcelona, España) o de un colirio que contenía una mezcla de tobramicina y dexametasona (Tobradex® Alcon Cusi, El Masnou, Barcelona, España) en función del grupo al que perteneciesen (ver apartado 6.2. tratamiento).

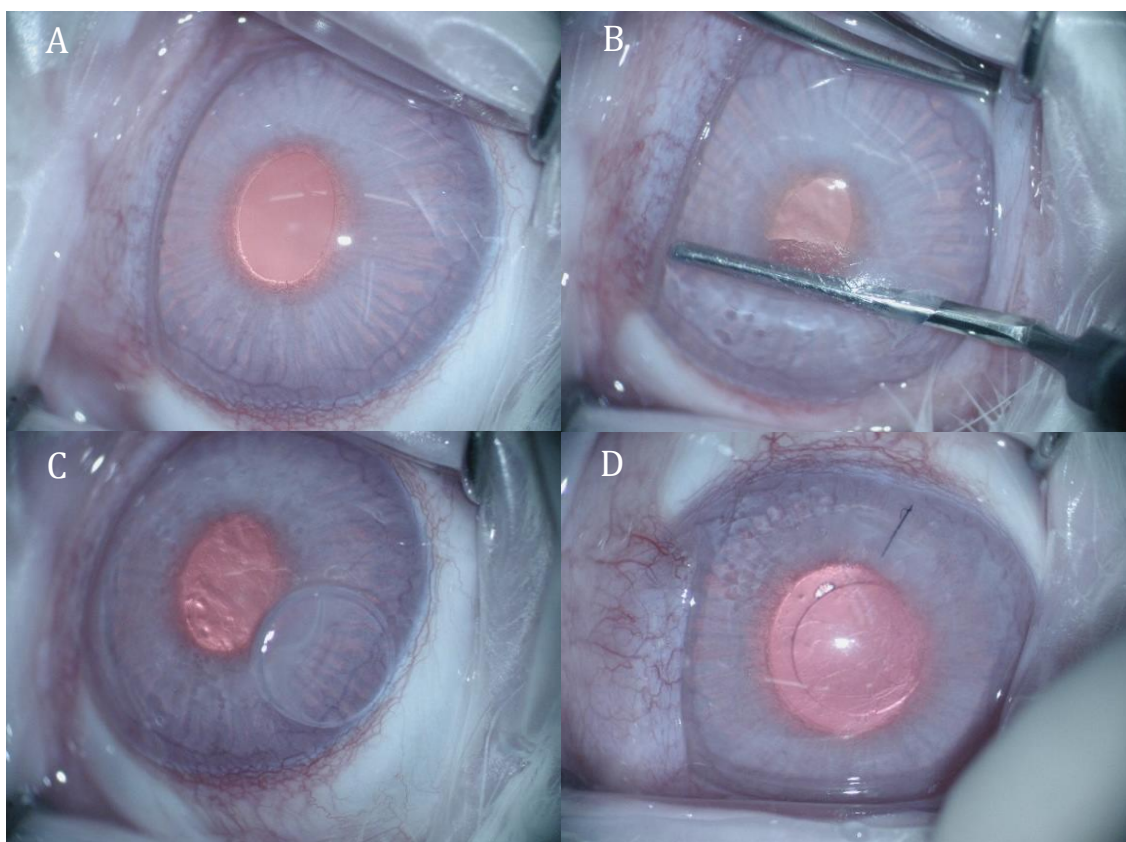


Figura 8. Muestra la secuencia quirúrgica de un caso del grupo 3. Fotografía A: preoperatorio. Fotografía B: disección del bolsillo estromal con espátula de Melles. Fotografía C: imagen de la lente previa a su implantación intraestromal. Fotografía D: lente implantada en el bolsillo intraestromal y sutura de la herida quirúrgica.

5.3. VARIABLES E INCIDENCIAS QUIRÚRGICAS

Todas las variables e incidencias quirúrgicas se anotaron en la hoja de registro (ver Figura 9).

Se anotaron:

1. La duración del procedimiento.
2. Medida e irregularidades en la incisión.
3. Medida del diámetro del bolsillo estromal.
4. Estado de los lentículos. Se anotó cualquier anomalía en la forma y en la superficie del lentículo, así como la existencia de irregularidades o muescas del contorno de las lentes. Igualmente se anotaron aquellas modificaciones de las lentes resultantes de la manipulación quirúrgica.
5. Existencia de complicaciones quirúrgicas.

6. SEGUIMIENTO

6.1. CALENDARIO DE SEGUIMIENTO

Los grupos 1, 2 y 3 constan de 21 ojos, el grupo 4 de 13 ojos y el grupo 5 de 3 ojos. el seguimiento fue de 2 meses en todos los grupos.

Se realizaron controles al día siguiente, a la semana, a las dos semanas, al mes y a los dos meses de la cirugía. En cada revisión se realizó una medición del grosor corneal por paquimetría ultrasónica y se realizaron fotografías de control. Igualmente, se realizó un examen bajo lámpara de hendidura de cada uno de los ojos en todos los controles posoperatorios y se evaluaron: el estado del estroma corneal anterior y posterior (transparencia, edema corneal), la conjuntiva, la estabilidad de los implantes (descentramientos y pérdidas), la entrecara y los problemas derivados de la respuesta corneal a la implantación del lentículo (reacciones de neovascularización, formación de depósitos y necrosis corneales).

6.2. TRATAMIENTO

Los ojos de los conejos de los grupos 1, 2, 3 y 5 fueron tratados con antibioterapia tópica con tobramicina (Tobrex® Alcon Cusi, El Masnou, Barcelona, España) mediante la instilación de 1 gota cada 8 horas durante la primera semana tras la cirugía. Los ojos de los conejos del grupo 4 fueron tratados con una combinación fija de tobramicina más fosfato de dexametasona tópica (Tobradex® Alcon Cusi, El Masnou, Barcelona, España) mediante la instilación de 1 gota cada 8 horas durante la primera semana tras la cirugía.

6.3. SACRIFICIOS

Una vez concluida la fase de seguimiento clínico se procedió al sacrificio de los animales. Los sacrificios de los conejos se realizaron de forma escalonada y siguiendo las normas de la Declaración de Helsinki. La eutanasia se realizó en cámara de dióxido de carbono (CO₂) bajo sedación.

En los grupos 1, 2 y 3 un conejo fue sacrificado al día siguiente de la cirugía, dos conejos tras la revisión de la semana, otros dos a las dos semanas, dos más tras la revisión del mes y los catorce restantes a los dos meses de la cirugía. En el grupo 4, dos conejos se sacrificaron tras la revisión de la semana, otros dos a las dos semanas, dos más tras la revisión del mes y los seis restantes a los dos meses de la cirugía. En el grupo 5 se sacrificó un conejo a la semana, otro al mes de la cirugía y un tercero a los dos meses de la cirugía. Tras el sacrificio se extrajo la córnea de cada uno de los ojos intervenidos.

7. VALORACIÓN/ESTUDIOS *IN VIVO*

7.1. RECOGIDA DE DATOS

Los datos se anotaron en la plantilla diseñada para cada caso (Figura 9-A y 9-B).

7.2. ESTADO DE LOS CONEJOS Y PESO

Durante el tiempo de duración de cada fase del este estudio los conejos permanecieron estabulados en el animalario de la unidad de experimental del HUD tal y como se detalla en un apartado anterior (apartado 3.2). Durante esta estancia se controló el estado de salud de los conejos, así como la existencia de eventos que pudieran alterarlo.

Previamente a cada revisión se pesó a los conejos para realizar un seguimiento de la ganancia de peso de cada uno de los conejos en los diferentes grupos a lo largo del estudio y evaluar así, la existencia de procesos intercurrentes que pudieran alterar la salud de los conejos. Se obtuvieron medidas del peso de cada conejo en el preoperatorio, al día de la intervención, a la semana, a los quince días, al mes y a los dos meses tras la cirugía.

7.3. EXPLORACIÓN BIOMICROSCÓPICA (VARIABLES CLÍNICAS)

7.3.1. ESTUDIO BIOMICROSCÓPICO CORNEAL

7.3.1.1. Estroma

Edema corneal

Se evaluó la presencia de edema estromal anterior y posterior al bolsillo estromal. El edema estromal se clasificó de la siguiente manera:

- Grado 0: ausencia de edema.
- Grado 1: edema corneal leve (permite ver con nitidez las estructuras).
- Grado 2: edema corneal moderado (produce un grado variable de opacidad sin impedir la visualización de las estructuras subyacentes).
- Grado 3: edema estromal severo (impide la visualización de las estructuras que se encuentran por detrás de él).

Neovascularización

La neovascularización corneal se clasificó de la siguiente manera:

- Grado 0: ausencia de neovascularización.
- Grado 1: neovascularización superficial con afectación de 1 o 2 cuadrantes y sin afectación de la córnea central.
- Grado 2: neovascularización superficial con afectación de 2 o más cuadrantes en periferia y/o afectación de la córnea central.
- Grado 3: neovascularización profunda.

Infiltración

Se valoró la presencia de infiltración estromal. La infiltración se definió como la presencia de un área grisácea con mayor o menor opacidad estromal junto a edema estromal.

Úlcera corneal

Se valoró la presencia de defectos epiteliales y de úlceras corneales así como su tamaño y profundidad.

Adelgazamiento estromal

Se valoró la presencia de adelgazamiento corneal y su asociación con defectos epiteliales y úlceras.

Necrosis estromal / lisis estromal / perforación / extrusión de los implantes

Se valoró la existencia de casos de necrosis estromal y de lisis estromal con perforación y extrusión de los implantes.

7.3.1.2. **Entrecara**

Opacidad en la interfase

La transparencia de la interfase corneal se clasificó mediante las categorías estandarizadas de la FDA (*Food and Drug Association*) para la clasificación de la transparencia corneal.

- Grado 0: córnea clara.
- Grado 1: mínima opacidad.
- Grado 2: opacidad leve.
- Grado 3: opacidad moderada.
- Grado 4: opacidad severa.

Depósitos

Se valoró la presencia o ausencia de depósitos en la interfase corneal así como sus características y localización.

7.3.1.3. **Conjuntiva**

Hiperemia

La hiperemia conjuntival se clasificó de la siguiente manera:

- Grado 0: no hiperemia.
- Grado 1: hiperemia conjuntival localizada.
- Grado 2: hiperemia conjuntival difusa +/- hiperemia ciliar.
- Grado 3: hiperemia ciliar generalizada.

Secreción

Se valoró la presencia o ausencia de secreción conjuntival y sus características.

7.3.1.4. **Análisis global de los marcadores de inflamación**

Se evaluaron las características de los casos que presentaron 2 o más signos biomicroscópicos de inflamación.

7.3.2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS Y DEL COMPORTAMIENTO DE LAS LENTES INTRAESTROMALES

El análisis de las características de la LIE implantada, así como su comportamiento en el ojo durante el tiempo de seguimiento, se realizó mediante exploración biomicroscópica a través del microscopio quirúrgico. Tras la exploración se anotaron las características de transparencia, posición y estado de las lentes intraestromales en la hoja de seguimiento (Figura 9-A y 9-B). Posteriormente, se realizó una comparación de las anotaciones realizadas con las fotografías obtenidas en cada una de las sucesivas revisiones (ver apartado 7.4). En caso de discrepancia entre ambas, se escogió la información mostrada en las fotografías.

7.3.2.1. **Transparencia del implante**

Se valoró el grado de transparencia de las lentes en el momento de su implantación así como la existencia de cambios en a lo largo del seguimiento. Igualmente, se evaluaron las diferencias en la transparencia de las lentes entre los diferentes grupos con implante de LIE (grupos 3, 4 y 5).

7.3.2.2. **Descentramiento y desplazamiento del implante**

Se valoró la posición de los implantes, la existencia de descentramiento y su grado desde el posoperatorio inmediato y en las revisiones sucesivas. El descentramiento de los implantes se clasificó de la siguiente manera:

- **Grado 0:** implante centrado.
- **Grado 1:** descentramiento parcial (borde del implante dentro del ápex corneal).
- **Grado 2:** descentramiento completo (borde del implante fuera del ápex corneal).

Igualmente, se evaluó la estabilidad y la presencia de desplazamiento de los implantes, definido como el cambio en la posición de éstos a lo largo del seguimiento.

7.3.2.3. Deterioro del implante

Se valoró la existencia de algún grado de deterioro de los implantes, la regularidad de su superficie o la existencia de muescas o irregularidades en el contorno de los mismos, así como los cambios y el deterioro a lo largo del seguimiento.

7.3.2.4. Depósitos

Se estudió la presencia de depósitos sobre la superficie anterior o posterior del implante o en la interfase estromal.

7.3.2.5. Migración anterior y extrusión de los lentículos

Se evaluó la existencia de migración anterior, adelgazamiento del estroma anterior y extrusión de las lentes intraestromales tanto a través de la incisión como a través de una necrosis estromal anterior.

7.4. FOTOGRAFÍA

En todos los casos se realizó un control fotográfico del segmento anterior del ojo de conejo. Las fotografías se realizaron en condiciones estables de iluminación ambiental y tras identificar a cada animal con un número de referencia. El equipo fotográfico utilizado fue una cámara digital Olympus modelo SP-800 UZ, acoplado al microscopio quirúrgico. Las fotografías se tomaron en el preoperatorio, el posoperatorio inmediato, al día siguiente, a la semana, a los quince días, al mes y a los dos meses tras la intervención. En cada tiempo se realizaron 2 fotografías a 2,5 y a 4 aumentos respectivamente (ver Figura 10).

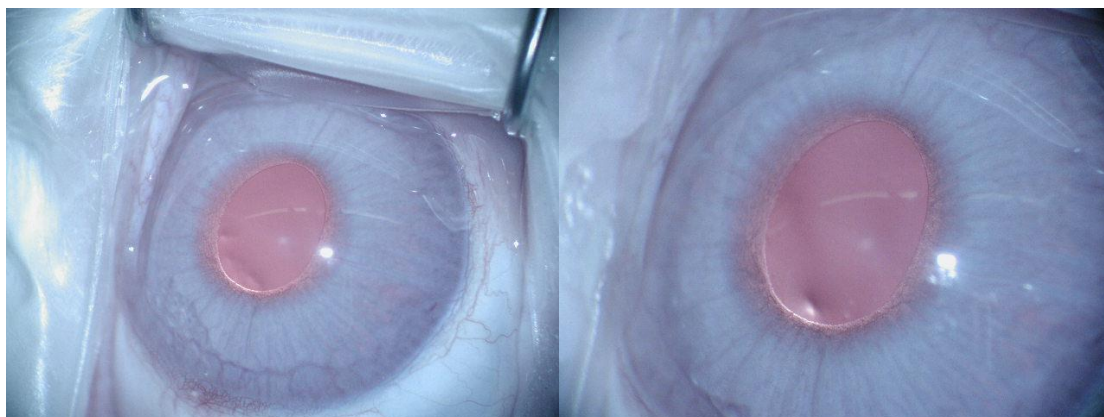


Figura 10. Fotografías de un ojo correspondiente al grupo control (sin LIE) realizadas a 2,5 y 4 aumentos, respectivamente.

QUERATOPRÓTESIS		GRUPO:	N°:	I identificación:
OPERACIONES / MANIPULACIONES				
Fecha: / /	Peso:	Ojo:	Fecha: / /	Peso:
		Autor:		
Bolsillo	Incisión	Longitud	Localización	Notas 
	Diámetro			
	Profundidad			
	Suturas			
Entrecara				
Prótesis	Transparencia			
	Depósitos			
	Deterioro			
	Localización			

TRATAMIENTO POST-INTERVENCIÓN				
Fecha	1º dosis	2º dosis	3º dosis	Comentarios
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	
	B M R	B M R	B M R	

SACRIFICIO / NECROPSIA				
Fecha:		Peso:		
Autor:				
MUESTRA	TOMA	DESTINO	PROCESAMIENTO	COMENTARIOS
Cilindro corneal	B M R	½ tejido → Histología / Inmunohistoquímica	Formol al 10%	
		½ tejido →	Nitrógeno líquido → Congelador a -80°	
		Prótesis → Inasmet		

Figura 9-B. Hoja de registro.

7.5 PAQUIMETRIA

La obtención de la medida del espesor corneal central se realizó mediante un paquímetro ultrasónico (PU) (DHG Pachmate Hand Held Pachymeter; DHG Technology, Inc, Exton, Pa) (ver Figura 11). Este paquímetro realiza de forma automática 25 medidas proporcionando la media y la desviación estándar de dichas medidas.



Figura 11. Imagen del paquímetro ultrasónico con el que se realizaron las mediciones de grosor corneal.

Previo a la toma de medidas se procedió a instilar una gota de colirio anestésico (colircusi anestésico doble® Alcon Cusi, El Masnou, Barcelona, España) en todos los ojos a examinar. Se realizó un control paquimétrico en el preoperatorio, el posoperatorio inmediato, al día siguiente, a la semana, a los 15 días, al mes y a los dos meses tras la intervención. En cada tiempo se obtuvo la media y la desviación estándar de las 25 medidas realizadas de forma automatizada por el paquímetro.

7.6 MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO* (MCIV)

7.6.1 EL MICROSCOPIO CONFOCAL

El microscopio confocal utilizado en este estudio fue el Confoscan 4® (CS4, Nidek Technologies, Italy) (ver Figura 12). Para la toma de medidas, se utilizó un objetivo de inmersión Acroplan de 40 aumentos y apertura numérica de 0,75 (Zeiss, Oberkochen, Germany). El objetivo está diseñado para realizar exploraciones corneales de espesor completo a una distancia de trabajo de 1,92 mm y posee un dispositivo de enfoque motorizado.

7.6.2. CALENDARIO DE REALIZACIÓN DE LA MCIV

1. Grupo 1: control.

El estudio por MCIV se realizó en 1 ocasión: junto con la exploración realizada a la semana en el grupo 2.

2. Grupo 2: técnica quirúrgica.

El estudio de MCIV se realizó en 3 ocasiones: a la semana, al mes y a los 2 meses de la intervención.

3. Grupo 3: lente intraestromal (LIE).

El estudio de MCIV se realizó en 3 ocasiones: a la semana, al mes y a los 2 meses de la intervención.

7.6.3. PROCEDIMIENTO

Previo al escaneo de las córneas, todos los conejos fueron anestesiados con anestesia intramuscular mediante el uso de Xylazina (3 mg/kg) y Ketamina (40mg/kg), como se ha descrito previamente (apartado 4), con el fin de conseguir la aquinesia necesaria para la correcta toma de las muestras. Igualmente, y debido a que se trata de un método de contacto, se instilaron 2 gotas de anestésico tópico (Colircusi anestésico doble[®], Alcon Cusi S.A, El Masnou, Barcelona, España). Una vez anestesiados, las cabezas de los conejos se posicionaron y se fijaron para alinear las córneas en la dirección del objetivo del MC. Posteriormente, se aplicó una gota de un polímero de carbómero: Viscotears gel[®] (Novartis farmacéutica) en la punta del objetivo del microscopio para eliminar interferencias y evitar daños en la superficie corneal.

El procedimiento se realizó en la córnea central de todos los conejos pertenecientes a los grupos 1, 2 y 3. El proceso se repitió en dos ocasiones en cada uno de los ojos, obteniendo así dos exámenes de cada caso en cada uno de los tiempos. En los casos en los que la obtención de un registro válido fue difícil, se repitió la prueba hasta obtener algún registro. El escaneo con MC se realizó en modo continuo z-axial midiendo el espesor corneal completo desde el endotelio hasta el epitelio. La velocidad de avance del plano focal de la imagen fue de 64 micras/seg.

Una vez finalizado el procedimiento, se obtuvieron 350 imágenes de cada caso que fueron almacenadas por el *software* (NAVIS) del propio MC para ser visualizadas posteriormente en forma de imágenes o en formato de vídeo.

Tabla 7. Parámetros del Confoscan-4 empleados en el estudio

PARÁMETROS CS4	
FUENTE DE LUZ	Halógena 12V/100 W
OBJETIVO	40 aumentos
CAMPO DE VISIÓN	460 x 345 μm
APERTURA NUMÉRICA	0,75
RESOLUCIÓN LATERAL	0,6 μm /pixel
RESOLUCIÓN Z-axis	8 μm
VELOCIDAD DE ESCANEO	25 figuras/segundo
DURACIÓN DEL ESCANEO	10 segundos

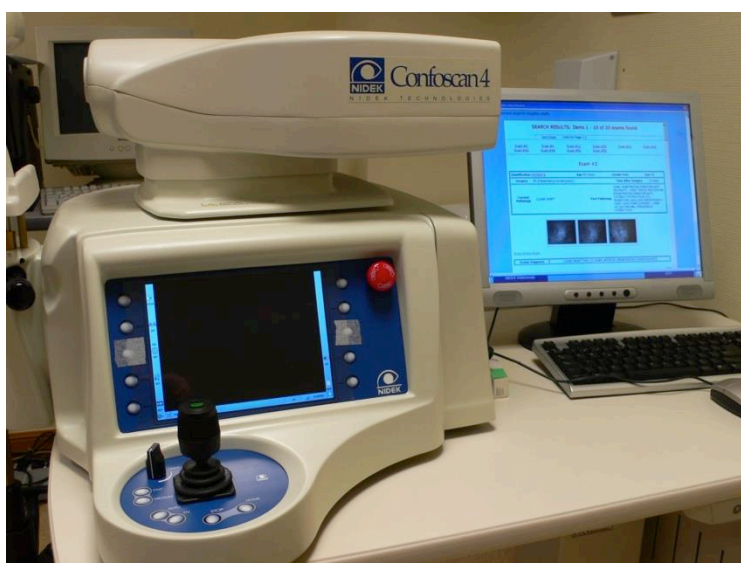


Figura 12. Imagen del microscopio confocal (ConfoScan 4®) con el que se realizó el estudio de MCIV.

7.6.4. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES

Tras la obtención de imágenes, una vez completada la fase correspondiente, se procedió al análisis de las imágenes almacenadas en el software del MC. Este análisis se realizó una vez obtenidos todos los registros de todos los grupos. En todos los casos, un único observador experimentado fue el encargado de analizar las imágenes.

En cada uno de los casos se valoró: 1) la densidad celular del endotelio, 2) la densidad celular del estroma anterior y del estroma posterior, 3) la existencia de interfase, 4) la intensidad de la reflectividad y la morfología de la interfase, 5) la presencia de queratocitos

activados, 6) la presencia de partículas hiperreflectivas en la interfase y 7) la morfología de las células epiteliales.

Se obtuvieron imágenes de alta-resolución que se correlacionan con un punto concreto de la gráfica *Z-scan* a partir del cual se pueden calcular las distancias entre los diferentes estratos de la córnea. El *Z-scan* es una gráfica que muestra las coordenadas de la profundidad (expresada en μm) en el eje z y el nivel de reflectividad (expresado en unidades numéricas arbitrarias y designado como *Light reflectance units* (LRU) o unidades de reflectancia de luz) en el eje y.^{76,201}

7.6.4.1 . Endotelio. Análisis cualitativo y estudio de la densidad celular endotelial

El endotelio corneal se analizó mediante el sistema de análisis semiautomático de las imágenes que incorpora el *software* (NAVIS) del CS4 (Confocommander 2.7.1, Nidek Technologies. Italy).

Así, tras realizar un contaje automatizado por el *software*, se evaluó la exactitud del delineado de los márgenes celulares propuestos por el *software* del MC y se ajustaron aquellos que no se correspondían con los bordes de las células endoteliales originales visibles en la imagen. De este modo, se procedió a la corrección de: 1) células que aparecían divididas y que en realidad se trataba de una única célula, 2) casos en los que el *software* interpretaba como una única célula lo que en realidad correspondía a la imagen de dos células adyacentes y que fueron divididas y 3) casos en los que la imagen delimitada no se correspondía con una célula endotelial y que fueron eliminadas.

Del análisis del endotelio proporcionado por el software se obtuvo información a cerca de los siguientes parámetros: (ver Figura 13)

1. Densidad celular.
2. Área celular media.
3. Coeficiente de variación celular (CVTC) (polimegetismo).
4. Porcentaje de hexagonalidad de las células endoteliales (pleomorfismo).
5. Número de lados de las células endoteliales.

El polimegetismo y pleomorfismo se definieron de la siguiente manera:

- Polimegetismo es la variación del aumento del área celular media. Se estima como patológico un coeficiente de variación del tamaño celular superior al 30%. El CVTC

se calcula dividiendo el área celular principal por la desviación media del área de la célula principal.

- Pleomorfismo es el aumento en la variabilidad de la hexagonalidad celular. Se establece como anormal un porcentaje de células hexagonales inferior al 60%.

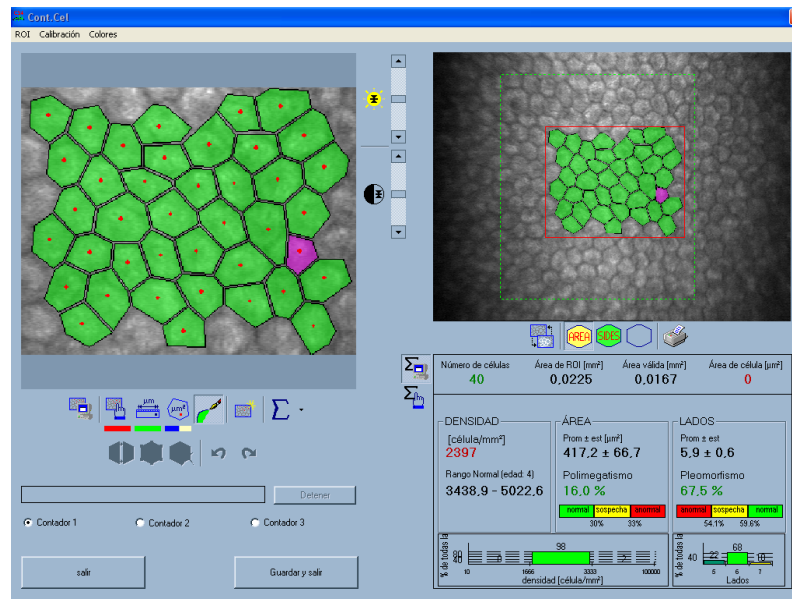


Figura 13. Ejemplo del análisis semiautomático de las imágenes del endotelio que incorpora el software (NAVIS) del CS4.

7.6.4.2. Estroma corneal. Análisis cualitativo y estudio de la densidad de queratocitos

Se analizaron las características morfológicas del estroma corneal, la presencia de nervios estromales y la densidad de células del estroma (queratocitos) en el estroma anterior y posterior.

El conteo de células estromales se realizó siguiendo una estrategia manual. Para ello se cuantificaron los núcleos de los queratocitos por área predefinida de las imágenes de estroma obtenidas. Por convención se marcaron todos los núcleos de los queratocitos dentro del recuadro del área predefinida para el estudio. De entre los núcleos de queratocitos que quedaban en contacto con los bordes del recuadro del área a estudio, solo se marcaron para su conteo aquellos que contactaban con dos de los lados del recuadro (izquierdo e inferior) (ver Figura 14), tal y como recomiendan Erie y colaboradores.⁷¹ El área de observación seleccionada para realizar el conteo de queratocitos fue de 0,0196 mm² en todos los casos y la medida de la densidad de queratocitos se expresó en forma de células por milímetro cuadrado (cel/mm²) mediante

extrapolación de los datos obtenidos marcando queratocitos seleccionados en el área a estudio. La clasificación de la localización (profundidad) del estroma estudiado se dividió en: 1) estroma anterior y 2) estroma posterior.

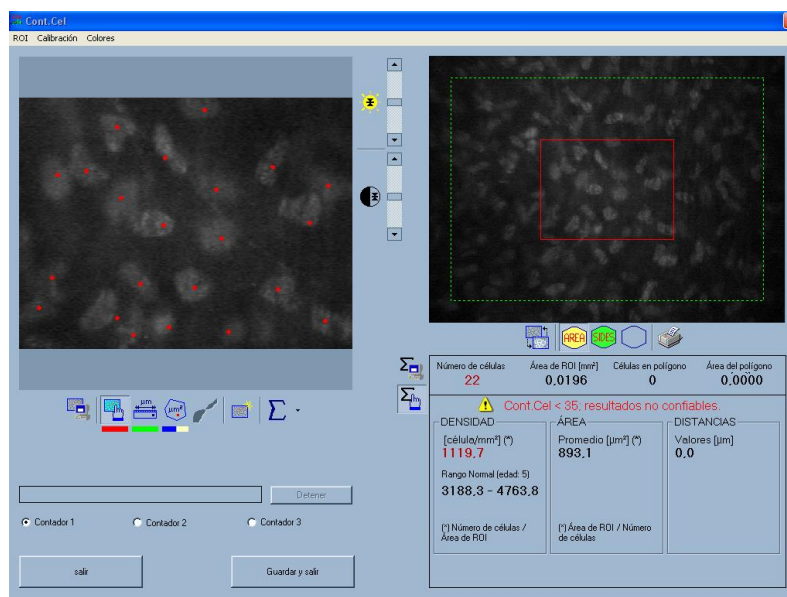


Figura 14. Imagen del *software* del CS4 en el que se muestra el conteaje manual de queratocitos en el estroma.

Por convención, el análisis de la densidad de queratocitos en cada estrato del estroma se define de la siguiente manera: sección óptica del *Z-scan* en el que medimos la densidad de queratocitos.²⁰²

1. El estroma anterior se define como la primera imagen nítida por debajo de la membrana de Bowman.
2. El estroma posterior se define como la primera imagen de estroma de características habituales, anterior a la membrana de Descemet.

7.6.4.3. Análisis de la interfase

La interfase inducida por la cirugía (disección de bolsillo estromal con o sin implante de LIE) se definió como la sub-capa corneal en estroma medio o posterior (en el grupo 2) o adyacente a la LIE (grupo 3) que mostraba discontinuidad respecto del resto del estroma con presencia de queratocitos y distribución regular de la matriz extracelular. La reflectividad de la interfase se determinó analizando la gráfica (*Z-scan*) del área de mayor

reflectividad asociada al plano de disección corneal. Se calculó mediante la media de los picos (3 medidas) de reflectividad del *Z-scan* y se expresó en LRU (unidades de reflectancia de luz), proporcionados por el software del CS4.²⁰³ Igualmente, se analizaron las características morfológicas de la interfase para poder clasificarla morfológicamente en función de éstas.

7.6.4.4. **Paquimetría por MCIV**

Para la medida del grosor corneal nos basamos en el *Z-scan* o perfil de reflectividad obtenido tras el escaneo, en el que cada punto del *Z-scan* se correlaciona con un punto estructural concreto en la córnea. De este modo pudimos determinar el grosor de la córnea midiendo la distancia en μm entre los dos principales picos de reflectividad: 1) el primer pico de reflectividad correspondiente al endotelio y 2) el último pico de mayor reflectividad correspondiente al epitelio. Se obtuvieron las medidas de cada una de las 3 determinaciones realizadas por cada caso y se calculó la media de estos valores.

7.6.4.5. **Grosor de la LIE**

En los ojos correspondientes al grupo 3 (grupo de LIE), el grosor del lentículo estromal implantado se analizó en los diferentes momentos posoperatorios. Para ello, se midió el grosor (la distancia expresada en μm) del valle de hiporreflectividad apreciable en medio del estroma en el gráfico *Z-scan*.

7.6.4.6. **Marcadores de inflamación**

- El número de partículas hiperreflectivas ($\text{partículas}/\text{mm}^2$) en la interfase en el grupo 2 y el número de partículas hiperreflectivas en el estroma tanto por delante como por detrás del implante estromal en el grupo 3.
- La presencia de queratocitos activados en el estroma anterior y en el estroma posterior de los casos de los grupos 1 a 3.

7.2.4.7. **Análisis morfológico y descriptivo del epitelio**

Se obtuvieron imágenes del epitelio corneal en cada uno de los casos y se analizaron las características de cada estrato celular.

8. ANÁLISIS DE LAS CÓRNEAS *POST MORTEM*

8.1. PROCESAMIENTO DE LAS CÓRNEAS TRAS EL SACRIFICIO

Una vez sacrificados los conejos, se procedió a la extracción de las córneas. La extracción de la córnea se realizó de forma manual mediante tijeras de queratoplastia de rama derecha e izquierda. Tras la extracción, cada córnea se dividió en dos partes:

- 1/3 de la córnea se reservó para el análisis de la expresión de proteínas de matriz extracelular mediante estudio de RT-PCR cuantitativo.
- Los 2/3 corneales restantes se reservaron para el estudio histológico.

Una vez realizada la división de la córnea, las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas en un congelador a -80 °C para su posterior estudio por técnicas de RT-qPCR o envío al departamento de anatomía patológica para su procesamiento histológico.

8.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO

8.2.1 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El procesamiento de las muestras se realizó en el departamento de anatomía patológica del Hospital Universitario Donostia (HUD).

Fases:

- A. Fijación en paraformaldehído al 4%
- B. Lavado para eliminar el fijador mediante soluciones acuosas de alcohol etílico en concentración creciente hasta alcanzar una concentración del 100% hasta eliminar, así, el agua evitando la deformación del tejido.
- C. Aclaramiento con Xilol.
- D. Inclusión en parafina. La inclusión en un medio de soporte para formar un bloque es necesaria previo a realizar los cortes, debido a la consistencia frágil de los tejidos. Tras colocar el tejido en un molde, se agregó parafina fundida a 60 °C y se colocó en una estufa durante 6 horas a 60 °C.
- E. Cortes transversales de 5 µm con microtomo orientando las piezas en sentido longitudinal para abarcar toda la longitud de la córnea a estudio.
- F. Montaje: una vez cortadas las láminas se fijaron en un portaobjetos para ser observados bajo microscopio óptico.
- G. Tinción con Hematoxilina-Eosina:

- Eliminación de la parafina con xilol (3 ocasiones).
- Hidratación con alcohol etílico en concentración decreciente desde alcohol absoluto al 100% hasta agua destilada.
- Aplicación de la solución acuosa de Hematoxilina (5 minutos).
- Baño con agua corriente (2 minutos) y agua destilada (2 minutos).
- Aplicación de la solución acuosa de Eosina (1 minuto).
- Deshidratación de nuevo con alcohol etílico al 96% (2 veces durante 5 minutos) y al 100% (2 veces durante 5 minutos).
- Nuevo aclarado con Xilol (2 veces durante 5 minutos)
- Adhesión del cubre-porta mediante sustancia adhesiva (eukitt).

8.2.2 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El análisis de las muestras se realizó en colaboración la Dra Irune Ruiz del Departamento de Anatomía Patológica del HUD. Los cortes se examinaron mediante microscopio y se obtuvieron fotografías de cada uno de los casos.

8.3 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) POR RT-qPCR

El análisis de la expresión de mRNA de los genes que codifican para las proteínas a estudio se realizó mediante la variante cuantitativa de la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) (*Real Time Protein Chain Reaction*): RT-qPCR, en los laboratorios de la empresa Genetadi (Zamudio. Parque tecnológico de Bizkaia).

8.3.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez fragmentada la córnea, se destinó un tercio de la misma para el análisis de la expresión de proteínas de MEC mediante RT-qPCR. Para ello, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

8.3.2. RT-PCR CUANTITATIVA

La RT-PCR es una variante de la PCR en la que se realiza una transcripción inversa de una hebra de RNA en DNA complementario (DNAC) mediante una transcriptasa inversa. En la variante cuantitativa de la PCR, (RT-qPCR) es posible cuantificar el RNA expresado a bajos niveles. La proteínas de MEC analizadas fueron las siguientes:

- Colágeno 1A
- Queratocán
- Metaloproteasa de matriz tipo 1 (MMP-1)

8.3.3. PASOS DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA

- Extracción de RNA:

Se prepararon tres *pools* de córnea por triplicado para cada una de las proteínas a estudio. El RNA total de las córneas se extrajo mediante el kit RNeasy MicroKit (Qiagen. Valencia) siguiendo un procedimiento descrito anteriormente en la literatura.²⁰⁴ Las muestras fueron posteriormente tratadas con deoxiribonucleasa (Qiagen. Valencia) para evitar su contaminación con DNA y conservadas a -80 °C.

- Obtención del DNA complementario:

El RNA total aislado de las córneas sacrificadas los días 1, 7, 15, 30 y 60 se cuantificó por absorbancia a 266 nm. El DNA complementario (DNAC) se sintetizó mediante un *kit* transcriptor de DNAC de primera hebra (Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads) (GE Healthcare, Princeton, NJ) a partir de 0,4 mg del RNA total.

- Amplificación y análisis por RT-PCR cuantitativa:

Los cebadores y las sondas empleados para cuantificar los niveles de expresión génica fueron específicos para queratocán, colágeno 1A y metaloproteasa de matriz tipo 1 (MMP-1). El ciclo umbral (Ct) para cada reacción de PCR se define como el número de ciclos en los que la señal fluorescente de la reacción supera el umbral. El Ct para cada RNA mensajero (RNAm) objetivo se comparó con el valor normal de mRNA de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH) (gen constitutivo o *housekeeping gene*), del que previamente se analizó su expresión mediante una sonda específica UPL 133 (Roche diagnostic). El número de Ct-s se analizó mediante el *software Light Cylinder 480 relative quantification* (Roche diagnostic).

9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la versión SPSS 16.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) (IBM Company. USA) con la colaboración de la Dra Cristina Sarasqueta del departamento de epidemiología del Instituto Bionostia.

El nivel de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

Para la comprobación del ajuste de las variables a una distribución normal se emplearon los test de Kolmogorov-Smirnov y los histogramas. Las variables que se ajustaron a la normalidad se analizaron mediante test paramétricos. El t-test para muestras

independientes se empleó para la comparación de las medias (de las variables) de los diferentes grupos en cada tiempo de evaluación. El t-test para muestras relacionadas se empleó para la comparación intragrupo de las medias de las variables entre los diferentes tiempos de exploración. Las diferencias en el comportamiento de las variables en los diferentes tiempos entre los grupos se analizaron mediante el modelo lineal general de medidas repetidas.

Los test no paramétricos empleados fueron la U de Mann-Whitney y el test de Kruskal-Wallis que se emplearon para el análisis de medidas independientes, y el test Wilcoxon para medidas relacionadas. La comparación de las diferencias puntuales entre grupos en cada tiempo de evaluación se analizaron mediante U de Mann-Whitney y el test de Kruskal-Wallis. El test de Wilcoxon se empleó para el análisis de medidas relacionadas (intragrupo) entre los diferentes tiempos de evaluación.

Para evaluar el grado concordancia entre variables continuas mediante diferentes tecnologías (para el estudio del grosor corneal) se empleó el coeficiente de correlación intraclase (CCI) y las gráficas de Bland y Altman.

Las variables categóricas se analizaron mediante el test de chi-cuadrado y el test exacto de Fisher cuando el tamaño muestral era pequeño. El Test de McNemar se empleó como análisis de medidas repetidas en variables categóricas, para valorar los cambios de estas variables entre los diferentes tiempos de estudio.

RESULTADOS

1. DESARROLLO DE LAS LENTES INTRAESTROMALES

1.1. CARACTERÍSTICAS DEL HIDROGEL

Las características de absorción, propiedades ópticas y permeabilidad a la glucosa del hidrogel de PEG fueron los siguientes:

1. GRADO DE HINCHAMIENTO VOLUMÉTRICO (Q): $0,78 \pm 0,15$
2. CONTENIDO DE AGUA EN EQUILIBRIO: 79%

1.1.1. PROPIEDADES ÓPTICAS

Los valores de las propiedades ópticas: absorbancia y transmitancia de la luz del espectro visible y ultravioleta, así como el índice de refracción (IR) del hidrogel de PEGDA de los implantes empleados en los grupos 3, 4 y 5 del estudio fueron los siguientes:

1. ABSORBANCIA DE LA LUZ:

- Ultravioleta (250-400 nm de λ): de 1,57 a 0,06 (en cada franja del espectro de luz ultravioleta)
- Espectro visible: (450-700 nm de λ): de 0,04 a 0,03 (en cada franja del espectro de luz visible)

2. TRANSMITANCIA DE LA LUZ (%):

- Ultravioleta (250-400 nm de λ): del 2,92% a 93,54% (en cada franja del espectro de luz ultravioleta).
- Espectro visible: (450-700 nm de λ): del 98,86% al 99,31% (en cada franja del espectro de luz visible).

3. ÍNDICE DE REFRACCIÓN (IR): $1,3503 \pm 0,0002$

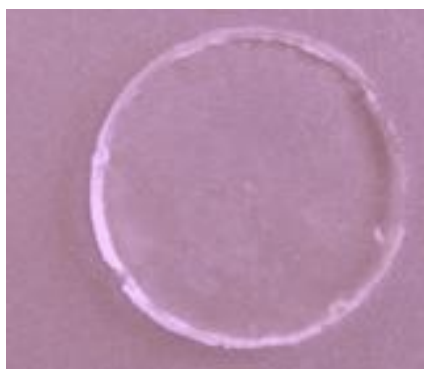
1.1.2. COEFICIENTE DE DIFUSIÓN DE LA PERMEABILIDAD A LA GLUCOSA (D)

Los valores del coeficiente de difusión de la córnea de conejo *ex vivo* y del hidrogel de PEGDA al 30% fueron los siguiente:

- Córnea de conejo *ex vivo*:
 $D=1,87 \times 10^{-9} \pm 0,32 \times 10^{-9} \text{ (cm}^2/\text{s)}$
- Hidrogel de PEGDA 30%:
 $D=1,11 \times 10^{-9} \pm 0,10 \times 10^{-9} \text{ (cm}^2/\text{s)}$

1.2. TAMAÑO Y FORMA DE LOS IMPLANTES

Los prototipos de implante que finalmente se fabricaron para ser implantados en las córneas de conejo presentaban las siguientes características.



Diámetro: 4 mm
Espesor: 100 μm
Volumen: 1,885 μl

Figura 15. Implante de PEGDA

1.3. LIE CON MICROESFERAS DE PLGA-DEXAMETASONA

Los lentículos implantados en las córneas de los conejos del grupo 5 (grupo MESF) se desarrollaron mediante el mismo proceso de fabricación que los lentículos de los grupos 3 y 4. El hidrogel de PEGDA sintetizado para los implantes de los grupos 3 y 4 fue el mismo que se empleó para los implantes con microesferas encapsuladas. Los implantes se fabricaron tal y como se describe en el apartado 2.4 de material y métodos.

Por microscopía electrónica de barrido (SEM) se pueden apreciar las características morfológicas de las microesferas a 100 y 300 aumentos: la superficie lisa, su morfología redondeada y la ausencia de deformidades (ver Figura 15).

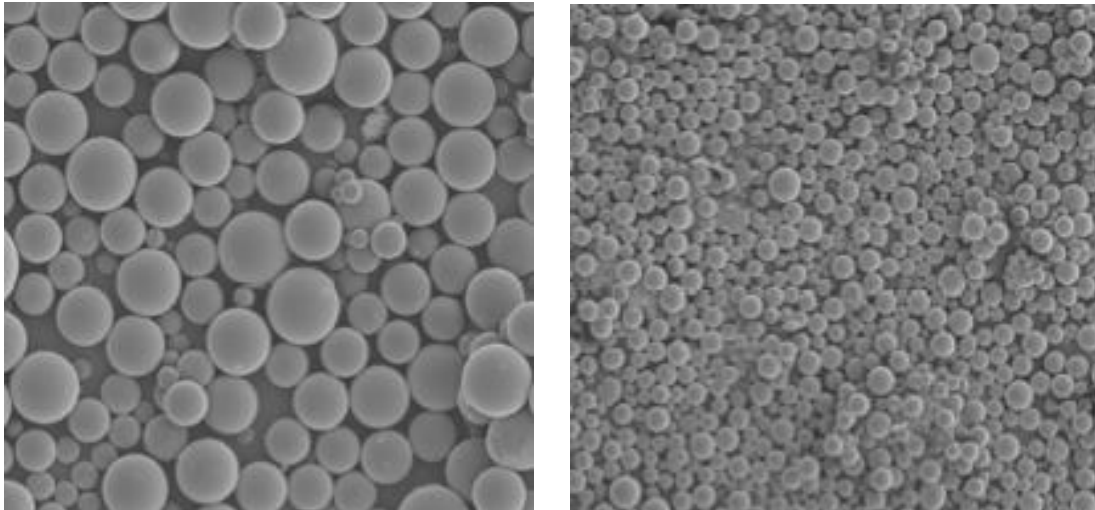


Figura 16. Imagen por microscopía electrónica de las microsferas a 100 y 300 aumentos. (Cortesía de la Dra Iratxe Madarieta)

Tabla 8. Características de los implantes con microsferas de PLGA-Dexametasona (grupo 5).

1. Diámetro medio de las microsferas: $1,49 \pm 0,1 \mu\text{m}$
2. Porcentaje de microsferas en el hidrogel: 14% p/p respecto del PEGDA
3. Carga de Dexametasona en las microsferas: $20,8 \pm 11,2 \mu\text{g/mg}$
4. Porcentaje teórico de dexametasona del implante: $1,35 \mu\text{g/ml}$
5. Eficacia de la encapsulación: $22,8 \pm 12,3\%$
6. Proporción de PLGA (ácido D, L-láctico: ácido glicólico)= 50:50

2. CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN Y DEL PESO

Durante el seguimiento no se detectaron complicaciones relacionadas con la alimentación ni se evidenció la presencia de patología sistémica alguna que condicionara cambios en el peso de los animales. Ninguno de los animales de los grupos 1 a 5 murió ni presentó signos de enfermedad intercurrente durante los meses de seguimiento. La media de los pesos de los conejos en cada uno de los tiempos de evaluación se muestran en la tabla 9. En la figura 17 se describe la progresión del peso medio de cada uno de los grupos en los diferentes tiempos de exploración.

No hubo diferencias en el peso medio preoperatorio de los conejos entre los diferentes grupos ($p=0,352$). Todos los grupos presentaron un incremento progresivo del peso medio de los conejos desde el preoperatorio hasta los 2 meses. Solo en la revisión realizada al día siguiente de la intervención quirúrgica se detectó un ligero descenso del peso medio de los conejos en todos los grupos que se atribuyó al estrés quirúrgico. No hubo diferencias entre los grupos en el modelo lineal genaral de medidas repetidas para la comparación del peso medio en los diferentes tiempos de seguimiento (preoperatorio, día 1, 7, 15 y 30) con el peso medio a los 60 días. Los valores de p para la comparación de las medias del peso en cada revisión con las medias del día 60 fueron: $p=0,81$, $p=0,79$, $p=0,45$, $p=0,72$ y $p=0,3$ para el preoperatorio y los días 1, 7, 15 y 30, respectivamente.

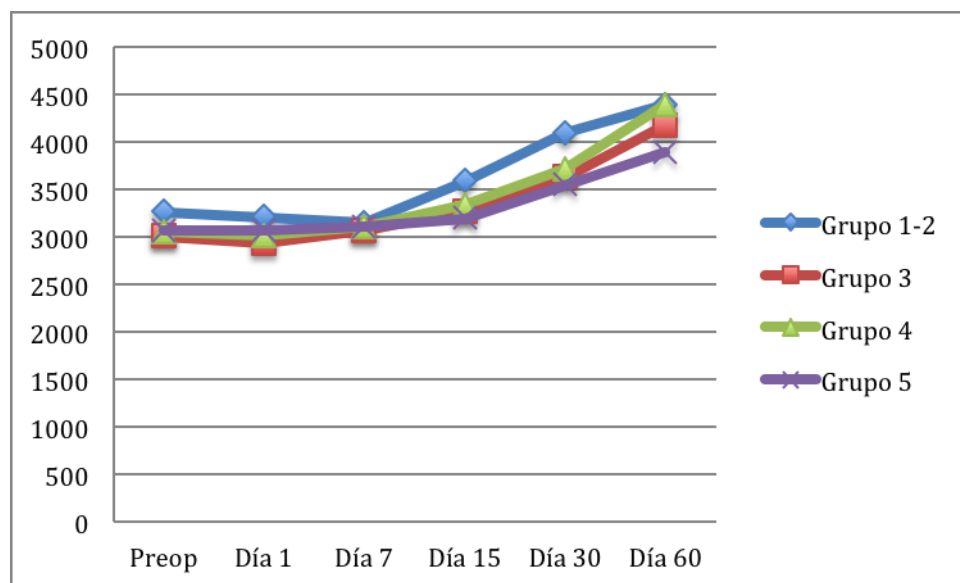


Figura 17: Evolución del peso medio (gramos) a lo largo del tiempo (días) en cada uno de los grupos.

TABLA 9. Peso medio de cada grupo de conejos y desviación estándar (DE) en cada uno de los diferentes tiempos posoperatorios

	Preoperatorio		Día 1		Día 7		Día 15		Día 30		Día 60	
	peso	DE	peso	DE	peso	DE	peso	DE	peso	DE	peso	DE
Grupo 1-2	3271,4	205,89	3211,9	196,81	3145	810,61	3594,4	175,88	4096,9	192,15	4400	222,7
Grupo 3	3011,9	149,08	2940,5	148,81	3073,8	245,53	3271,1	237,44	3635,3	199,52	4182,7	245,4
Grupo 4	3053,8	66,02	3015,4	103,68	3108,3	68,92	3340	154,11	3712,5	146,34	4391,7	378,7
Grupo 5	3066,7	76,38	3066,7	83,34	3116,7	316,7	3200	150	3550	300	3900	-

Tabla 9: Peso medio (en gramos) y su desviación estándar (DE) en cada uno de los grupos en los diferentes tiempos de evaluación.

3. TÉCNICA QUIRÚRGICA

3.1. MEDIDAS INTRAOPERATORIAS

3.1.1 MEDIDA DE LOS TIEMPOS QUIRÚRGICOS

La duración media de los procedimientos quirúrgicos (en minutos) en cada uno de los grupos se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Duración media del acto quirúrgico

	Media	DE	Mediana	RI	Rango
Grupo 2	6,38	1,43	6	5-7	5-10
Grupo 3	7,57	2,48	7	5,5-9	5-12
Grupo 4	7,31	2,69	6	6-8,5	5-14
Grupo 5	6,33	2,31	5	-	5-9

Tabla 10. Media, desviación estándar (DE), mediana, rango intercuartílico (RI) y rango de la duración de la cirugía en cada uno de los grupos (en minutos).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de duración de la cirugía entre los diferentes grupos con un valor de $p=0,73$ en el test de Kruskal-Wallis. El análisis individual entre grupos tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas, con valores de $p=0,31$ para la diferencia entre el tiempo de duración entre los grupos 2 y 3, $p=0,634$ entre grupos 2 y 4, $p=1,0$ entre grupos 2 y 5, $p=0,99$ entre grupos 3 y 4, $p=0,79$ entre grupos 3 y 5 y $p=0,9$ entre grupos 4 y 5.

3.1.2. LONGITUD DE LA INCISIÓN

La longitud media (en milímetros), la mediana, el rango intercuartílico (RI) y el rango de las incisiones corneales en cada uno de los grupos se muestran en la tabla 11. La comparación de la media de las longitudes de la incisión entre los grupos mediante el test de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p=0,019$. Al analizar las diferencias entre grupos de forma individual, solo las diferencias entre los grupos 2 y 5 resultaron estadísticamente significativas con un valor de $p=0,018$, mientras que las diferencias en la longitud de la incisión corneal entre el resto de grupos mostró valores de $p=0,12$ (grupos 2 y 3), $p=0,23$ (grupos 2 y 4), $p=1,0$ (grupos 3 y 4), $p=0,24$ (grupos 3 y 5) y $p=0,25$ (4 y 5).

Tabla 11. Longitud de la incisión

	Media	DE	Mediana	RI	Rango
Grupo 2	3,48	0,54	3,5	3-4	2,5-4,5
Grupo 3	3,86	0,62	4	3,25-4,5	3-4,5
Grupo 4	3,85	0,43	4	3,75-4	3-4,5
Grupo 5	4,5	0,5	4,5		4-5

Tabla 11. Media, desviación estándar (DE), mediana, rango intercuartílico (RI) y rango de las incisiones corneales en cada uno de los grupos (en milímetros).

3.1.3. DIÁMETRO DEL BOLSILLO ESTROMAL

El diámetro medio del bolsillo intraestromal (en milímetros), la mediana, el rango intercuartílico (RI) y el rango en cada uno de los grupos se muestran en la tabla 12.

El análisis del diámetro del bolsillo intraestromal entre grupos mediante el test de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos con un valor de $p<0,001$. Al analizar las diferencias entre grupos de forma individual, solo las diferencias entre los grupos 2 y 3 ($p<0,001$) y entre los grupos 4 y 3 ($p<0,001$) resultaron estadísticamente significativas. Las diferencias entre las medias del diámetro del bolsillo entre el resto de grupos no resultaron estadísticamente significativas con valores de $p=0,87$ para la diferencia entre los grupos 2 y 4, $p=0,98$ entre los grupos 2 y 5, $p=0,204$ entre los grupos 3 y 5 y $p=0,86$ entre los grupos 4 y 5.

Tabla 12. Diámetro del bolsillo estromal

	Media	DE	Mediana	RI	Rango
Grupo 2	8,98	0,49	9	8,75-9,25	8-10
Grupo 3	8,14	0,53	8	8-8,5	7-9
Grupo 4	9,11	0,86	9	8,75-9,75	8-10
Grupo 5	8,83	0,74	9		8-9,5

Tabla 12. Media, desviación estándar (DE), mediana, rango intercuartílico (RI) y rango de los diámetros del bolsillo intraestromal en cada uno de los grupos (en milímetros).

3.1.4. PROFUNDIDAD DEL BOLSILLO ESTROMAL

La profundidad a la que se planificó la disección del bolsillo corneal fue de 250 μm en todos los grupos. La profundidad real a la que se disecó el bolsillo estromal se analizó por MCIV y mediante técnicas histológicas de las córneas *ex-vivo* (ver apartado 7.3.2).

4. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS CLINICOS BIOMICROSCÓPICOS



Figura 18. Secuencia en imágenes de 4 casos correspondientes a ojos de los grupos 2, 3, 4 y 5 (de arriba a abajo). En cada fila se muestran, de izquierda a derecha, fotografías de un mismo caso de cada grupo en el preoperatorio, a la semana, a las 2 semanas, al mes y a los 2 meses tras la cirugía. Se pueden apreciar la transparencia corneal, la estabilidad, el centrado y la transparencia del implante, así como la ausencia de complicaciones.

4.1. ESTUDIO BIOMICROSCÓPICO

Se realizó un control biomicroscópico y fotográfico de cada uno de los casos a lo largo del seguimiento y se anotaron las características biomicroscópicas de la córnea, conjuntiva y del implante intraestromal en la hoja de seguimiento. En la figura 18 se muestran ejemplos de la secuencia posquirúrgica: preoperatorio, una semana, dos semanas, un mes y dos meses tras la cirugía en cuatro casos correspondientes a los grupos 2, 3, 4 y 5.

4.1.1. CONJUNTIVA

4.1.1.1. Hiperemia conjuntival

El porcentaje de casos con hiperemia conjuntival en cada grupo en los diferentes tiempos de evaluación así como el valor p para la comparación de estos porcentajes entre grupos en cada uno de los tiempos (chi-cuadrado) se muestra en la tabla 13.

En relación al grado de hiperemia, todos los casos, a excepción de tres, presentaron una hiperemia leve (grado 1). Los tres casos en los que la hiperemia fue de grado 2 corresponden al caso 216 del grupo 2, y a los casos 310 y 311 del grupo 3. Esta mayor hiperemia conjuntival ocurrió a la semana de la cirugía en los casos 216 y 311 y a las dos semanas en el caso 310. Como se describe más adelante en el apartado 4.1.1 (Análisis global de los marcadores de inflamación) los tres casos con hiperemia grado 2 ocurrieron en el contexto de inflamaciones más severas junto con neovascularización, edema e infiltración estromal.

Tabla 13. Hiperemia conjuntival

	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Valor p
Día 1	61,9%	71,4%	41,7%	0%	0,068
Día 7	35%	33,3%	0%	0%	0,077
Día 15	10,1%	28%	0%	0%	0,22
Día 30	0%	12,5%	0%	0%	0,36
Día 60	0%	7,10%	0%	0%	0,69

Tabla 13. Porcentaje de casos con hiperemia conjuntival en cada uno de los grupos en los diferentes tiempos de seguimiento y valor p para la comparación de los porcentajes entre grupos en cada uno de los tiempos de evaluación.

Al comparar el porcentaje de casos de hiperemia conjuntival entre los casos tratados con corticoides (grupos 4 y 5) y sin corticoides (grupos 2 y 3), encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al día y a la semana de la cirugía: $p=0,026$ y $p=0,006$, respectivamente. Por el contrario, la diferencia entre grupos no resultó estadísticamente significativa: $p=0,12$, $p=0,58$ y $p=0,8$ a los 15, 30 y 60 días, respectivamente (Prueba exacta de Fisher).

Comparando el porcentaje de casos de hiperemia entre los casos con LIE (grupos 3, 4 y 5) y los casos sin LIE (grupo 2), no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con valores de $p=0,42$, $p=0,17$, $p=0,48$, $p=0,39$ y $p=0,61$ a los días 1, 7, 15, 30 y 60, respectivamente (prueba exacta de Fisher).

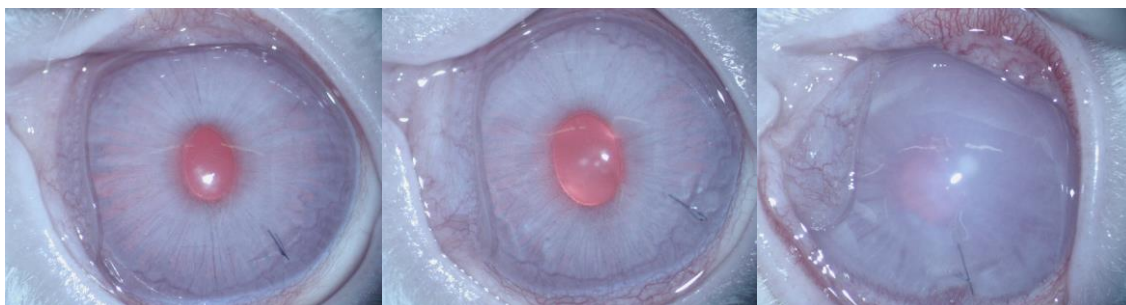


Figura 19. Imágenes de los casos 214, 212 y 216 (grupo 2) a la semana de la intervención en las que se aprecia una hiperemia grado 0, grado 1 y grado 2 respectivamente. La hiperemia en el caso 216 se asocia a edema, vascularización e infiltración estromal.

4.1.1.2. Secreción conjuntival

El porcentaje de casos con secreción conjuntival en cada grupo en los diferentes tiempos de evaluación, así como el valor p para la comparación de estos porcentajes entre grupos en cada uno de los tiempos (chi-cuadrado) se muestra en la tabla 14. No se observó ningún caso de secreción conjuntival en los días 30 y 60 de seguimiento.

Las secreciones conjuntivales se caracterizaron por ser mucosas, blanquecinas y leves en cantidad en todos los casos analizados, con la única excepción del caso 216 a la semana de la cirugía, en el que las secreciones presentaban las mismas características pero fueron más abundantes en cantidad. En términos generales, la secreción conjuntival se observó en el contexto de una inflamación conjuntival posoperatoria y asociada a otras manifestaciones clínicas. Al comparar el porcentaje de casos de secreción conjuntival entre los grupos tratados con corticoides (grupos 4 y 5) y sin corticoides (grupos 2 y 3), no encontramos diferencias estadísticamente significativas con valores de $p=0,084$, $p=0,418$, $p=1$, $p=1$ y $p=1$ a los días 1, 7, 15, 30 y 60, respectivamente (prueba exacta de Fisher). Al

comparar el porcentaje de casos de secreción conjuntival entre los casos con LIE (grupos 3, 4 y 5) y los casos sin LIE (grupo 2), encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al día de la cirugía ($p=0,024$) mientras que éstas no resultaron estadísticamente significativas a los días 7, 15, 30 y 60 ($p=0,056$, $p=1$, $p=1$ y $p=1$, respectivamente) (prueba exacta de Fisher).

Tabla 14. Secreción conjuntival

	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Valor p
Día 1	42,9%	19%	7,7%	0%	0,068
Día 7	35%	10%	8,3%	0%	0,077
Día 15	0%	5,5%	0%	0%	0,68
Día 30	0%	0%	0%	0%	1
Día 60	0%	0%	0%	0%	1

Tabla 14. Porcentaje de casos con secreción conjuntival en cada uno de los grupos en los diferentes tiempos de seguimiento y valor p para la comparación de los porcentajes a lo largo del seguimiento en cada grupo.

4.1.2. ESTROMA

4.1.2.1. Edema corneal

Al analizar el grado de edema corneal posoperatorio se vio que doce de los veintinueve casos (57,1%) del grupo 2, cinco de los veintinueve casos (23,8%) del grupo 3, uno de los doce casos (8,3%) del grupo 4 y ningún caso (0%) del grupo 5 presentó algún grado de edema corneal el día siguiente a la cirugía. En todos los casos, el edema fue de grado 1 salvo en un caso del grupo 2 (caso 216) en el que el edema fue severo (grado 3) (ver Figura 19-C). Esta diferencia en el porcentaje de casos de edema entre grupos al día de la cirugía resultó estadísticamente significativa con un valor de $p=0,01$ (chi-cuadrado). A la semana de la cirugía el número de ojos que presentaron edema estromal fue de ocho de veinte (40%) en el grupo 2, nueve de veintinueve (42,9%) en el grupo 3, uno de doce (8,3%) en el grupo 4 y ningún caso (0%) en el grupo 5. En todos los casos el edema fue de grado 1 salvo en el mismo caso del grupo 2 (caso 216) y en dos casos del grupo 3 (311 y 321) en los que el edema corneal fue moderado o severo (grados 2-3). Esta diferencia entre grupos a la semana de la cirugía resultó estadísticamente significativa ($p=0,04$) (chi-cuadrado). A las dos semanas de la cirugía, se observó edema corneal en dos de dieciocho casos (11,1%) en el grupo 2, seis de diecinueve casos (31,6%) en el grupo 3, 0% de casos en el grupo 4 y uno de tres casos en el grupo 5 (33,3%). De todos ellos, dos de los casos del grupo 2

(casos 308 y 310) fueron edemas corneales moderados o severos (grados 2-3) ($p=0,09$; chi-cuadrado). Al mes de la cirugía, solo un caso en el grupo 3 (caso 314) presentó edema corneal y a los dos meses, ningún caso de ninguno de los grupos presentó edema. Estas diferencias del porcentaje de casos de edema entre grupos al mes y a los dos meses de la cirugía no resultaron estadísticamente significativas.

Al comparar el porcentaje de casos de edema entre los casos tratados con corticoides (grupos 4 y 5) y sin corticoides (grupos 2 y 3), encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al día de la cirugía ($p=0,013$) y a la semana de la cirugía ($p=0,012$), mientras que la diferencia entre grupos no resultó estadísticamente significativa ($p=0,28$, $p=0,41$ y $p=1$) a los 15, 30 y 60 días, respectivamente (prueba exacta de Fisher). Comparando el porcentaje de casos de edema entre los ojos con LIE (grupos 3, 4 y 5) y sin LIE (grupo 2), encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al día de la cirugía $p=0,002$ mientras que la diferencia entre grupos no resultó estadísticamente significativa ($p=0,26$, $p=0,27$, $p=0,39$ y $p=1$) a los 7, 15, 30 y 60 días, respectivamente (prueba exacta de Fisher).

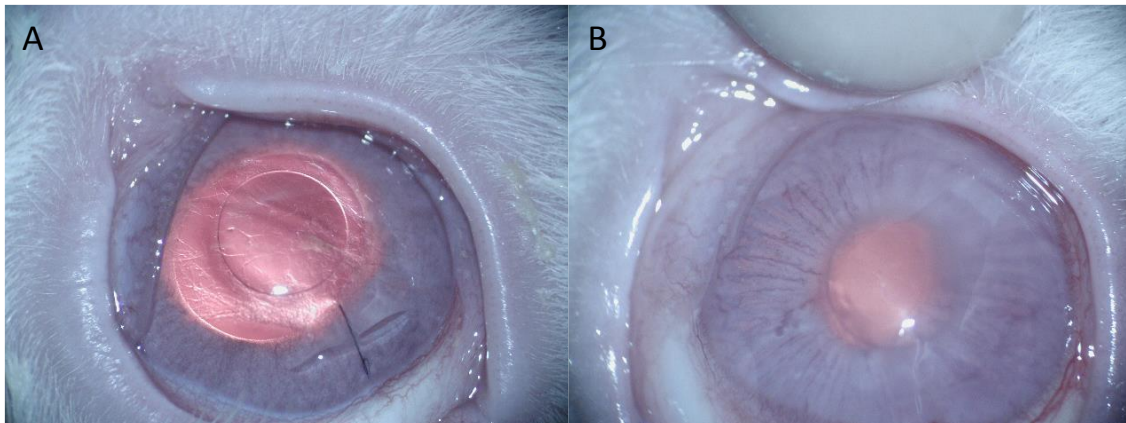


Figura 20. Ejemplo de 2 casos del grupo 3 con edema corneal grado 1 y 2. A) Edema corneal grado 1 al día siguiente de la cirugía. B) Edema corneal grado 2 a la semana de la cirugía

4.1.2.2. Neovascularización corneal

Cinco de los setenta y siete casos analizados (6,3%) presentaron algún grado de neovascularización corneal (NVC). De entre todos ellos, un caso (caso 216) pertenecía al grupo 2, mientras que los cuatro casos restantes (casos 305, 310, 311 y 314) pertenecían al grupo 3. Ninguno de los casos de los grupos 1, 4 y 5 desarrolló NVC. La presencia de NVC se observó a la semana de la cirugía en dos de los casos (casos: 216 y 305) mientras que

RESULTADOS

en los tres restantes (casos: 310, 311 y 314) la NVC no fue visible hasta las dos semanas tras la cirugía.

Al comparar la presencia de casos de NVC entre los grupos, excluyendo el grupo 1 (control) en el que no se realizó ningún tipo de procedimiento quirúrgico, observamos que todos ellos ocurrieron en los grupos en los que no se empleó tratamiento con dexametasona para el control de la inflamación. Esta diferencia en la incidencia global de NVC entre los grupos con y sin tratamiento corticoideo no resultó estadísticamente significativa ($p=0,2$). Al comparar la incidencia de NVC entre los casos tratados con corticoides (grupos 4 y 5) y sin corticoides (grupos 2 y 3) en cada tiempo posoperatorio, tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas $p=0,556$, $p=1$, $p=1$, $p=1$ y $p=1$ a los 1, 7, 15, 30 y 60 días, respectivamente, entre los grupos a estudio en ninguno de los tiempos de seguimiento (Prueba exacta de Fisher).

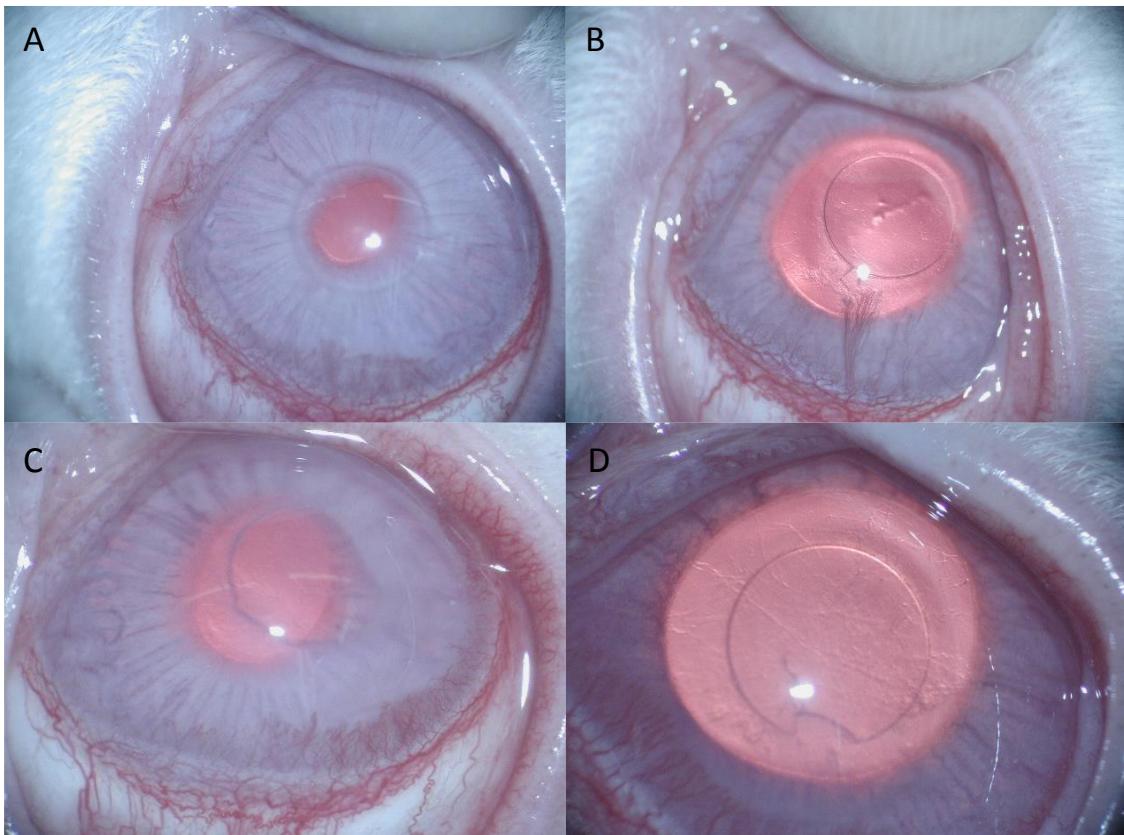


Figura 21. A y B: imágenes correspondientes al caso 305 a la semana y 2 semanas de la cirugía. A: NVC periférica (grado 1) a la semana tras la implantación del lente. B: NVC (grado 2) a los 15 días tras la cirugía con afectación de la córnea central junto al borde del lente. C y D: imágenes correspondientes a los casos 311 y 314 a la semana y a los 15 días tras la cirugía, respectivamente. C: NVC periférica (grado 1) a la semana tras la implantación del lente en el caso 311. D: caso 314 a los 15 días tras la cirugía en el que se observa una NVC (grado 2).

4.1.2.3. **Infiltración corneal**

A lo largo del seguimiento se observaron dos casos de infiltración estromal. El primero de ellos ocurrió en un caso del grupo 2 (caso 216) y se detectó a la semana de la intervención. El segundo caso correspondió a un caso del grupo 3 (caso 310) y se detectó en la revisión a las dos semanas tras la cirugía (ver Figura 22). En ambos casos, la infiltración estromal se caracterizó por la presencia de un área grisácea con mayor o menor opacidad estromal y asociada a edema corneal. Ninguno de los dos casos asoció un defecto epitelial ni adelgazamiento estromal y no se observó necrosis ni lisis del estroma anterior. En ambos casos se pudo apreciar la existencia de NVC (más central en el caso 310), así como de hiperemia conjuntival y secreción blanquecina.

En el análisis global por grupos se observó que los casos de infiltración estromal fueron uno de veintiuno (4,75%) en el grupo 2, uno de veintiuno (4,75%) en el grupo 3, cero de trece (0%) en el grupo 4 y cero de tres (0%) en el grupo 5. La comparación del porcentaje de casos con infiltración estromal entre grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,2$) en el modelo lineal general de medidas repetidas.

Ante la presencia de una infiltración estromal de estas características, se procedió a tomar muestras para cultivo microbiológico, tanto fúngico como bacteriológico, con el fin de descartar una queratitis infecciosa. Los resultados del cultivo resultaron negativos en ambos casos, lo que impidió confirmar el origen infeccioso de la queratitis. En ambos casos, se decidió sacrificar el animal y se procedió a la extracción de las córneas para su evaluación histológica y por RT-qPCR. (Ver apartado 7.5)

4.1.2.4. **Úlcera y adelgazamiento corneal**

No se observó ningún caso de adelgazamiento estromal biomicroscópicamente apreciable a lo largo del seguimiento en ninguno de los ojos de los cinco grupos. Estos hallazgos clínicos fueron compatibles con los resultados obtenidos por paquimetría ultrasónica en los que se vio que ninguno de los ojos presentó un adelgazamiento corneal en comparación con la paquimetría preoperatoria (ver apartado 5.1). En relación a la aparición de úlceras corneales, cabe destacar que en ninguno de los 79 casos de los cinco grupos a estudio se apreció la existencia de defectos epiteliales ni de úlceras corneales a lo largo del seguimiento.

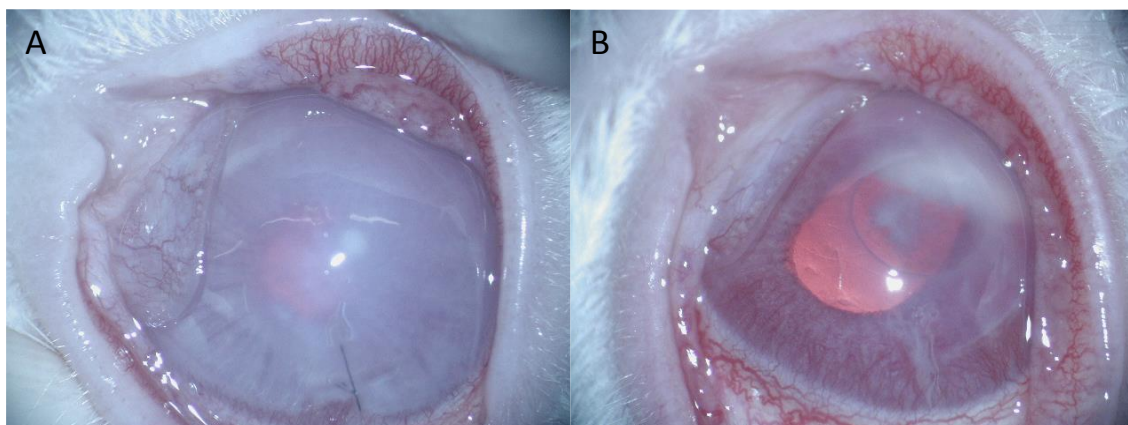


Figura 22. Imágenes A y B correspondientes a los casos 216 y 310 a la semana y a los 15 días tras la intervención, respectivamente, en los que se aprecia un infiltrado estromal asociado a edema y NVC.

4.1.2.5. Necrosis y lisis estromal

No hallamos ningún caso de necrosis estromal asociado a la técnica quirúrgica ni al implante de LIE en ninguno de los grupos. Tampoco hubo casos de lisis del estroma anterior ni de extrusión de los implantes a lo largo del seguimiento.

4.1.3. ENTRECARA

Tal y como se ha mencionado en el apartado 4.1.1, el nivel de transparencia corneal observado nos permitió valorar el estado de la interfase disecada en el estroma corneal de todos los casos salvo en dos (216 y 310) en los que se objetivó la existencia de una queratitis intersticial con infiltración estromal y en los que evaluar el estado de la interfase no fue posible. En el resto de casos en los que la entrecara se visualizaba correctamente no hallamos ningún caso con depósitos en la interfase ni de *haze* biomicroscópicamente visible asociado a la interfase durante el seguimiento.

4.1.4 ANÁLISIS GLOBAL DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN

Al analizar de forma conjunta los signos de inflamación se observó que en conjunto, hubo seis casos con inflamación moderada-severa entendiendo como tal aquellos casos que presentaron dos o más de los signos biomicroscópicos enumerados en la tabla 15.

Los ojos con inflamación severa se correspondieron con el caso 216 en el grupo 2 y el caso 310 en el grupo 3. Los casos 303, 305, 308, 311 y 314 del grupo 3 presentaron signos de inflamación moderada.

Tabla 15. Signos biomicroscópicos de inflamación moderada o severa.

1. Edema corneal moderado o severo
2. Neovascularización corneal
3. Infiltración estromal
4. Hiperemia conjuntival extensa
5. Secreción conjuntival profusa
6. Úlcera corneal
7. *Melting* corneal
8. Perforación

4.2. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS Y DEL COMPORTAMIENTO DE LAS LENTES INTRAESTROMALES

4.2.1. TRANSPARENCIA DE LOS IMPLANTES

Las lentes implantadas en las córneas de los conejos de los grupos 3 y 4 fueron transparentes en el 100% de los casos en el momento de la implantación. En ningún caso hubo cambios en las características de la LIE en lo que se refiere a la transparencia a lo largo del seguimiento y éstas nos permitieron una adecuada visualización de las estructuras situadas por detrás de la lente. En ninguno de los casos en los que la transparencia de los medios se vio alterada impidiendo la adecuada visualización de las estructuras posteriores (casos 216, 305, 308, 310, 311 y 314), esto se debió a una alteración de las características de la transparencia del lentículo.

Las características de las lentes intraestromales implantadas en las córneas de los conejos del grupo 5 fueron diferentes a las implantadas en los ojos de los grupos 3 y 4 (ver Figuras 23 y 24). En éstas se pudo apreciar la presencia de acúmulos granulares correspondientes a las microesferas cargadas con dexametasona encapsuladas en el hidrogel. Estos acúmulos de microesferas modificaban las características de transparencia del hidrogel respecto de las lentes implantadas en los grupos 3 y 4, dando lugar a una opacidad local de los lentículos a ese nivel. Este aspecto granulado de los implantes permaneció estable

sin presentar cambios a lo largo de los dos meses de seguimiento. Las características del hidrogel fuera de los acúmulos de microesferas fueron similares a las de las LIE implantadas en las córneas de los grupos 3 y 4.

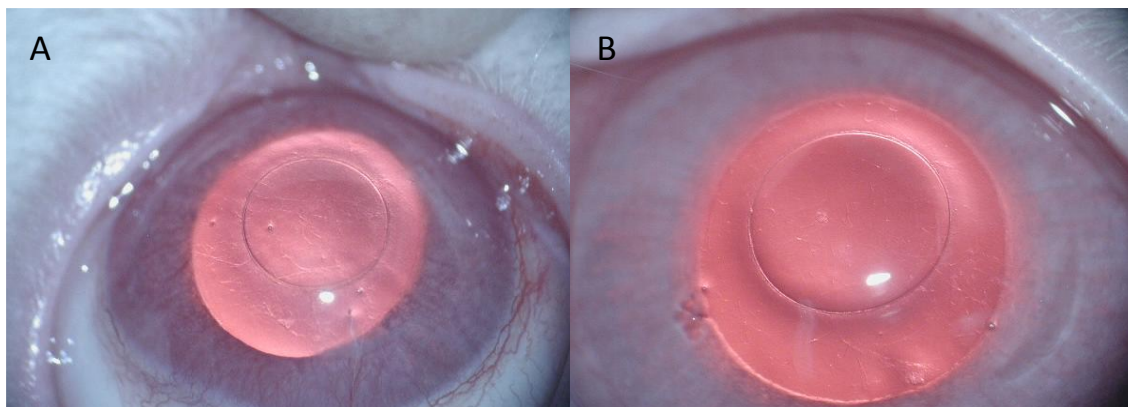


Figura 23. A y B: imágenes del caso 321 (grupo 3) y del caso 409 (grupo 4), respectivamente, en las que se aprecia el implante intraestromal transparente.

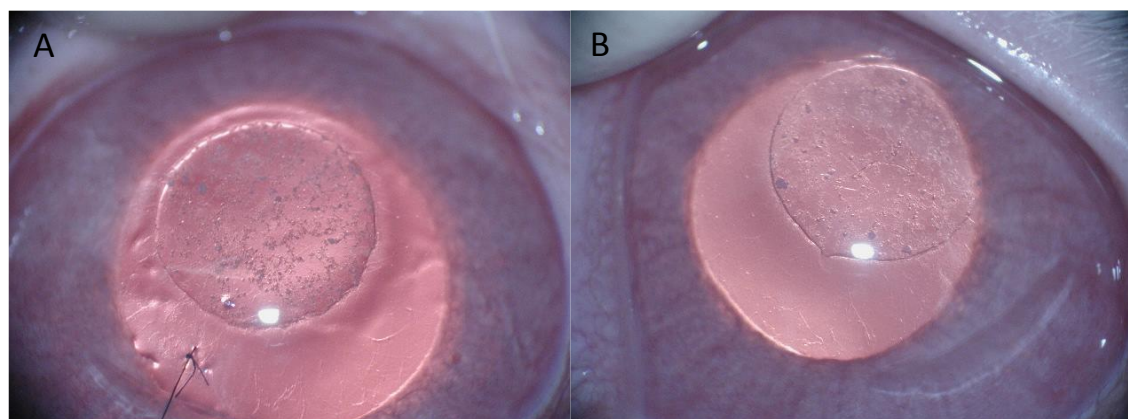


Figura 24. A y B: Imágenes de los casos 502 y 503 (grupo 5) a la semana y a los 30 días, respectivamente, en las que se aprecia la LIE con las microesferas encapsuladas que aportan un aspecto granuloso y modifican las características de transparencia del hidrogel.

4.2.2. DESCENTRAMIENTO Y DESPLAZAMIENTO DEL IMPLANTE

En el grupo 3, diez de los veintinueve casos (47,6%) presentaron algún grado de descentramiento del lentículo en el posoperatorio inmediato (casos 306, 308, 310, 311, 313, 316, 318, 319, 320 y 322). De todos ellos, ocho presentaron un descentramiento grado 1 (borde del lentículo dentro del ápex corneal) y en dos casos (311 y 313) se apreció un descentramiento grado 2 (borde del lentículo fuera del ápex corneal). En el grupo 4, seis de los trece casos (46,15%) presentaron algún grado de descentramiento del implante en el posoperatorio inmediato (casos 403, 406, 408, 410, 411, y 412). De entre todos estos, cuatro presentaron un descentramiento grado 1 y en los casos 403 y 411 se apreció

un descentramiento grado 2. En el grupo 5, uno de los tres casos (33,3%) (caso 501) presentó un descentramiento del implante grado 1. El porcentaje de casos de descentramiento de la lente en cada grupo fue similar, no hallando diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,78$).

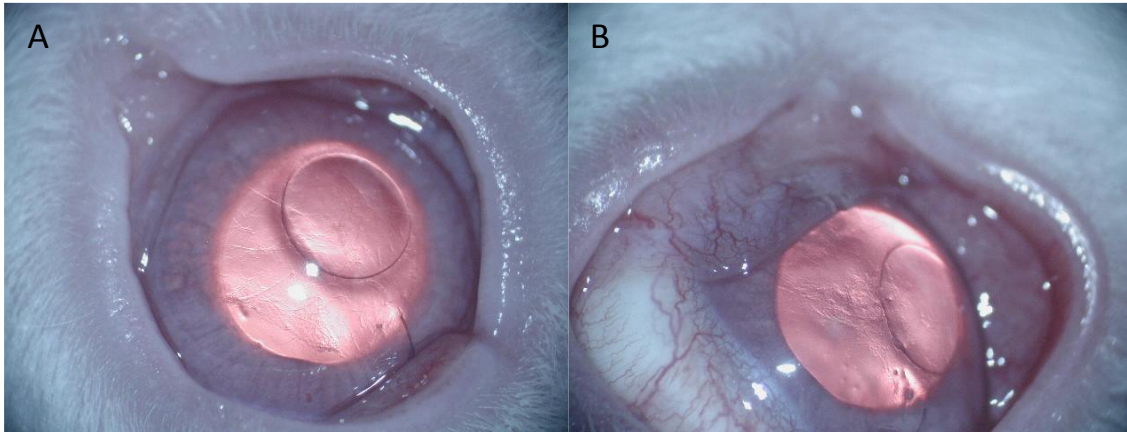


Figura 25. A y B: imágenes de los casos 308 y 311 a las 24 horas de la intervención, respectivamente, en las que se aprecia un descentramiento de los lentículos grado 1 (A) y grado 2 (B).

Al analizar la relación entre el descentramiento de las lentes y el desarrollo de NVC se observó que entre los veintidós casos en los que el implante estaba centrado hubo dos casos (9%) que desarrollaron NVC, mientras que de los quince casos en los que había algún grado de descentramiento, dos casos (13,3%) desarrollaron NVC. De entre éstos, uno de los once casos (9,1%) con descentramiento grado 1 desarrolló NVC, mientras que uno de los cuatro casos (25%) con descentramiento grado 2 desarrolló NVC. Estas diferencias entre grupos no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,62$).

Igualmente, se analizó la posición de las lentes intraestromales, así como los cambios en su posición a lo largo del seguimiento. En la práctica totalidad de los casos (diecinueve de veintiún casos en el grupo 3, doce de trece en el grupo 4 y tres de tres en el grupo 5) las lentes permanecieron estables en la misma posición en la que quedaron tras la cirugía. Esto ocurrió tanto en los casos en los que la lente quedó perfectamente centrada tras la cirugía como en aquellos casos en los que hubo un descentramiento grado 1. Observamos un desplazamiento del implante solo en 3 casos (ver Figura 26). De los cuatro casos en los que se apreció un grado de descentramiento tipo 2 en el posoperatorio inmediato, tres de ellos (casos 311, 313 y 403) presentaron cambios en la posición de la lente en la revisión a la semana y en revisiones sucesivas, pasando a mostrar un descentramiento grado 1. En el cuarto caso con un desplazamiento grado 2 (caso 411), la lente permaneció estable sin

presentar cambios en su posición a lo largo del seguimiento. No hemos hallado una asociación estadísticamente significativa entre el diámetro del bolsillo estromal y la aparición de un descentramiento de los implantes en todos los grupos con LIE ($p=0,384$).

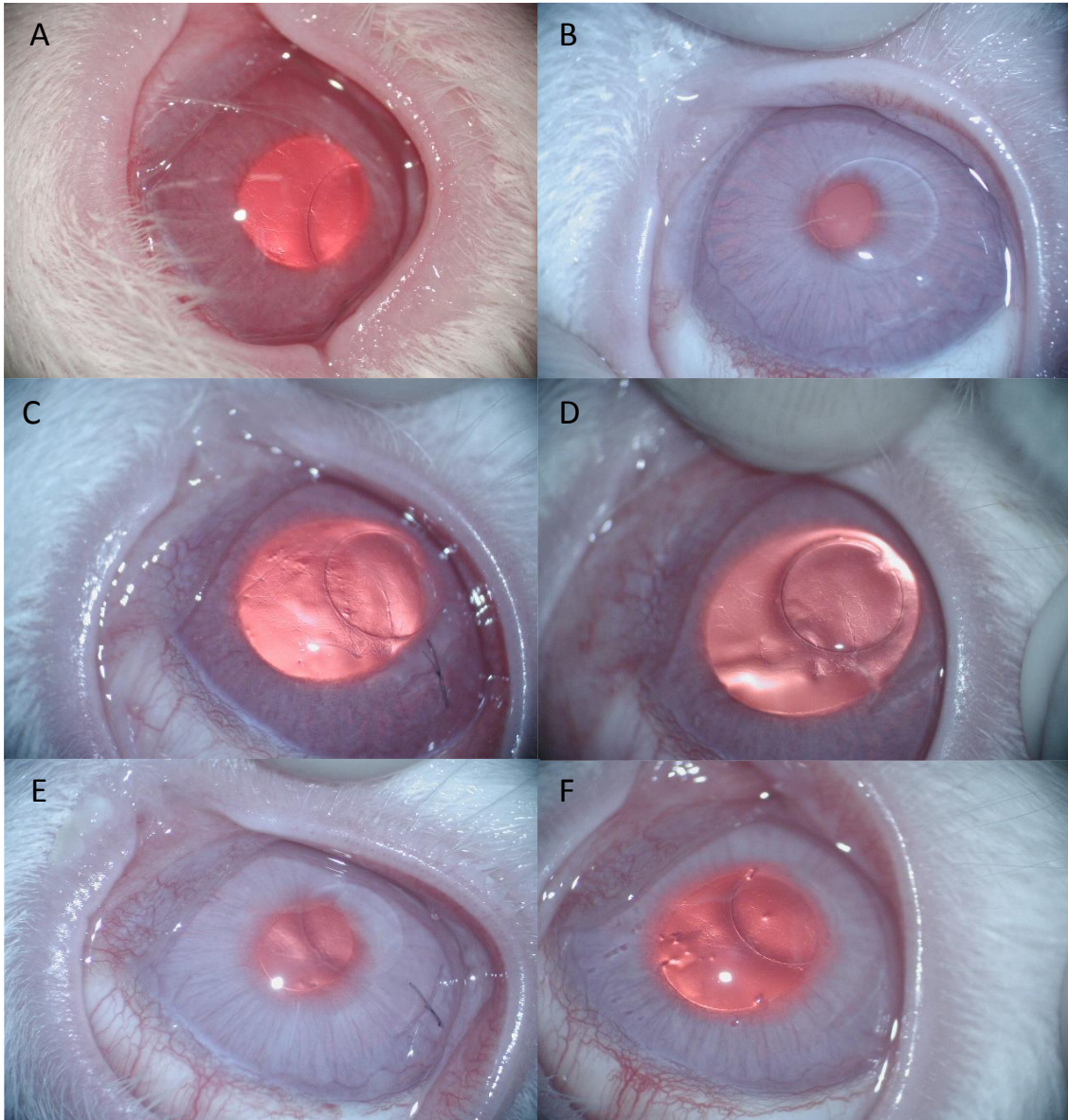


Figura 26. Imagen de los casos 313 (A y B) y 403 (C y D) y 411 (E y F) a las 24 horas y a los 15 días tras la intervención. En las imágenes a las 24 horas se puede apreciar un descentramiento grado 2 de los lentículos en los tres casos. En la imagen a los 15 días se observa que el desplazamiento es menor (grado 1) en los casos 313 y 403, mientras que en el caso 411, el grado de desplazamiento se mantiene estable en el tiempo.

4.2.3. DETERIORO E IRREGULARIDAD DE LOS IMPLANTES

Los lentículos implantados fueron circulares y sus bordes regulares en todos los casos a excepción de siete (casos 311, 314, 316 y 322 en el grupo 3, casos 403 y 408 en el grupo 4 y el caso 501 en el grupo 5), en los que se pudo apreciar alguna irregularidad en el contorno de las lentes. En todos ellos, las irregularidades consistieron en pequeñas muescas del reborde o pérdida de un pequeño fragmento periférico (ver Figura 27).

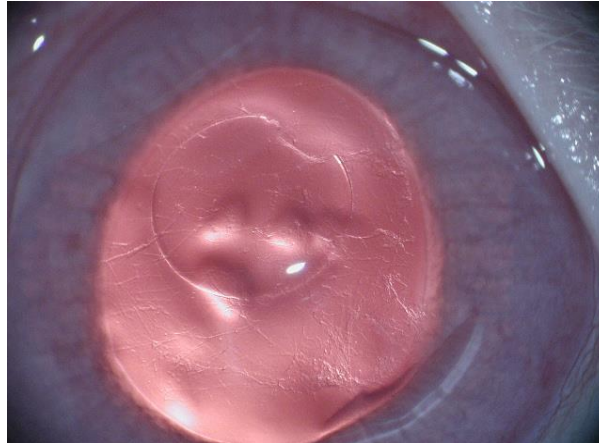


Figura 27. Imagen correspondiente al caso 408 a los 15 días de la intervención en la que se aprecia una muesca en el reborde de la lente.

En el caso 314 se produjo una fisura radial del lentículo en el momento de la implantación. Esta fisura se mantuvo estable a lo largo de las sucesivas revisiones sin presentar cambios en su forma ni en su extensión.

Al analizar la relación entre el deterioro de las lentes y el desarrollo de NVC, se observó que entre los 30 casos sin deterioro hubo dos casos (6,7%) que desarrollaron NVC, mientras que de los siete casos en los que había algún grado de deterioro, dos casos (28,6%) desarrollaron NVC. Esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p=0,244$). Globalmente, cuatro de los cinco casos con algún grado de NVC ocurrieron en los grupos en los que se implantó una LIE. De estos cuatro casos, dos (50%) ocurrieron en córneas en las que se implantó una lente que presentaba una irregularidad en su reborde (casos 311 y 314) (ver Figura 28). Tampoco hallamos una asociación entre las irregularidades del borde de la LIE y el desarrollo de edema corneal ($p=0,196$).

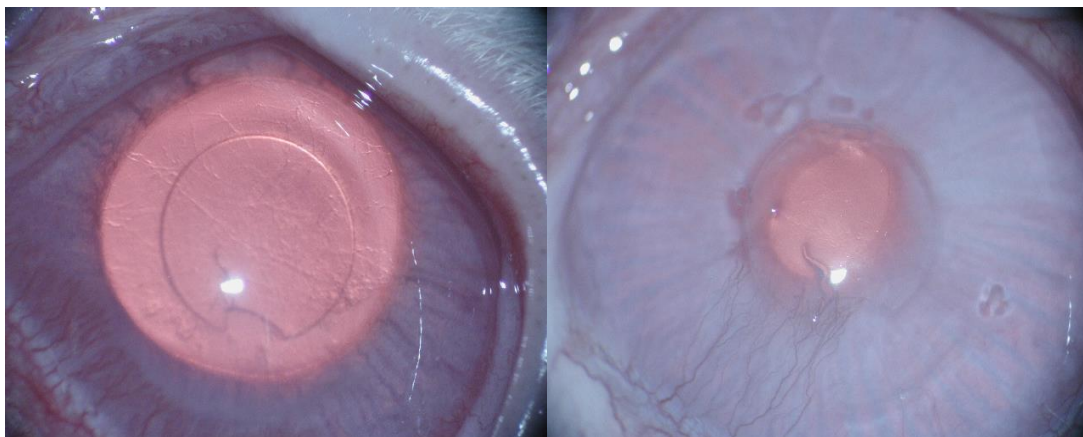


Figura 28. Imagen correspondiente al caso 314 a los 15 días (izquierda) y al mes (derecha) de la intervención en la que se aprecia una NVC progresiva asociada a la muesca y fisura del lentículo.

4.2.4. DEPÓSITOS

No se detectaron depósitos en las superficies anterior y posterior de los implantes en ningún caso de los grupos 3, 4 y 5 a lo largo del seguimiento.

4.2.5. MIGRACIÓN ANTERIOR Y EXTRUSIÓN DE LOS IMPLANTES

Las lentes intraestromales permanecieron estables a lo largo del seguimiento en todos los grupos. No se detectó ningún caso de migración anterior ni de extrusión del lentículo.

5. PAQUIMETRÍA

5.1. PAQUIMETRÍA ULTRASÓNICA

Se obtuvieron medidas de grosor corneal en todos los ojos de cada grupo en cada uno de los tiempos de exploración. Los grosores corneales medios medidos por paquimetría ultrasónica (PU) en micras (μm) para cada uno de los grupos en cada tiempo de estudio se muestran resumidos en la tabla 16.

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la paquimetría media preoperatoria entre grupos ($p=0,844$). Analizando cada uno de los grupos por separado, en el grupo 2 se apreció un incremento en la media del grosor corneal de $59,71 \mu\text{m}$ en el posoperatorio inmediato en comparación con el preoperatorio ($p<0,001$). Este incremento paquimétrico disminuyó en la revisión del día, manteniendo un grosor corneal comparable al preoperatorio en todas las exploraciones siguientes, con un valor de $p=0,238$ para la diferencia de la media entre el preoperatorio y los 2 meses. En los grupos 3, 4 y 5 (con LIE), apreciamos un incremento paquimétrico en el posoperatorio inmediato respecto del

preoperatorio de 139,43 μm , 182,23 μm y 159 μm , respectivamente, que, a diferencia del grupo 2, fue reduciéndose progresivamente sin volver a los valores observados en el preoperatorio. Así, la diferencia media (incremento) en la paquimetría entre el preoperatorio y los 60 días en los grupos 3, 4 y 5 fue de 99,11 μm , 117,1 μm y 83 μm , respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con valores de $p < 0,001$ y de $p = 0,01$ para los grupos 3 y 4, respectivamente. La figura 29 muestra la progresión del grosor corneal medio de cada grupo desde el preoperatorio hasta los 2 meses de seguimiento.

Tabla 16. Paquimetría ultrasónica

	Preop	Postop	Día 1	Día 7	Día 15	Día 30	Día 60
Grupo 1	404,1	-	-	-	-	-	-
Grupo 2	393,86	453,57	393,47	406,11	405,06	402,25	392
Grupo 3	406,38	545,95	541,38	597	640,58	518,47	505,27
Grupo 4	392,23	574,46	521,31	492,92	499,2	502,88	511,33
Grupo 5	398	557	481,67	479,33	505,5	492,5	481

Tabla 16. Grosor corneal medio (en μm), medido por PU, de cada grupo en los diferentes tiempos posoperatorios.

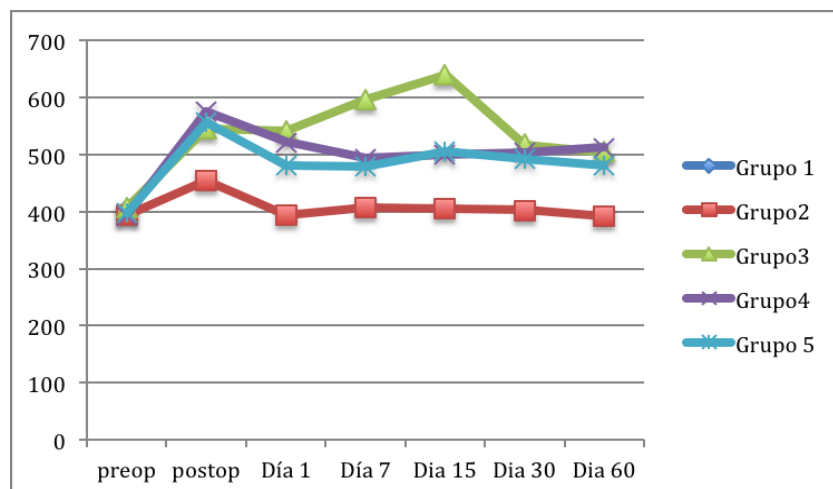


Figura 29. Evolución de la paquimetría (en μm) medida por PU a lo largo del tiempo (días) en cada uno de los grupos.

Al comparar entre sí los grosores corneales en los diferentes grupos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Los grupos 3, 4 y 5 presentaron valores de paquimetría media más altos que el grupo 2 en todos los momentos de exploración (salvo en el preoperatorio), siendo estas diferencias estadísticamente significativas para la comparación de medias con el grupo 3 ($p < 0,001$), el grupo 4 ($p < 0,001$) y el grupo 5 ($p = 0,048$), respectivamente. Entre los grupos con implante intraestromal (grupos 3, 4 y 5) no hubo diferencias estadísticamente significativas en el grosor corneal medio en los diferentes tiempos de seguimiento en el modelo lineal de medidas repetidas, con valores de $p = 0,11$ para la diferencia de medias entre los grupos 3 y 4; $p = 0,19$ para la diferencia de medias entre los grupos 3 y 5; y de $p = 0,59$ para la diferencia de medias entre los grupos 4 y 5.

Al analizar la paquimetría de cada uno de los grupos en los diferentes tiempos de seguimiento, observamos que en las exploraciones a los 7 y 15 días se aprecia un mayor grosor corneal medio en el grupo 3 (sin dexametasona) respecto de los grupos 4 y 5 tratados con dexametasona tópica o en microesferas de PLGA-dexametasona, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,001$ y $p = 0,003$ a los 7 y 15 días, respectivamente). Esta diferencia en el grosor corneal entre los grupos 3, 4 y 5 se normaliza a los 30 y 60 días tras la intervención, con diferencias que no resultan estadísticamente significativas ($p = 0,86$ y $p = 0,94$, respectivamente). Ninguno de los ojos intervenidos (grupos 2 a 5), presentó un adelgazamiento del grosor corneal total a los 60 días en comparación con el preoperatorio.

5.2. PAQUIMETRÍA MEDIDA POR MCIV

Se obtuvieron valores de grosor corneal medidos mediante MCIV-CS4 para los grupos 1, 2 y 3 a los 7, 30 y 60 días tras la intervención. La tabla 17 muestra los valores medios de grosor corneal en micras (μm) obtenidos mediante MCIV para cada uno de estos grupos en los citados momentos de exploración. Obtuvimos medidas válidas en todos los casos salvo en los casos 211 y 216 del grupo 2 y los casos 302 y 309 del grupo 3 en los que no se obtuvieron imágenes adecuadas para la obtención de medidas paquimétricas.

No observamos diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la media de las paquimetrías entre el preoperatorio y la revisión a los 7, 30 y 60 días ($p = 0,354$; $p = 0,27$ y $p = 0,446$, respectivamente) en el grupo 2. En el grupo 3 la diferencia en la media de las paquimetrías entre el preoperatorio y los días 7, 30 y 60 mostró valores de $p < 0,001$ en todos los tiempos a estudio.

Analizando cada grupo de forma aislada, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la paquimetría entre la exploración a los días 7, 30 y 60 en el grupo 2 (sin LIE). En el grupo 3, por el contrario, la diferencia en la media de las paquimetrías entre el día 7 y los días 30 y 60 mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$ y $p=0,024$, respectivamente), mientras que la comparación entre los valores medios de los días 30 y 60 no fue estadísticamente significativa ($p=0,76$).

Tabla 17. Paquimetría por MCIV

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	404,45	42,25	-	-	-	-
Grupo 2	378,29	22,18	380,36	14,39	380,57	25,69
Grupo 3	573,63	73,11	497,31	63,58	502	80,16

TABLA 17. Grosor corneal medio (en μm) y su desviación estándar medidos por MCIV para cada grupo en los diferentes tiempos posoperatorios.

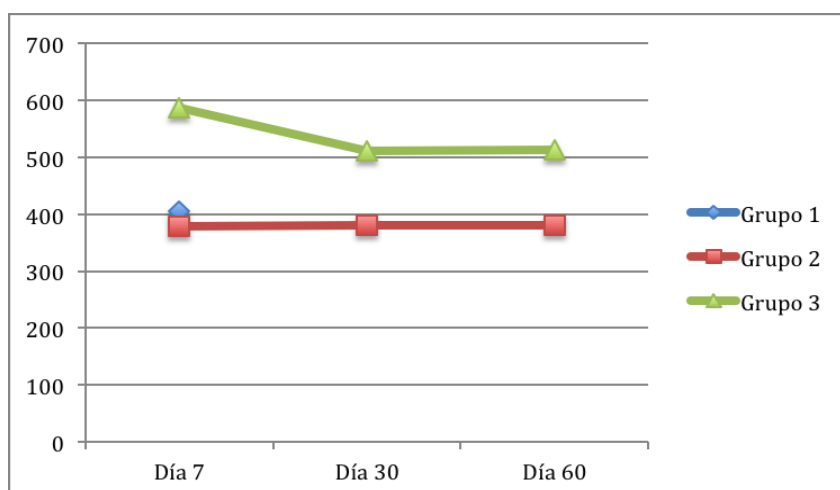


Figura 30. Evolución del grosor corneal (en μm) medido por MCIV en los grupos 1, 2 y 3 a los 7, 30 y 60 días.

5.3. COMPARACIÓN DE LA PAQUIMETRÍA MEDIDA POR ULTRASONIDOS Y MCIV

La estimación de la magnitud de la concordancia entre la paquimetría medida por ultrasonidos (PU) y la paquimetría medida por MCIV se realizó midiendo el coeficiente de correlación intraclass (CCI). El método de Bland Altman se utilizó para mostrar gráficamente el grado de concordancia entre técnicas. Los valores de las medidas promedio del CCI y su intervalo de confianza al 95% se resumen en la tabla 18.

Tabla 18. Comparación de la paquimetría ultrasónica y por MCIV.

	día 7		día 30		día 60	
	CCI	IC	CCI	IC	CCI	IC
Grupo 1	0,46	(-0,43 a 0,79)				
Grupo 2	0,19	(-0,37 a 0,61)	0,09	(-0,37 a 0,53)	0,57	(-0,18 a 0,88)
Grupo 3	0,95	(0,88 a 0,98)	0,94	(0,83 a 0,98)	0,89	(0,68 a 0,97)

Tabla 18. Coeficiente de correlación intraclass (CCI) (medidas promedio/*average measures*) entre paquimetría ultrasónica y paquimetría medida por MCIV y su intervalo de confianza (IC) al 95%.

Mediante los gráficos de Bland y Altman se analizó el grado de concordancia entre los diferentes métodos (US vs MCIV) empleados para la medida de la paquimetría corneal. Estos gráficos muestran la diferencia del grosor corneal medido por los dos instrumentos. Cada punto ilustra gráficamente la media de la paquimetría medida con ambos instrumentos para cada uno de los casos. La línea azul continua muestra la diferencia media (en μm) entre las medidas de paquimetría obtenidas mediante US y MCIV. Las líneas discontinuas rojas muestran los límites inferior y superior del intervalo de confianza al 95% establecidos como la media $\pm 1,96$ desviaciones estándar. En el eje x se marca el valor del grosor corneal medio de cada uno de los casos.

En las figuras 31-34 se muestra la media de las diferencias entre el grosor corneal medido por US y medido por MCIV por el método de Bland y Altman. La diferencia media analizando los casos de todos los grupos en común fue de $10,8 \mu\text{m}$ (mayor por PU que por MCIV). En el análisis por subgrupos se observaron diferencias medias de $-0,7 \mu\text{m}$ en el grupo 1, de $27,3 \mu\text{m}$ en el grupo 2 y de $14,6 \mu\text{m}$ en el grupo 3, respectivamente. El grado de concordancia entre ambas tecnologías, medido por la amplitud del IC 95%, osciló entre $80,4$ y $-58,8 \mu\text{m}$ para el análisis global, entre $79,7$ y $-81,1 \mu\text{m}$ en el grupo 1, entre $87,8$ y $-33,2 \mu\text{m}$ en el grupo 2 y entre 89 y $-59,9 \mu\text{m}$ en el grupo 3.

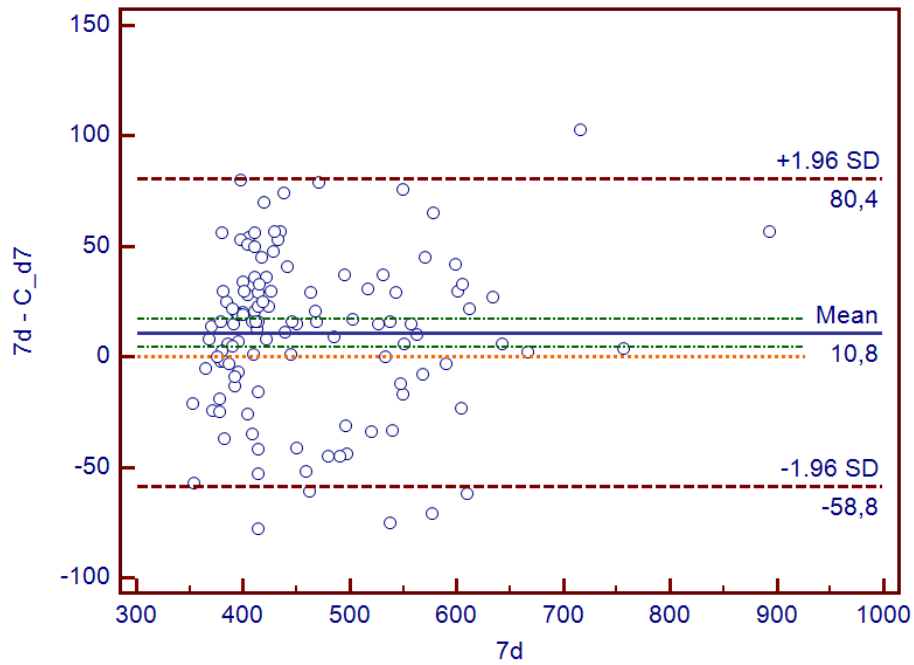


Figura 31. Diferencia (en μm) entre el grosor corneal medido por PU y por MCIV en todos los grupos. La línea azul continua representa la media y las líneas rojas discontinuas el IC al 95%. La mayor parte de estas diferencias se encuentran en este rango.

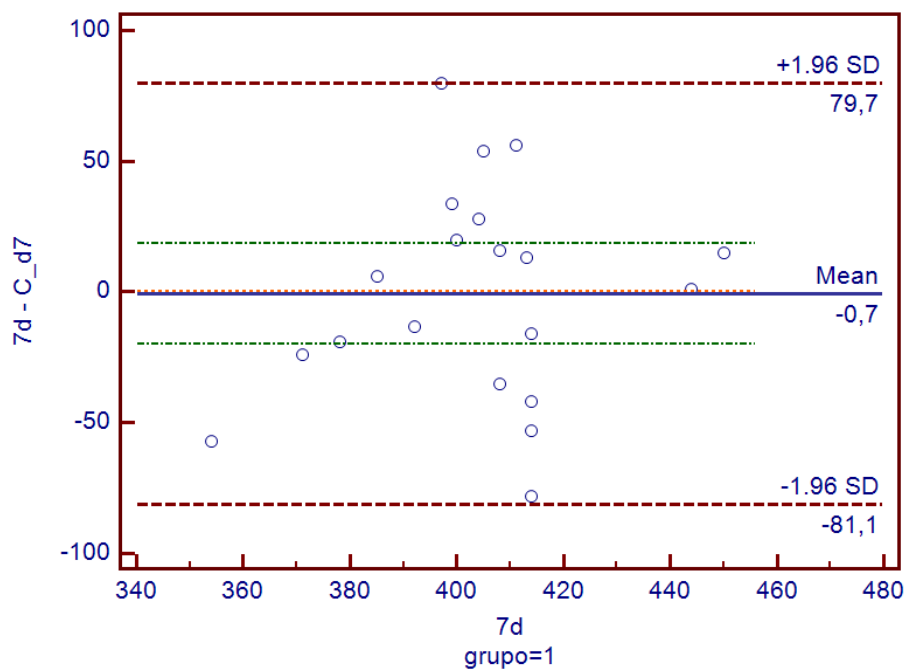


Figura 32. Diferencia (en μm) entre el grosor corneal medido por PU y por MCIV en el grupo 1. La línea azul continua representa la media y las líneas rojas discontinuas el IC al 95%. La mayor parte de estas diferencias se encuentran en este rango.

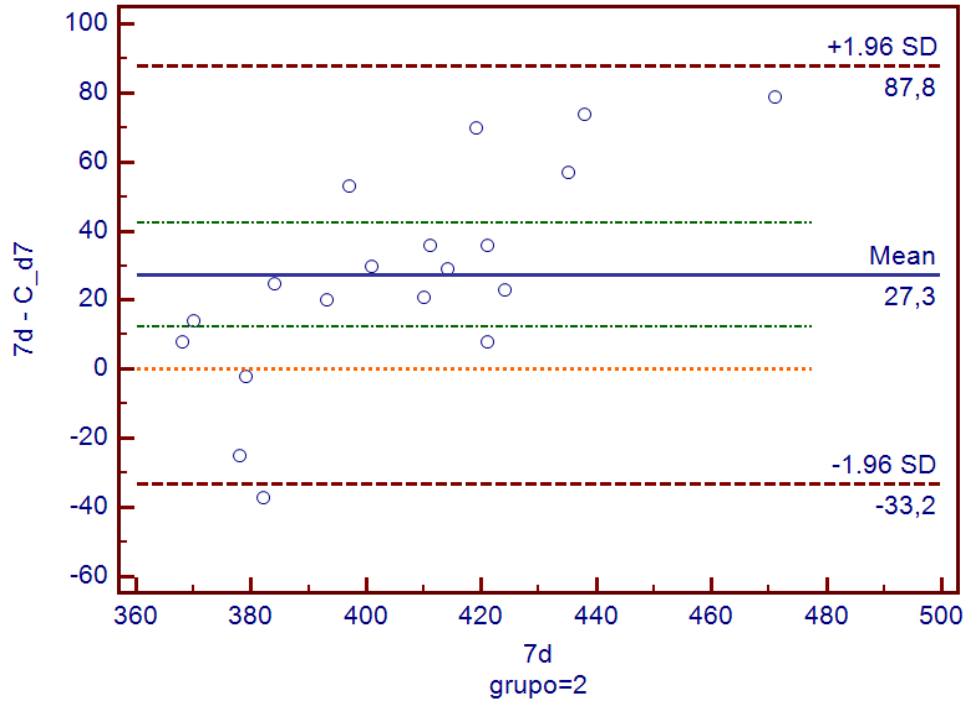


Figura 33. Diferencia (en μm) entre el grosor corneal medido por PU y por MCIV en el grupo 2. La línea azul continua representa la media y las líneas rojas discontinuas el IC al 95%. La mayor parte de estas diferencias se encuentran en este rango.

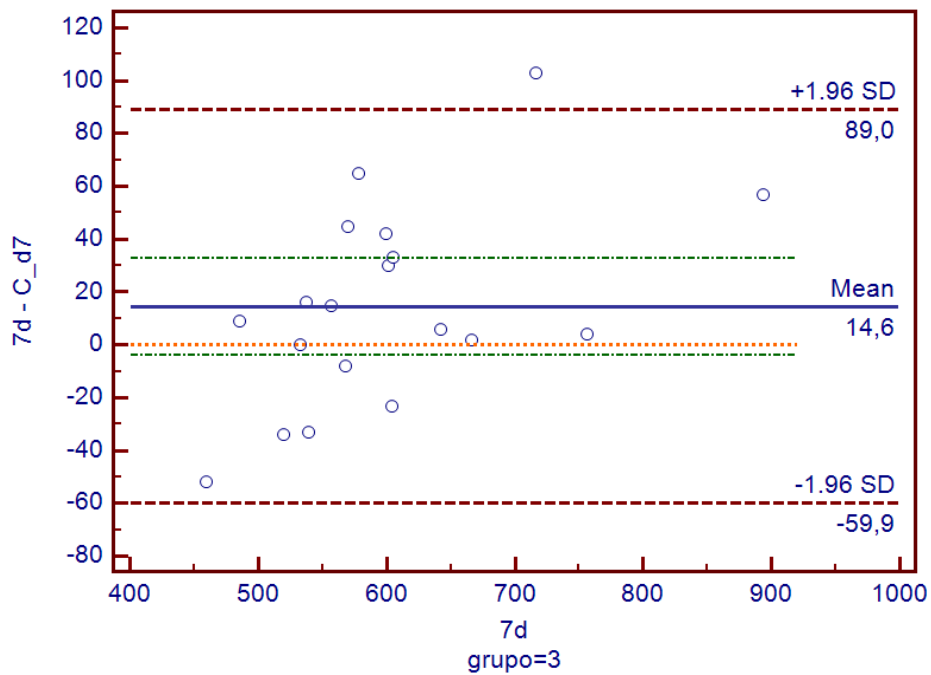


Figura 34. Diferencia (en μm) entre el grosor corneal medido por PU y por MCIV en el grupo 3. La línea azul continua representa la media y las líneas rojas discontinuas el IC al 95%. La mayor parte de estas diferencias se encuentran en este rango.

6. MICROSCOPIA CONFOCAL IN VIVO

6.1. EPITELIO

Las imágenes del epitelio corneal obtenidas por MCIV presentaron las características morfológicas habituales de las células epiteliales descritas en la literatura.⁷¹ En ellas se pudieron distinguir tres tipos celulares bien diferenciados.

En los estratos más superficiales de la córnea se observaron células poligonales (pentagonales y hexagonales) con y sin borde hiperreflectivo y con un núcleo central hiperreflectivo bien marcado. Dentro de este grupo de células poligonales, se pudieron distinguir estratos con diferentes subtipos celulares. En el más superficial de ellos, el citoplasma era hiperreflectivo, de reflectividad similar al núcleo que se encontraba rodeado por un halo hiporreflectivo (ver Figuras 35-A, 35-B y 35-C). Estas células superficiales se observaron en todos los grupos y sus características morfológicas no variaron entre los grupos 1, 2 y 3.

En el siguiente estrato se observaron células poligonales de similares características en las que el citoplasma presentaba una reflectividad intermedia, menor a la del núcleo y la pared celular, y en las que no se apreciaba el característico halo de hiporreflectividad observado en el estrato anterior (ver Figuras 35-D y 35-E). Este subtipo celular de menor contraste mostró un pico de reflectividad en el *z-scan* más bajo que el de las células superficiales, previamente descritas, y no pudo ser observado en todos los casos. En planos más profundos observamos células de características similares a las anteriores que presentaban un núcleo hiperreflectivo, un citoplasma hiporreflectivo, ausencia del halo perinuclear y unos bordes celulares hiperreflectivos similares a los de las células basales (ver Figura 35-F).

En estratos más profundos se observó un tercer subtipo de células epiteliales de menor tamaño con bordes celulares hiperreflectivos y citoplasma hiporreflectivo sin presencia de núcleo evidente. En ningún caso observamos estructuras subepiteliales sugestivas de una membrana basal o membrana de Bowman.

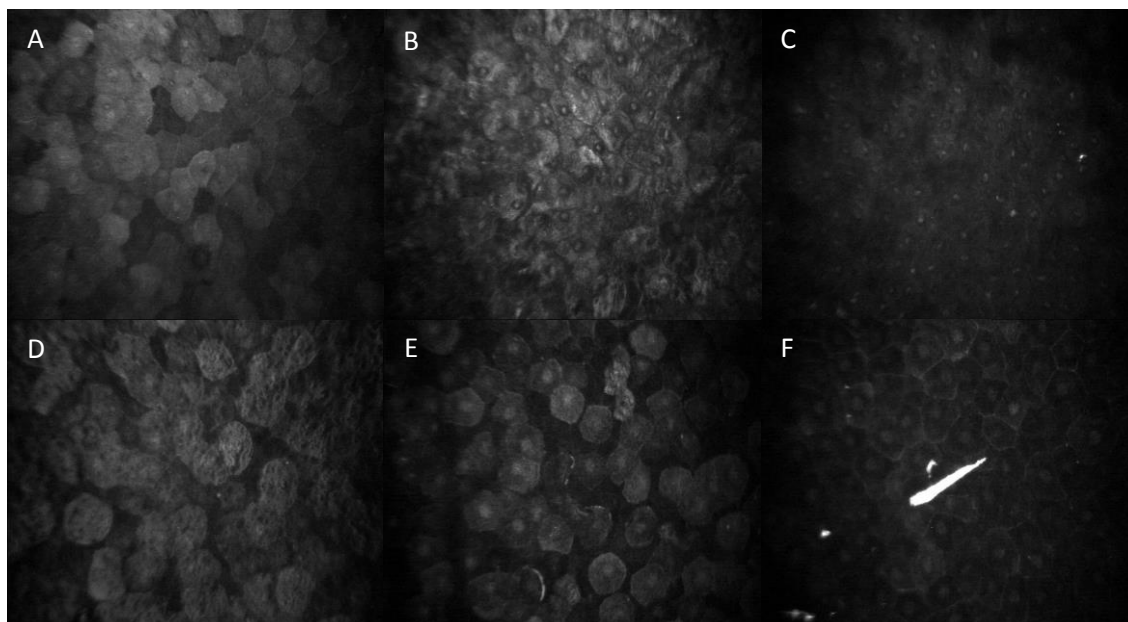


Figura 35. Imágenes de epitelio corneal por MCIV.

6.2. ENDOTELIO

Las imágenes endoteliales en todos los casos mostraron las características morfológicas habituales del endotelio corneal descritas en la literatura.⁷¹ Se pudo apreciar una monocapa hiperreflectiva de células hexagonales que se corresponde con el primer pico de reflectividad (el más elevado) de la gráfica *Z-scan*. Las células endoteliales mostraron una morfología hexagonal, ausencia de núcleos celulares y líneas intercelulares hiporreflectivas (ver Figura 36).

Obtuvimos imágenes válidas en todos menos en los casos 211 y 216 del grupo 2 y los casos 311, 317 y 321 del grupo 3 en la revisión al día 7, en los que no se obtuvieron imágenes endoteliales adecuadas para su correcta visualización y análisis por parte del *software* del CS4. Estos casos se excluyeron a la hora de realizar el análisis estadístico de los datos.

Se obtuvieron valores de la densidad celular endotelial, el área celular, el coeficiente de variación del tamaño celular (CVTC), el porcentaje de hexagonalidad y el número medio de lados de las células endoteliales por MCIV. Las medidas se obtuvieron a los días 7, 30 y 60 en los grupos 2 y 3. Las medidas obtenidas en el grupo 1 (ojos contralaterales de los casos del grupo 2) se emplearon como control.

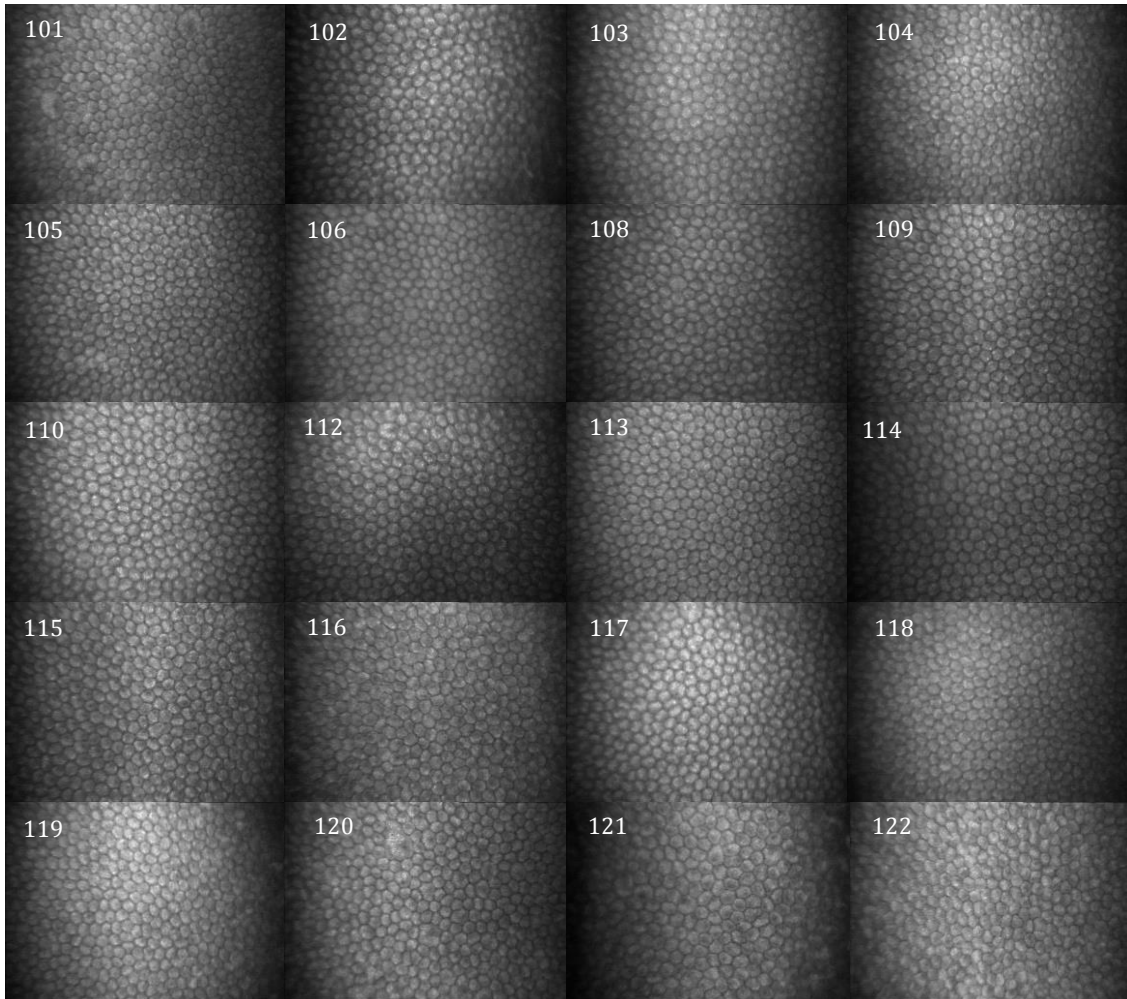


Figura 36. Imágenes del endotelio corneal por MCIV de los casos 101 a 122 pertenecientes al grupo 1 (control).

6.2.1. DENSIDAD DE CÉLULAS ENDOTELIALES

La tabla 19 muestra los valores medios de la densidad celular endotelial (DCE) (en células/mm²) obtenidos mediante MCIV para cada uno de estos grupos en los citados momentos de exploración. No hubo diferencias en la media de la DCE entre los grupos 2 y 3 (con y sin LIE) a lo largo del seguimiento ($p=0,232$) en el modelo lineal general de medidas repetidas. La comparación de las medias de la DCE a lo largo del seguimiento mostró un valor de $p=0,072$ en el grupo 2 y de $p=0,231$ en el grupo 3 en el análisis multivariante. Los valores p para la comparación de las medias de la DCE entre el grupo control y las exploraciones a los días 7, 30 y 60 fue de $p=0,698$; $p=0,063$ y $p=0,061$, respectivamente, en el grupo 2 y de $p=0,2$; $p=0,907$ y $p=0,96$, respectivamente, en el grupo 3.

Tabla 19. Densidad de células endoteliales

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	2879	310	-	-	-	-
Grupo 2	2844	307	2720	288	2739	201
Grupo 3	3153	240	2974	248	2957	293

TABLA 19. Densidad de células endoteliales (cel/mm²) media y desviación estándar medidas por MCIV de los grupos 1, 2 y 3 en los diferentes momentos.

6.2.2. ÁREA CELULAR ENDOTELIAL

La tabla 20 muestra los valores medios del área celular endotelial (en mm²) obtenidos mediante MCIV en cada uno de estos grupos en los citados momentos de exploración. El análisis multivariante de la comparación de las medias del área celular endotelial entre los grupos 2 y 3, a lo largo del seguimiento, mostró un valor de $p=0,26$. La comparación de las medias del área celular endotelial a lo largo del seguimiento mostró un valor de $p=0,062$ en el grupo 2 y de $p=0,26$ en el grupo 3 en el modelo lineal general de medidas repetidas. Los valores p para la comparación de las medias del área celular endotelial entre el grupo control y la exploración a los días 7, 30 y 60 fueron: $p=0,82$, $p=0,055$ y $p=0,061$; y $p=0,16$, $p=0,861$ y $p=0,941$, para los grupos 2 y 3, respectivamente.

Tabla 20. Área celular endotelial media

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	351,1	38	-	-	-	-
Grupo 2	353,5	37	371,5	40	366,9	28
Grupo 3	318,8	23	338,4	28	341,3	34

TABLA 20. Área celular (mm²). Media y desviación estándar medidas por MCIV de los grupos 1, 2 y 3 en los diferentes momentos de exploración.

6.2.3. COEFICIENTE DE VARIACIÓN DEL TAMAÑO CELULAR

La tabla 21 muestra, en forma de porcentaje, las medias de los coeficientes de variación del tamaño celular (CVTC) de cada uno de estos grupos en los citados momentos de exploración. No hubo diferencias en las medias del CVTC endotelial entre los grupos 2 y 3,

a lo largo del seguimiento, en el modelo lineal general de medidas repetidas ($p=0,204$). El análisis multivariante de la comparación de las medias del CVTC endotelial a lo largo del seguimiento mostró un valor de $p=0,038$ en el grupo 2 y de $p=0,219$ en el grupo 3, respectivamente. Los valores p para la diferencia de la media del CVTC entre el grupo control y la exploración a los días 7, 30 y 60 fueron de $p=0,121$, $p=0,895$ y $p=0,216$, respectivamente, en el grupo 2 y de $p=0,004$, $p=0,396$ y $p=0,129$, respectivamente, en el grupo 3.

Tabla 21. Coeficiente de variación del tamaño celular endotelial

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	19	6,5	-	-	-	-
Grupo 2	22,23	9,3	19,04	6,5	16,69	5,9
Grupo 3	30,65	11,2	21,22	8	24,59	7,1

TABLA 21. Variación en el tamaño del área celular. Media de los porcentajes de los coeficientes de variación del tamaño celular y su desviación estándar medidos por MCIV en los grupos 1, 2 y 3 en los diferentes momentos de exploración.

6.2.4. NÚMERO DE LADOS DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

La tabla 22 muestra el número medio de lados de las células endotelial obtenidos mediante MCIV para cada uno de estos grupos en los citados momentos de exploración.

Tabla 22. Número de lados de las células endoteliales

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	5,96	0,06	-	-	-	-
Grupo 2	5,96	0,07	5,97	0,06	5,98	0,07
Grupo 3	5,89	0,11	5,94	0,08	5,96	0,06

TABLA 22. Media y desviación estándar del número de lados de las células endoteliales medido por MCIV en los grupos 1, 2 y 3 en los diferentes momentos de exploración.

6.2.5. HEXAGONALIDAD

La tabla 23 muestra los porcentajes medios de hexagonalidad (porcentaje de células hexagonales del total de células) obtenidos mediante MCIV para cada uno de estos grupos

en los citados momentos de exploración. La comparación del porcentaje de hexagonalidad medio entre los grupos 2 y 3, a lo largo del seguimiento mostró un valor de $p=0,026$ en el modelo lineal general de medidas repetidas.

El análisis multivariante de la comparación del porcentaje de hexagonalidad medio de las células endoteliales a lo largo del seguimiento mostró un valor de $p=0,174$ en el grupo 2 y de $p=0,211$ en el grupo 3. Los valores p para la diferencia de la media del porcentaje de hexagonalidad celular entre el grupo control y la exploración a los días 7, 30 y 60 fueron de $p=0,096$, $p=0,009$ y $p=0,424$, respectivamente, en el grupo 2 y de $p=0,003$, $p=0,071$ y $p=0,391$, respectivamente, en el grupo 3.

Tabla 23. Hexagonalidad de las células endoteliales

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	65,9	6,2	-	-	-	-
Grupo 2	63,44	7,8	58,86	9,4	65,65	9,7
Grupo 3	50,43	14,4	59,75	8,9	63,68	4,7

TABLA 23. Porcentaje de hexagonalidad. Media del porcentaje de hexagonalidad y desviación estándar medidos por MCIV de los grupos 1, 2 y 3 en los diferentes momentos.

6.3. ESTROMA

6.3.1. MORFOLOGÍA

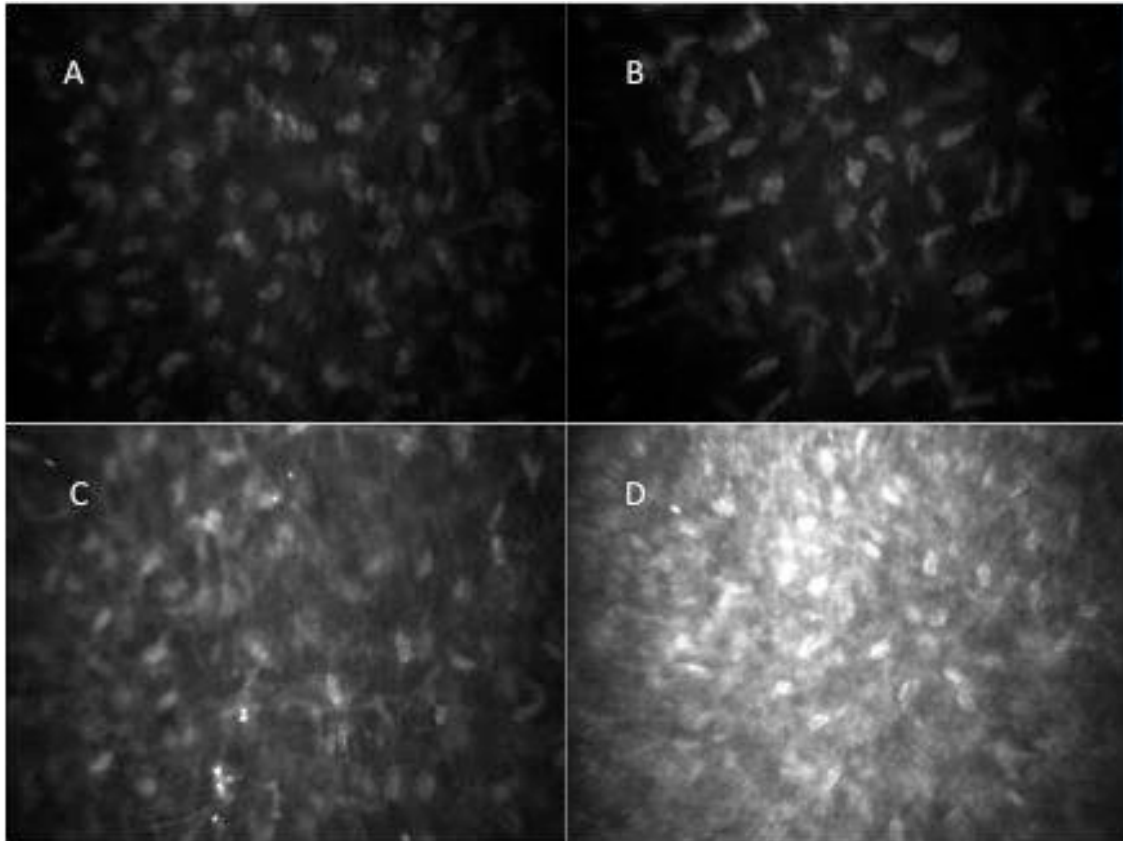


Figura 37. Imágenes del estroma corneal. A) Imagen del estroma anterior del caso 101 (grupo 1) en el que se ven queratocitos de características normales embebidos en una MEC hiporreflectiva. B) Imagen correspondiente al estroma posterior del mismo caso (101) en la que podemos apreciar queratocitos en menor densidad, embebidos en la MEC hiporreflectiva. C) Imagen del estroma anterior del caso 201 (grupo 2) en la que se aprecian queratocitos activados formando MEC, que aparece con mayor reflectividad que en las imágenes A y B, junto a partículas hiperreflectivas. D) Imagen del estroma anterior por delante de la LIE de PEGDA del caso 306 (grupo 3) en la que se aprecian queratocitos activados con hiperreflectividad de sus núcleos y del citoplasma, embebidos en una MEC hiperreflectiva.

6.3.2. DENSIDAD DE QUERATOCITOS

6.3.2.1. Densidad de queratocitos en el estroma anterior

El análisis multivariante de la comparación de la media de la densidad de queratocitos del estroma anterior no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes momentos de evaluación en el grupo 2 ($p=0,23$) ni en el grupo 3 ($p=0,76$). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,33$) en la comparación de la media de la densidad de queratocitos del estroma anterior entre los grupos 2 y 3 en el

modelo lineal general de medidas repetidas. Al analizar la diferencia de las medias de la densidad de queratocitos del estroma anterior en los diferentes momentos de evaluación, no observamos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,1$, $p=0,572$ y $p=0,128$) entre los grupos 2 y 3 a los 7, 30 y 60 días, respectivamente. Los valores de p para la diferencia de la media de la densidad de queratocitos en estroma anterior entre el grupo control y la exploración a los días 7, 30 y 60 fueron de $p=0,436$, $p=0,163$ y $p=0,973$, respectivamente, para el grupo 2 y de $p=0,436$, $p=0,205$ y $p=0,704$, respectivamente, para el grupo 3.

Tabla 24. Densidad de queratocitos en estroma anterior

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	1035,72	98	-	-	-	-
Grupo 2	1095,6	196	1034,87	187	1111,23	159
Grupo 3	1040,52	101	1001,99	177	934,56	325

TABLA 24. Densidad media de queratocitos (cel/mm^2) en el estroma anterior y su desviación estándar medidas por MCIV de los grupos 1, 2 y 3 en los días 7, 30 y 60 del posoperatorio.

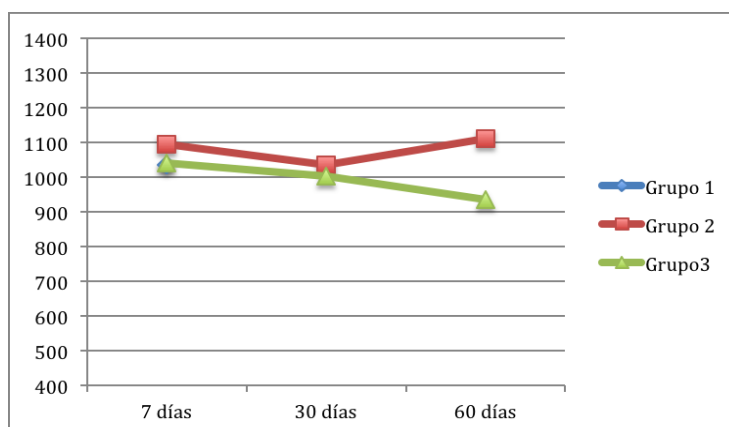


Figura 38. Densidad de queratocitos (cel/mm^2) en el estroma anterior de los grupos 1, 2 y 3 en el preoperatorio, a la semana, al mes y a los 2 meses de la cirugía.

6.3.2.2. Densidad de queratocitos en el estroma posterior

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,1$) en la comparación de la media de la densidad de queratocitos del estroma posterior entre los grupos 2 y 3 en el modelo lineal de medidas repetidas. Al analizar la diferencia de la densidad de queratocitos

del estroma posterior entre ambos grupos en los diferentes momentos de evaluación, no observamos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,103$, $p=0,552$ y $p=0,876$) entre los grupos 2 y 3 a los 7, 30 y 60 días, respectivamente.

El análisis multivariante de la comparación de la media de la densidad de los queratocitos del estroma posterior en el grupo 2 mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes momentos de evaluación ($p=0,011$), mientras que en el grupo 3 no mostró diferencias significativas entre los diferentes tiempos posoperatorios ($p=0,27$).

Los valores p para la diferencia de la media de la densidad de queratocitos en estroma posterior entre el grupo control y los días 7, 30 y 60 fueron de $p=0,382$, $p=0,653$ y $p=0,85$, respectivamente, para el grupo 2 y de $p=0,792$, $p=0,226$ y $p=0,576$, respectivamente, para el grupo 3.

Tabla 25. Densidad de queratocitos en estroma posterior

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 1	702,35	92	-	-	-	-
Grupo 2	803,59	110	734,79	105	665,26	123
Grupo 3	658,22	139	779	123	665	140

TABLA 25. Densidad media de queratocitos (cel/mm^2) en el estroma posterior y su desviación estándar medidas por MCIV de los grupos 1, 2 y 3 en los días 7, 30 y 60 del posoperatorio.



Figura 39. Densidad de queratocitos (cel/mm^2) en el estroma posterior de los grupos 1, 2 y 3 en el preoperatorio, a la semana, al mes y a los 2 meses de la cirugía.

6.3.3. NERVIOS ESTROMALES

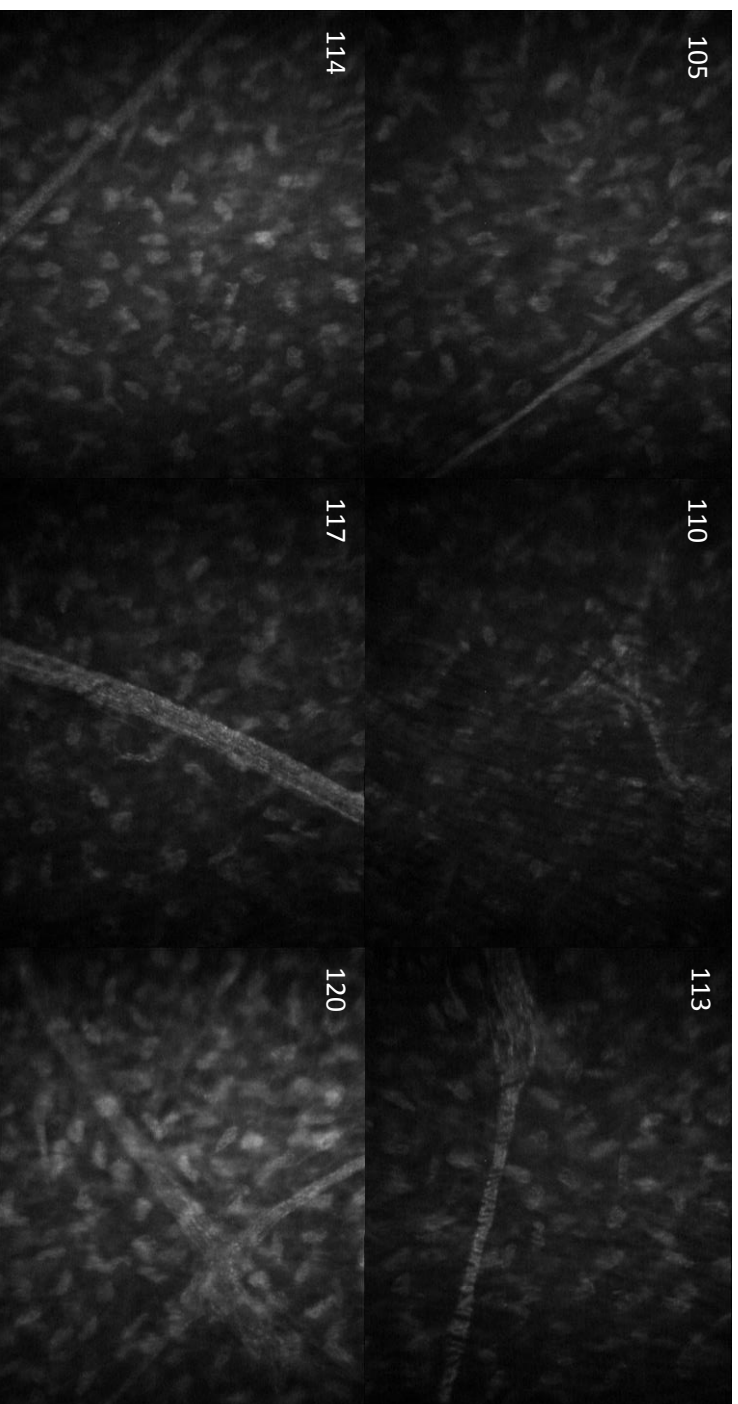


Figura 40. Nervios estromales en los casos 105, 110, 113, 114, 117 y 120 pertenecientes al grupo 1.

6.4. INTERFASE

6.4.1. REFLECTIVIDAD DE LA INTERFASE

La intensidad de la interfase se analizó midiendo la reflectividad, expresada en LRU (*light reflectance units*), del pico generado en la gráfica *Z-scan* en el área de mayor reflectividad asociada al plano de disección corneal (ver Figura 41). La tabla 26 muestra las medias de la intensidad de la reflectividad de la interfase de los grupos 2 y 3. La comparación entre la reflectividad de los grupos 2 y 3 a lo largo del seguimiento mostró un valor de $p=0,029$ en el modelo lineal general de medidas repetidas. Dentro del grupo 2 no hallamos diferencias estadísticamente significativas en la reflectividad entre los diferentes tiempos a estudio ($p=0,613$) mientras que en el grupo 3 la comparación de la media de la reflectividad entre los diferentes tiempos de evaluación mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,021$).

Tabla 26. Reflectividad de la interfase

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 2	72,2	21,3	62,18	25,1	68,43	37,41
Grupo 3	83,5	38,6	109,6	43,1	127,3	57

TABLA 26. Reflectividad media de la interfase (en LRU) y desviación estándar medidas por MCIV en los grupos 2 y 3 a los 7, 30 y 60 días del posoperatorio.

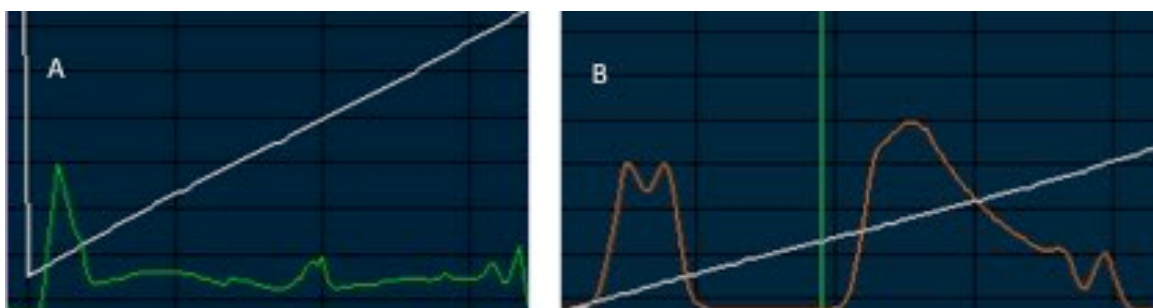


Figura 41. A) Gráfico *Z-scan* perteneciente a un caso del grupo 2 (sin LIE) en el que se aprecia un primer pico correspondiente al endotelio, un pico al final del gráfico correspondiente al epitelio y un pico intermedio correspondiente a la interfase. B) Gráfico *Z-scan* perteneciente a un caso del grupo 3 (con LIE) en el que se aprecia un primer pico correspondiente al endotelio, un valle correspondiente al implante seguido de un área de reflectividad decreciente correspondiente al estroma anterior y un pico al final del gráfico correspondiente al epitelio.

6.4.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA INTERFASE

Las características morfológicas de la interfase fueron variables: desde una capa hiperreflectiva uniforme con grados variables de transparencia y ausencia de estructuras estromales reconocibles, hasta un estroma de características normales, pasando por morfologías intermedias en las que se pudieron observar queratocitos de características normales junto a áreas de desestructuración estromal. De esta forma se estableció una clasificación morfológica de la interfase en cuatro tipos (1 a 4). La presencia de partículas hiperreflectivas se analizó de forma aislada a la morfología de la interfase.

- **Tipo 1.** Estroma normal. Interfase no distinguible del resto del estroma circundante.
- **Tipo 2.** Interfase caracterizada por la presencia de una estroma normal con queratocitos embebidos en una matriz extracelular hiporreflectiva junto a imágenes que distorsionan esta estructura característica.
- **Tipo 3.** Interfase caracterizada por una práctica ausencia de las estructuras que conforman el estroma típico a ese nivel pero en las que son visibles algunos queratocitos.
- **Tipo 4.** Ausencia total de estructuras estromales características.

En las figuras 42 a 47 se muestran las imágenes correspondientes a la interfase de cada uno de los casos de los grupos 2 y 3 en las exploraciones realizadas a los días 7, 30 y 60 del posoperatorio. La distribución de los diferentes tipos de interfase en cada grupo se detalla en la tabla 27.

Tabla 27. Características morfológicas de la interfase

GRUPO 2				
	1	2	3	4
Día 7	5%	20%	45%	30%
Día 30	6,3%	37,5%	37,5%	18,7%
Día 60	7,1%	35,7%	35,7%	21,4%

GRUPO 3				
	1	2	3	4
Día 7	0%	5%	45%	50%
Día 30	0%	25%	50%	25%
Día 60	0%	14,3%	57,1%	28,6%

Tabla 27. Porcentaje de casos de cada tipo de interfase en los diferentes grupos.

INTERFASE GRUPO 2 (DÍA 7)

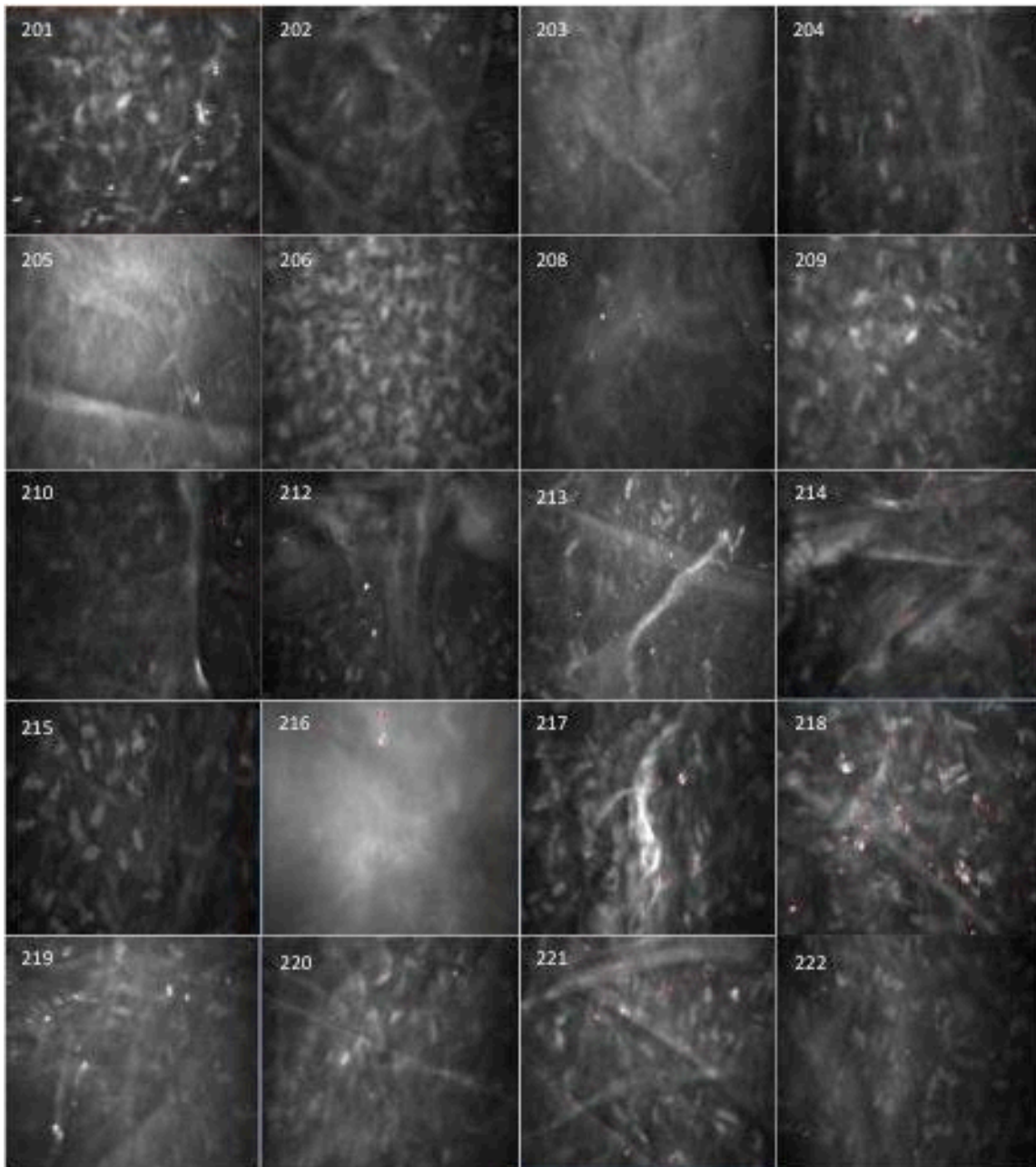


Figura 42. Imágenes de la interfase corneal por MCIV de los casos 201 a 222 pertenecientes al grupo 2 a la semana de la intervención.

INTERFASE GRUPO 2 (DÍA 30)

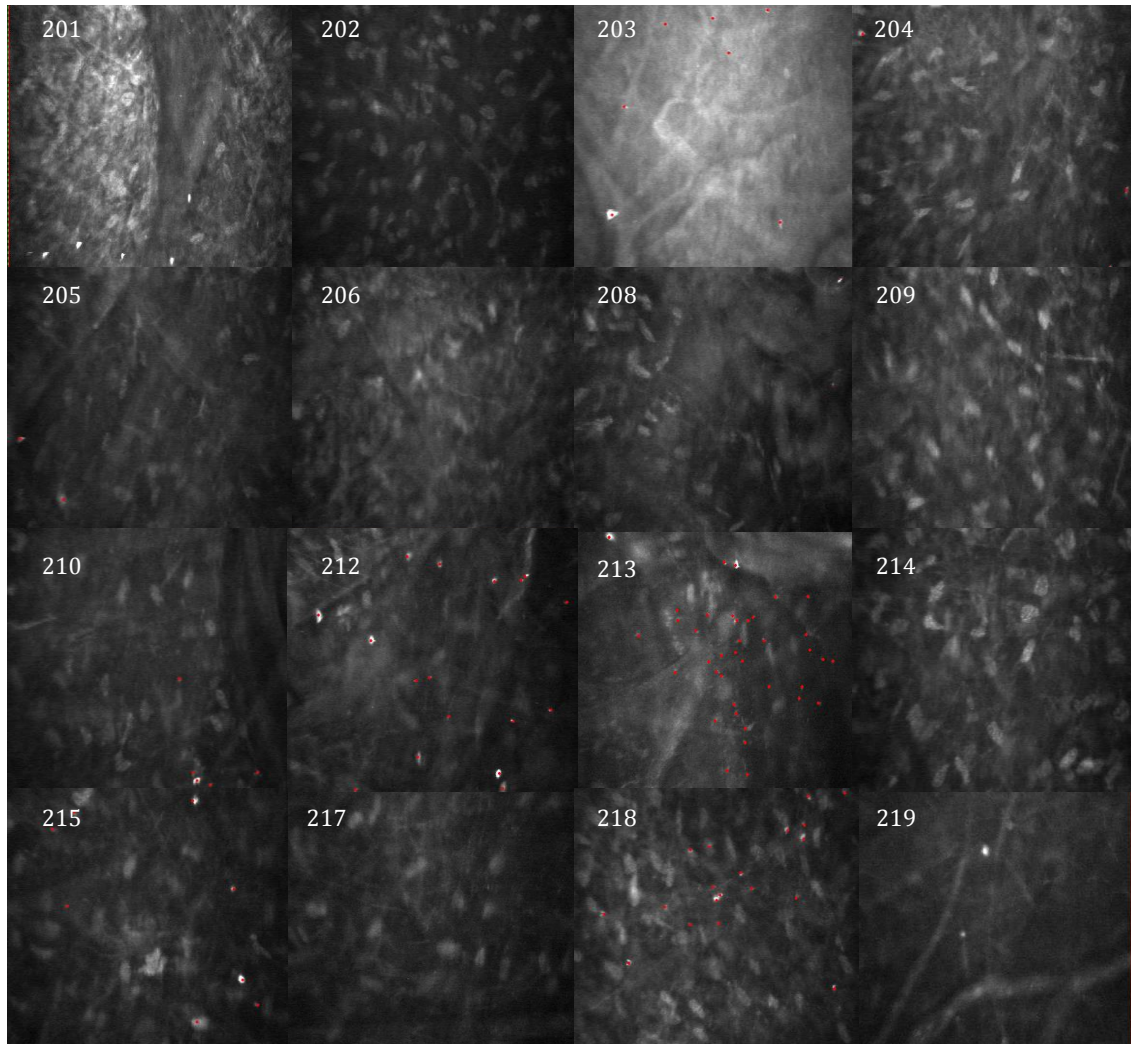


Figura 43. Imágenes de la interfase corneal por MCIV de los casos 201 a 219 pertenecientes al grupo 2 al mes de la intervención.

INTERFASE GRUPO 2 (DÍA 60)

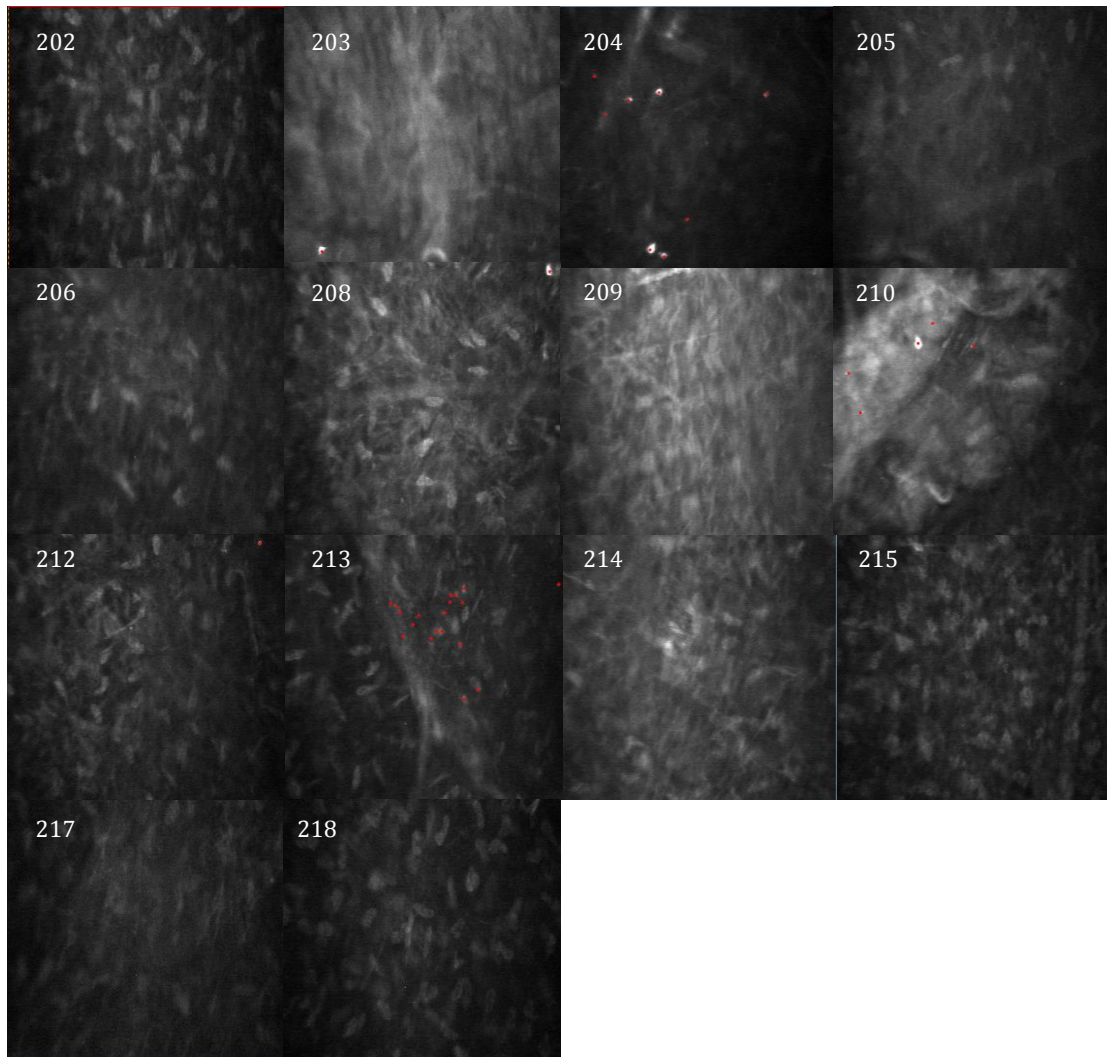


Figura 44. Imágenes de la interfase corneal por MCIV de los casos 202 a 218 pertenecientes al grupo 2 a los dos meses de la intervención.

INTERFASE GRUPO 3 (DÍA 7)

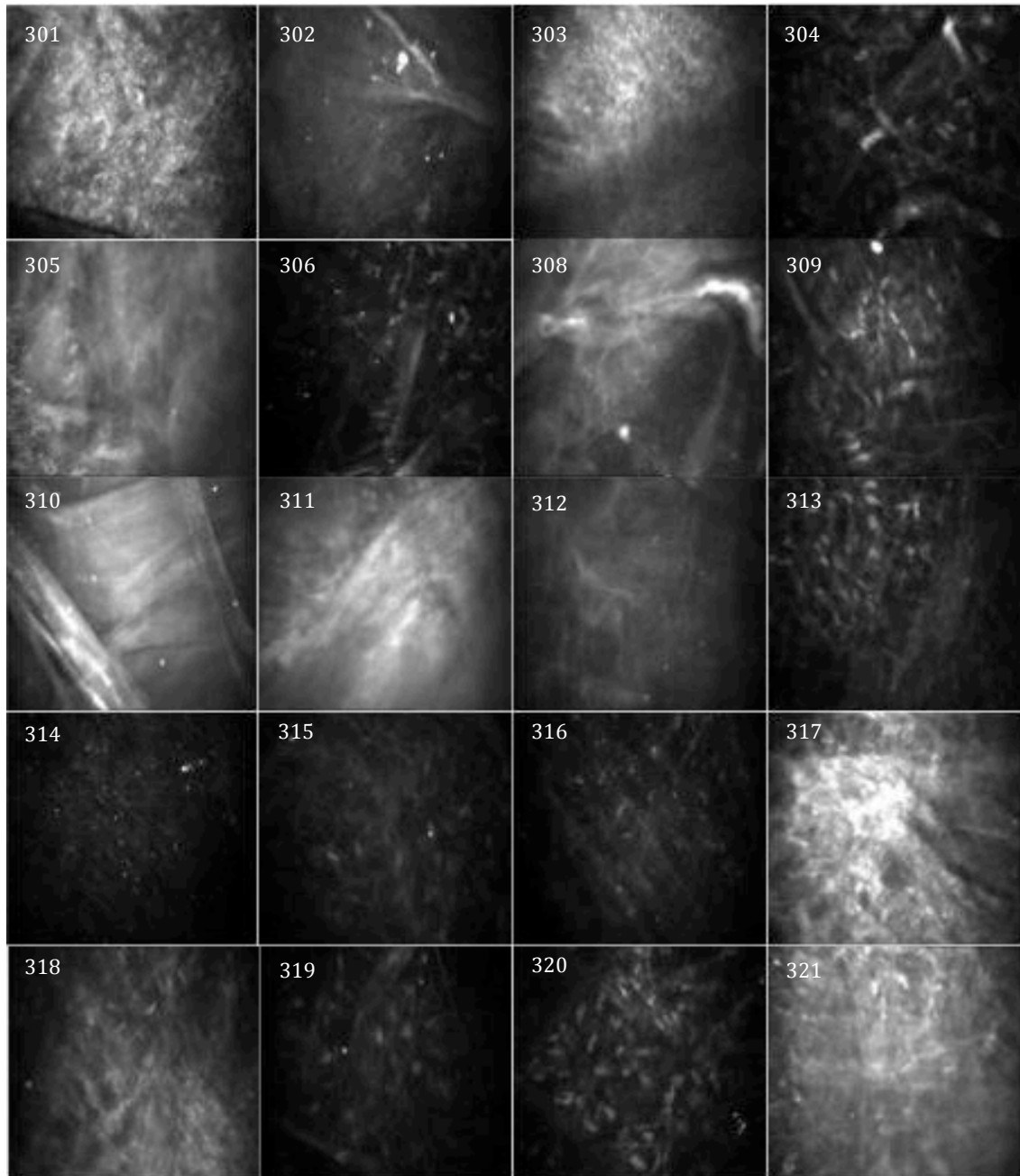


Figura 45. Imágenes de la interfase corneal por MCIV de los casos 301 a 321 pertenecientes al grupo 3 a la semana de la intervención.

INTERFASE GRUPO 3 (DÍA 30)

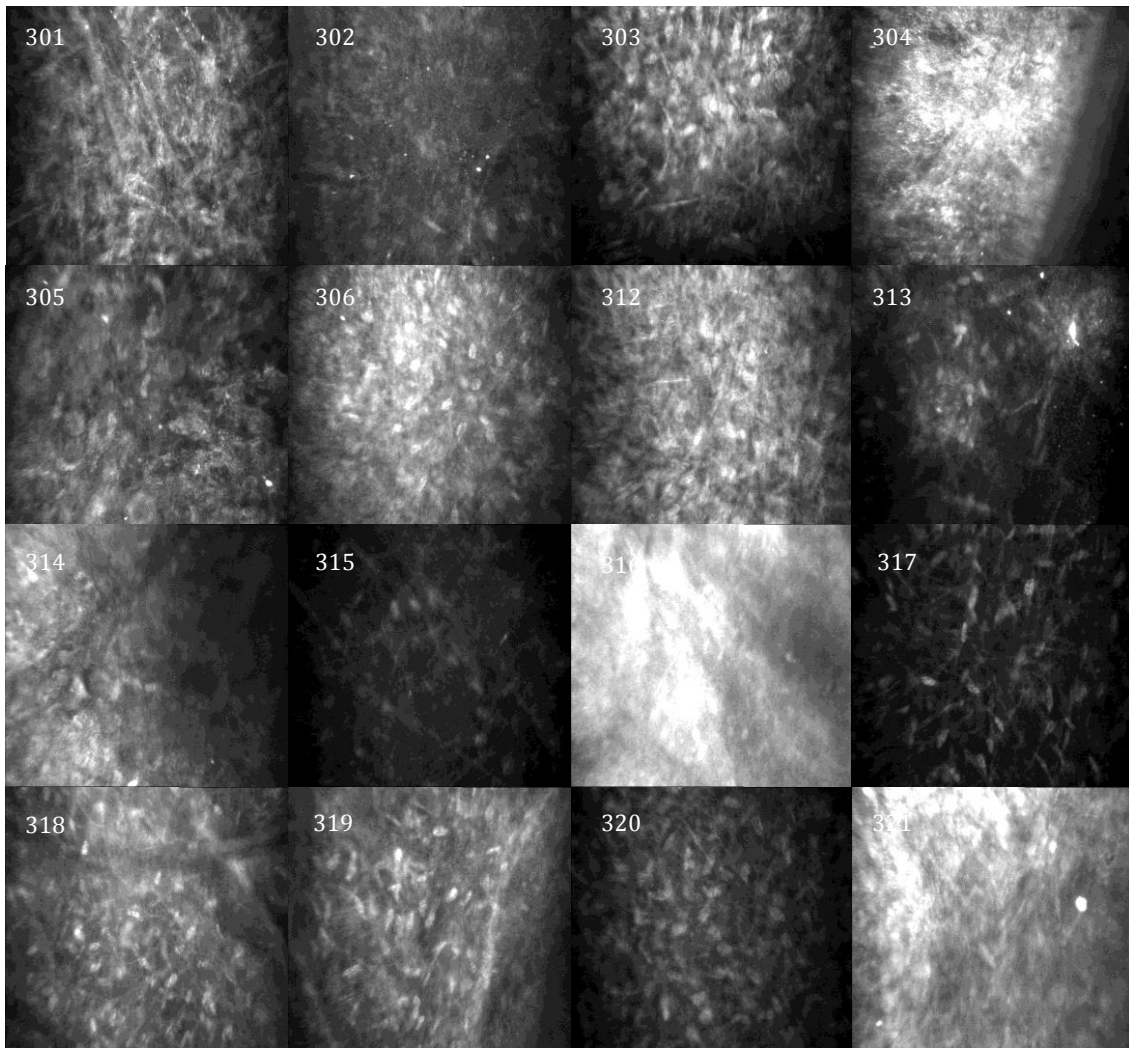


Figura 46. Imágenes de la interfase corneal por MCIV de los casos 301 a 321 pertenecientes al grupo 3 al mes de la intervención.

INTERFASE GRUPO 3 (DÍA 60)

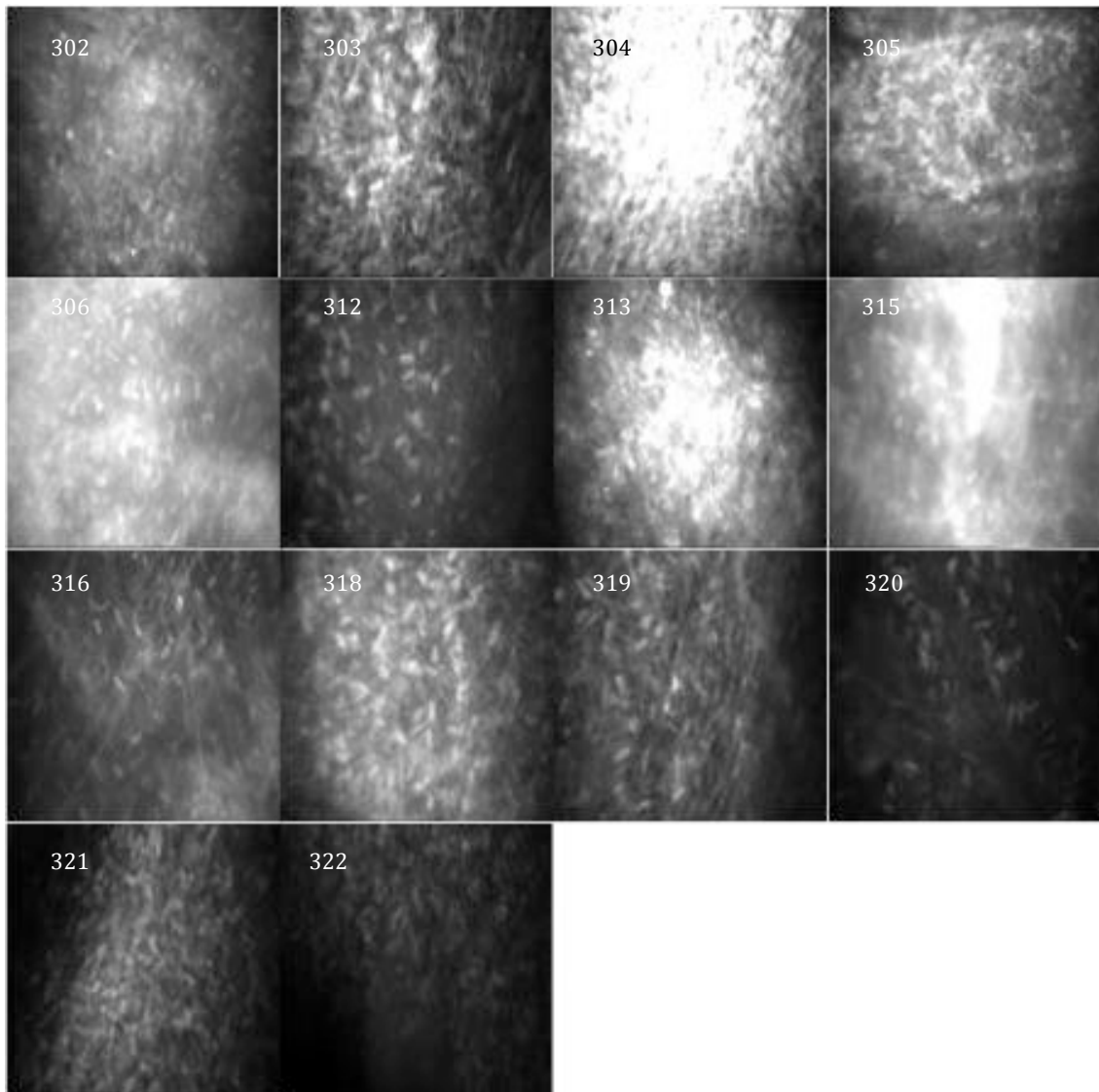


Figura 47. Imágenes de la interfase corneal por MCIV de los casos 301 a 322 pertenecientes al grupo 3 a los dos meses de la intervención.

6.4.3. PARTÍCULAS HIPERREFLECTIVAS EN LA INTERFASE

La presencia de partículas hiperreflectivas en el estroma corneal se analizó de forma aislada, sin asociarlas al patrón morfológico de la interfase. La tabla 28 muestra el porcentaje de casos con partículas hiperreflectivas en cada exploración en ambos grupos. La comparación del porcentaje de casos con presencia de partículas en la interfase entre la semana y los días 30 y 60 mostró, respectivamente, valores de $p=0,25$ y $p=0,031$ en el grupo 2, y de $p=0,625$ y $p=0,031$ en el grupo 3 (test de McNemar). La densidad media de partículas hiperreflectivas (partículas/ mm^2) de cada grupo en las exploraciones a los 7, 30 y 60 días se resume en la tabla 29. La comparación de la media de partículas entre los grupos 2 y 3 en los diferentes tiempos de evaluación mostró un valor de $p=0,337$ en el modelo lineal general de medidas repetidas. La comparación de las medias de la densidad de partículas entre los diferentes tiempos de evaluación mostró un valor de $p=0,017$ en el grupo 2 y de $p=0,19$ en el grupo 3. La comparación de la media de partículas en la interfase entre la semana y los días 30 y 60 mostró, respectivamente, valores de $p=0,126$ y $p=0,031$ en el grupo 2 y de $p=0,83$ y $p=0,061$ en el grupo 3.

Porcentaje de casos con partículas hiperreflectivas			
	Día 7	Día 30	Día 60
Grupo 2	90%	68,7%	42,8%
Grupo 3	90.5%	81,3%	53,3%

TABLA 28. Porcentaje de casos con partículas hiperreflectivas en la interfase en los grupos 2 y 3 a los 7, 30 y 60 días del posoperatorio.

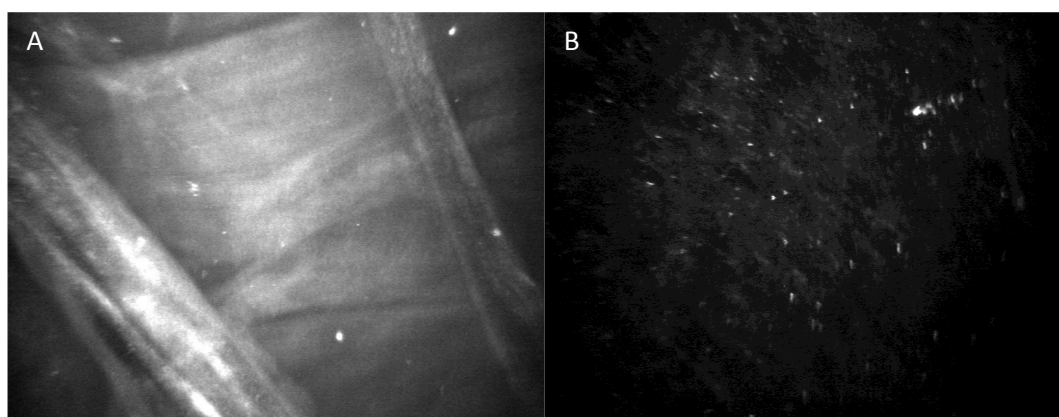


Figura 48. Imágenes de partículas hiperreflectivas en la interfase lente-estroma por MCIV de los casos 310 (A) y 314 (B) a la semana de la intervención.

Tabla 29. Densidad de partículas hiperreflectivas en la interfase

	Día 7		Día 30		Día 60	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Grupo 2	137	146	78	98,9	25	51
Grupo 3	191,9	20,5	220	366	76,6	122,2

TABLA 29. Media de la densidad de las partículas hiperreflectivas en la interfase (partículas/mm²) y desviación estándar medidas por MCIV en los grupos 2 y 3 a los 7, 30 y 60 días del posoperatorio.

6.5. GROSOR DE LOS IMPLANTES

Los implantes estromales se caracterizaron por presentar un valle de hiporreflectividad absoluta en mitad del estroma corneal de reflectividad media en el gráfico *Z-scan* obtenido por CS4 (ver figura 41-B correspondiente al gráfico *Z-scan* en el apartado 6.4. Interfase). Los valores medios del grosor de los implantes por MCIV en el grupo 3 (media en $\mu\text{m} \pm \text{DE}$) fueron de $109,85 \pm 30,04$; $118,14 \pm 18,52$ y $104,63 \pm 18,09$ a los 7, 30 y 60 días del posoperatorio, respectivamente.

6.6. PAQUIMETRÍA POR MCIV

Ver apartados 5.2 y 5.3 de resultados.

7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

7.1. EPITELIO

7.1.1. EPITELIO GRUPO 1

Las córneas del grupo 1 presentaron un epitelio poliestratificado escamosos de entre 4 y 6 capas celulares. El estrato basal, en contacto directo con el estroma debido a la ausencia de MB, consistió en una monocapa de células cilíndricas. Se pudieron apreciar, también, células intermedias aladas y un estrato de células superficiales con grados variables de queratinización. El número de capas celulares del epitelio se mantuvo estable a lo largo de toda la córnea sin que se apreciara una diferencia en el grosor ni en la celularidad del epitelio entre la periferia y el ápex corneal (ver Figuras 49-50).

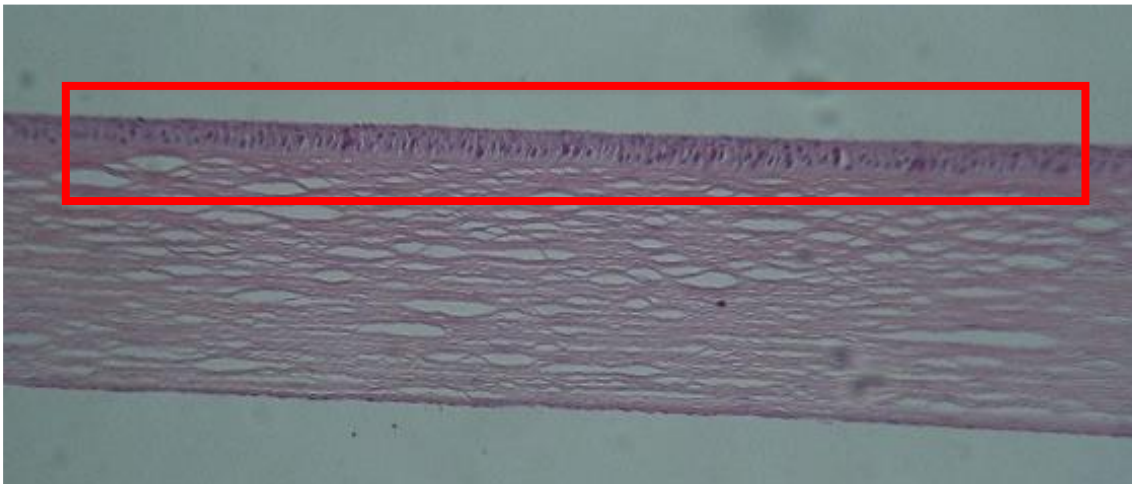


Figura 49. Imagen a cuatro aumentos de la córnea del caso 110 perteneciente al grupo 1, teñida con hematoxilina-eosina, en la que se aprecian las características típicas del epitelio corneal (dentro del recuadro).

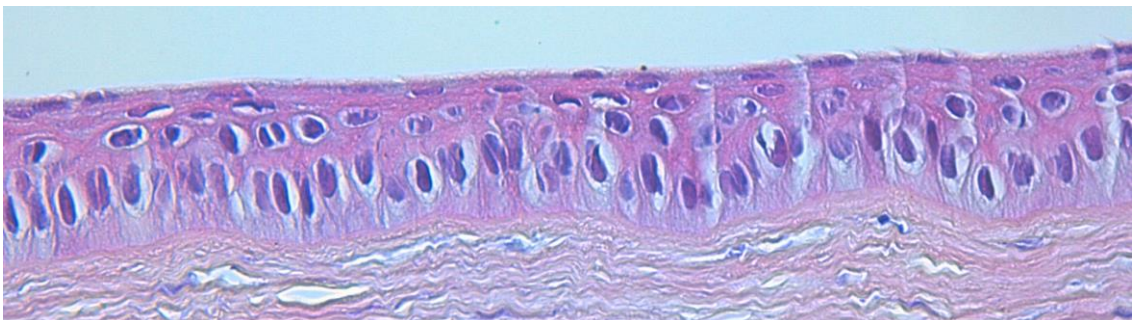


Figura 50. Imagen a 40 aumentos de la córnea del caso 101 perteneciente al grupo 1, en la que se aprecian con mayor detalle las características del epitelio corneal.

7.1.2. EPITELIO GRUPO 2

En todos los caso hallamos la presencia de un epitelio poliestratificado cilíndrico de características similares a las descritas en las córneas del grupo 1. En los casos en los que se evidenció una proliferación colágena más marcada, se pudo apreciar un adelgazamiento del epitelio corneal suprayacente, especialmente en los casos 209 y 216 en los que el adelgazamiento epitelial fue más evidente. En el resto de casos del grupo 2 no observamos diferencias en la morfología ni en la celularidad del epitelio corneal en comparación con las corneas analizadas en el grupo control.

7.1.3. EPITELIO GRUPOS 3, 4 y 5

En las córneas de los grupos 3 a 5 se pudo apreciar una hiperplasia del epitelio corneal suprayacente a las áreas de transición del estroma con y sin implante. Observamos un incremento del grosor epitelial a expensas de un número de células aumentado y a un mayor volumen de éstas en las zonas de transición junto al implante estromal. El número de capas del epitelio en estas zonas fue mayor al observado en los grupos 1 y 2, con entre 8 y 10 filas de células (ver Figura 51).

El epitelio corneal sobre el implante mostró las características típicas de un epitelio poliestratificado escamoso de características similares al epitelio corneal observado en el grupo control. El grosor de este epitelio sobre el área correspondiente al implante estromal fue similar el descrito en el grupo 1 a excepción de los casos 310, 311 y 314 en los que pudimos apreciar un epitelio más delgado. El número de hileras de células epiteliales sobre el implante en estos casos osciló entre cuatro y cinco. La morfología de las células epiteliales de los diferentes estratos del epitelio no varió en comparación con lo observado en los grupos 1 y 2.

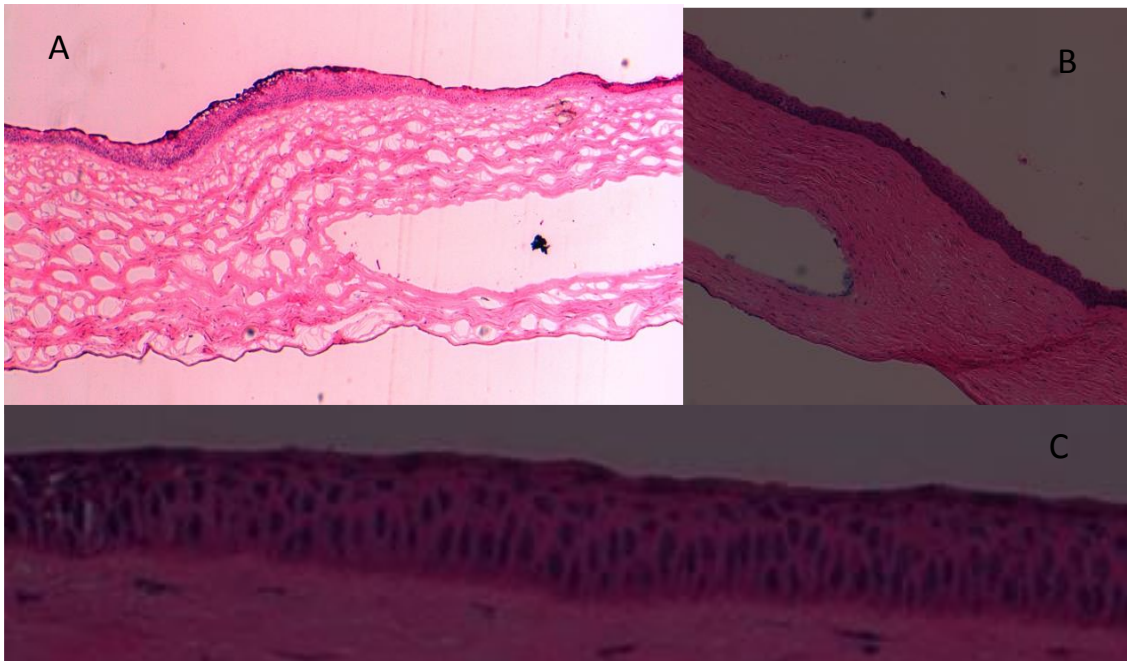


Figura 51. A) Sección parcial de la cornea del caso 501 (grupo 5) a 4 aumentos en la que se aprecia el espacio generado por el implante de PEGDA sin evidencia de restos del hidrogel. En el epitelio se aprecia un engrosamiento en el área de transición del implante de la LIE. B) Imagen correspondiente al caso 407 (grupo 4) en la que se aprecia un engrosamiento del epitelio corneal en la zona correspondiente al borde del implante de similares características. C) Imagen a 20 aumentos de un corte de córnea teñido con HE en la que se observa con más detalle el epitelio corneal sobre el área del implante.

7.2. ENDOTELIO Y MEMBRANA DE DESCOMET

El endotelio corneal se visualizó como una monocapa de células planas en los cinco grupos a estudio. No hemos hallado ningún cambio estructural del endotelio inducido por la disección estromal o el implante de PEGDA en los casos analizados en los diferentes grupos y tiempos posoperatorios (ver Figura 52).

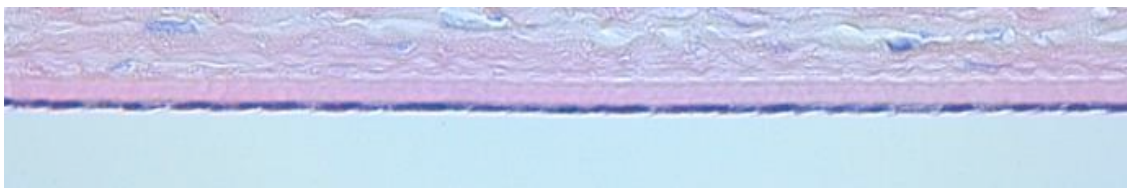


Figura 52. Imagen a 40 aumentos perteneciente al grupo 1 teñida con HE en la que se aprecia la monocapa de células planas del endotelio corneal, así como una banda homogénea de color rosado que se sitúa junto a éste y que corresponde con la membrana de Descemet.

7.3. ESTROMA

7.3.1. ESTROMA GRUPO 1

Las córneas del grupo 1 presentaron un estroma organizado en lamelas superpuestas con presencia de núcleos de queratocitos embebidos entre las lamelas.

7.3.2. ESTROMA GRUPO 2

El estroma corneal de los casos del grupo 2 presentó unas características similares a los casos del grupo control en 16 de los 21 casos en los que no apreciamos signos de presencia del plano de disección del bolsillo estromal (ver Figura 53). En cinco casos (casos 201, 209, 216, 217 y 222) (ver Figura 54), observamos la presencia de una proliferación desestructurada de fibras de colágeno en la zona correspondiente al plano de disección del bolsillo estromal. Estas áreas de cicatrización con fibras de colágeno desestructuradas asociaron una disminución o ausencia completa de los característicos núcleos de queratocitos estromales a ese nivel, a diferencia del resto del estroma corneal en el que los núcleos de los queratocitos se aprecian embebidos entre las lamelas de colágeno siguiendo la misma distribución que en el resto de los casos del grupo. El caso 216 mostro una hiper celularidad en la zona del plano de disección en el contexto de un proceso inflamatorio corneal más extenso y se analiza con más detalle en el apartado 7.5.

Las características del estroma anterior (por delante del plano de disección) fueron similares a las descritas en los casos del grupo control salvo en el caso 216, ya mencionado anteriormente, que asoció un infiltrado inflamatorio. La presencia de queratocitos activados fue más evidente en los casos 201, 203, 209, 210 y 216, mientras que el resto de casos mostraron queratocitos de características normales junto con algún queratocitos activado de forma aislada. En el estroma posterior pudimos observar cierto grado de compactación de las fibras de colágeno por debajo del plano de disección del bolsillo estromal. La estructura lamelar organizada de fibras de colágeno del estroma posterior permaneció respetada en todos los casos, incluidos aquellos en los que observamos una desorganización de las fibras de colágeno en el plano de disección estromal y en los casos con presencia de un infiltrado inflamatorio, que se limitó al estroma anterior.

HISTOLOGÍA (GRUPO 2)

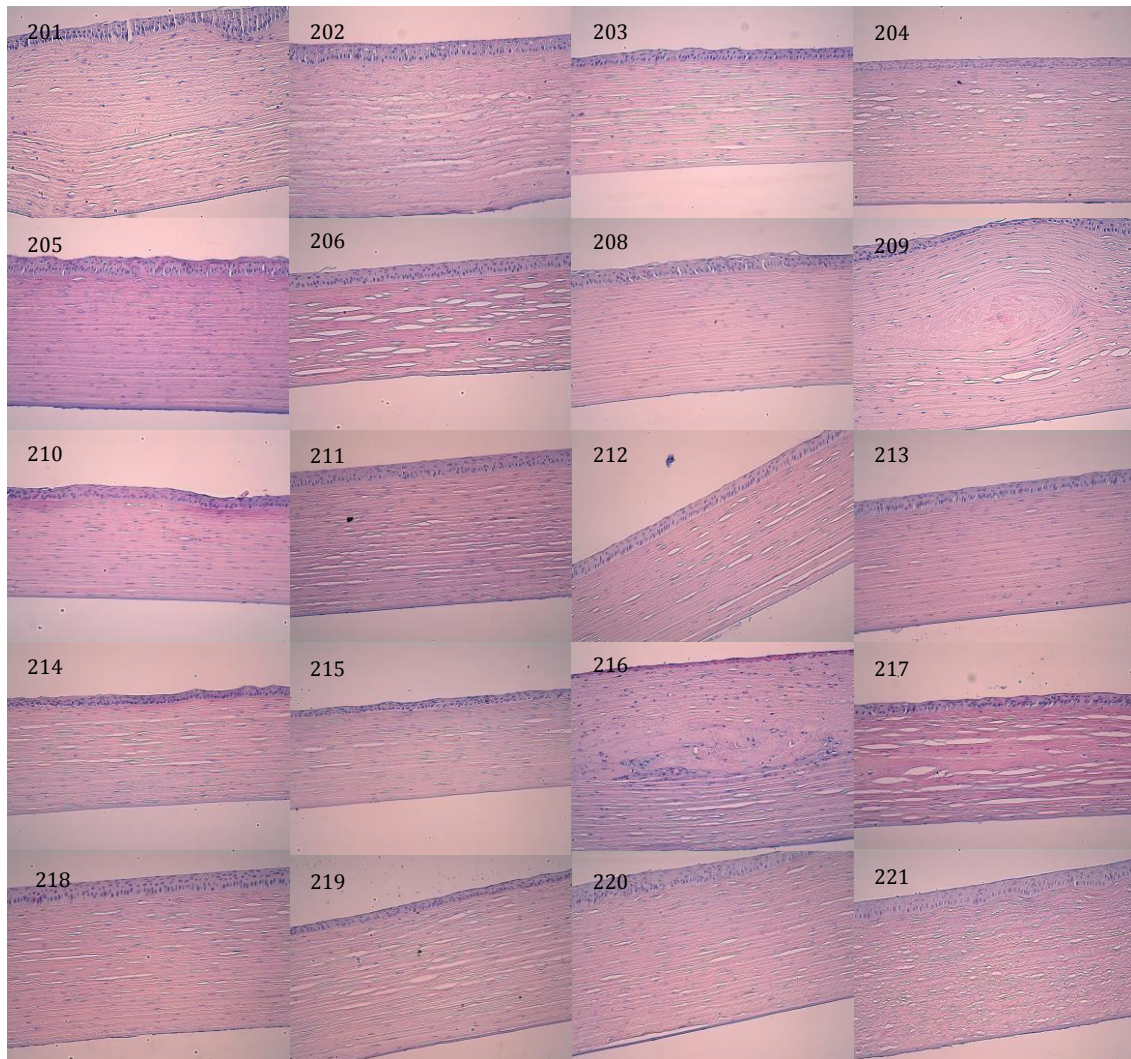


Figura 53. Imágenes de las secciones de los cortes de córnea teñidos con HE pertenecientes a los casos 201 a 221 (grupo 2).

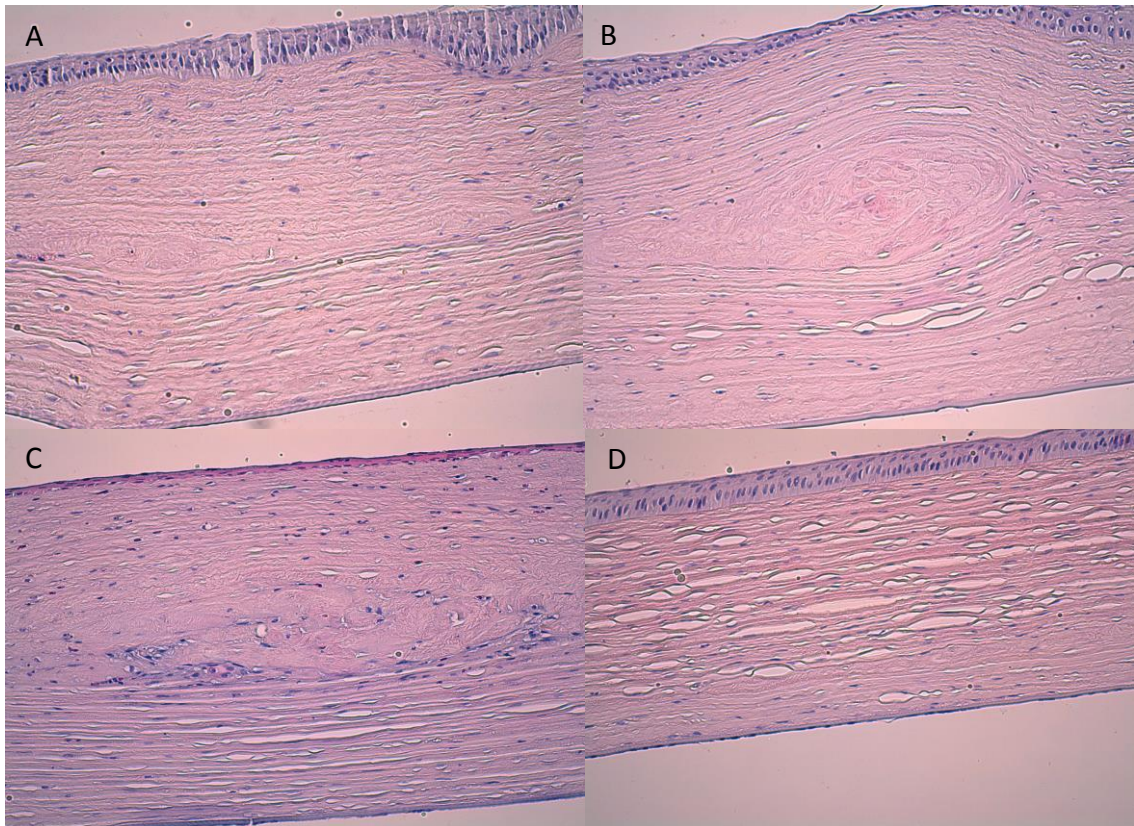


Figura 54. Imágenes a 10 aumentos del corte teñido con HE de los casos 201, 209, 216 y 222 (grupo 2) en las que se aprecia la presencia de una proliferación de fibras de colágeno desestructuradas en el plano de disección del bolsillo estromal.

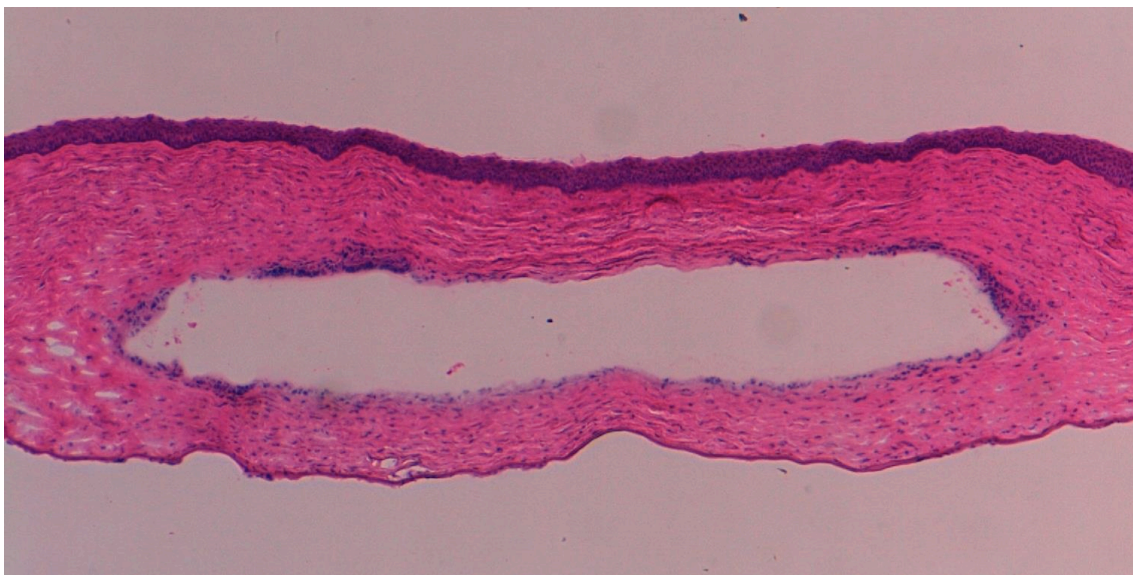


Figura 55. Imagen a 4 aumentos del corte teñido con HE del caso 409 en el que se aprecia el espacio intraestromal generado por la presencia del implante de PEGDA.

7.3.3. ESTROMA GRUPOS 3, 4 y 5

En los grupos 3, 4 y 5 (con LIE) se observó la existencia de un espacio vacío en el centro del estroma corneal correspondiente al área ocupada por el implante de PEGDA. Este espacio presentaba características morfológicas similares al implante con forma rectangular o trapezoidal y bordes redondeados tal y como se muestra en la figura 55. El grosor de este espacio osciló entre el 30% y el 50% del grosor corneal total resultante tras la implantación del lenticulo. La figura 58 muestra ejemplos de los diferentes casos del grupo 4 en los que podemos observar córneas con un 50% del espacio ocupado por el bolsillo estromal (casos 404, 405 o 412) y otras en los que el espacio virtual ocupado por el implante representó un tercio o menos del grosor corneal total (casos 401, 403, 406, 407 y 409).

El estroma corneal por delante del implante mostró características similares a las observadas en los grupos 1 y 2 con una mayor compactación de las fibras de colágeno por encima del implante y núcleos de queratocitos de características similares. En el estroma medio se pudieron observar fibras de colágeno desestructuradas así como una ausencia de queratocitos en el área correspondiente al plano de disección del bolsillo estromal en las zonas no ocupadas por el implante de PEGDA. Las características de este plano de disección fueron similares a las ya descritas en los casos del grupo 2 (ver Figura 56).

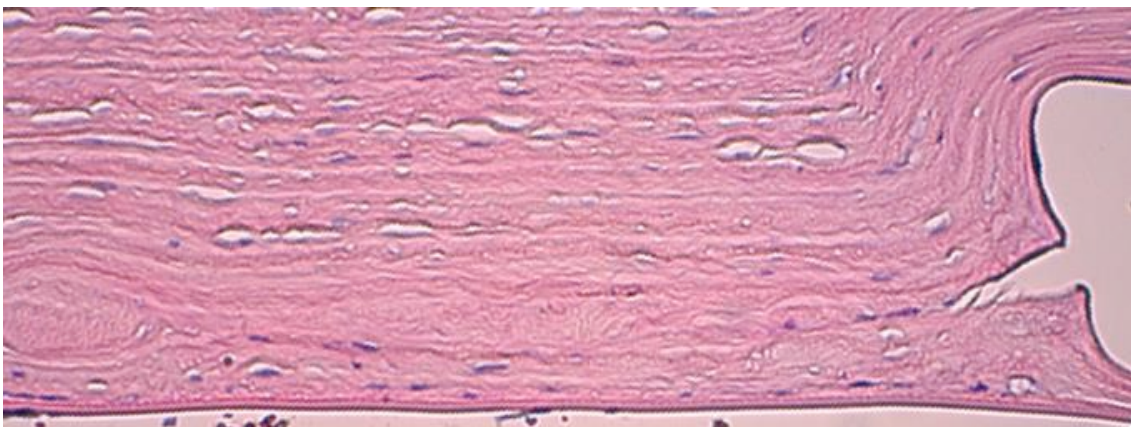


Figura 56. Imagen a 40 aumentos del corte teñido con HE del caso 309 (grupo 3) en el que se aprecia el espacio intraestromal generado por la presencia de implante de PEGDA. Junto al espacio de la lente se observa una abertura correspondiente al plano de disección del bolsillo estromal que se continúa con la presencia de una proliferación de fibras de colágeno desestructuradas similares a lo observado en las córneas del grupo 2.

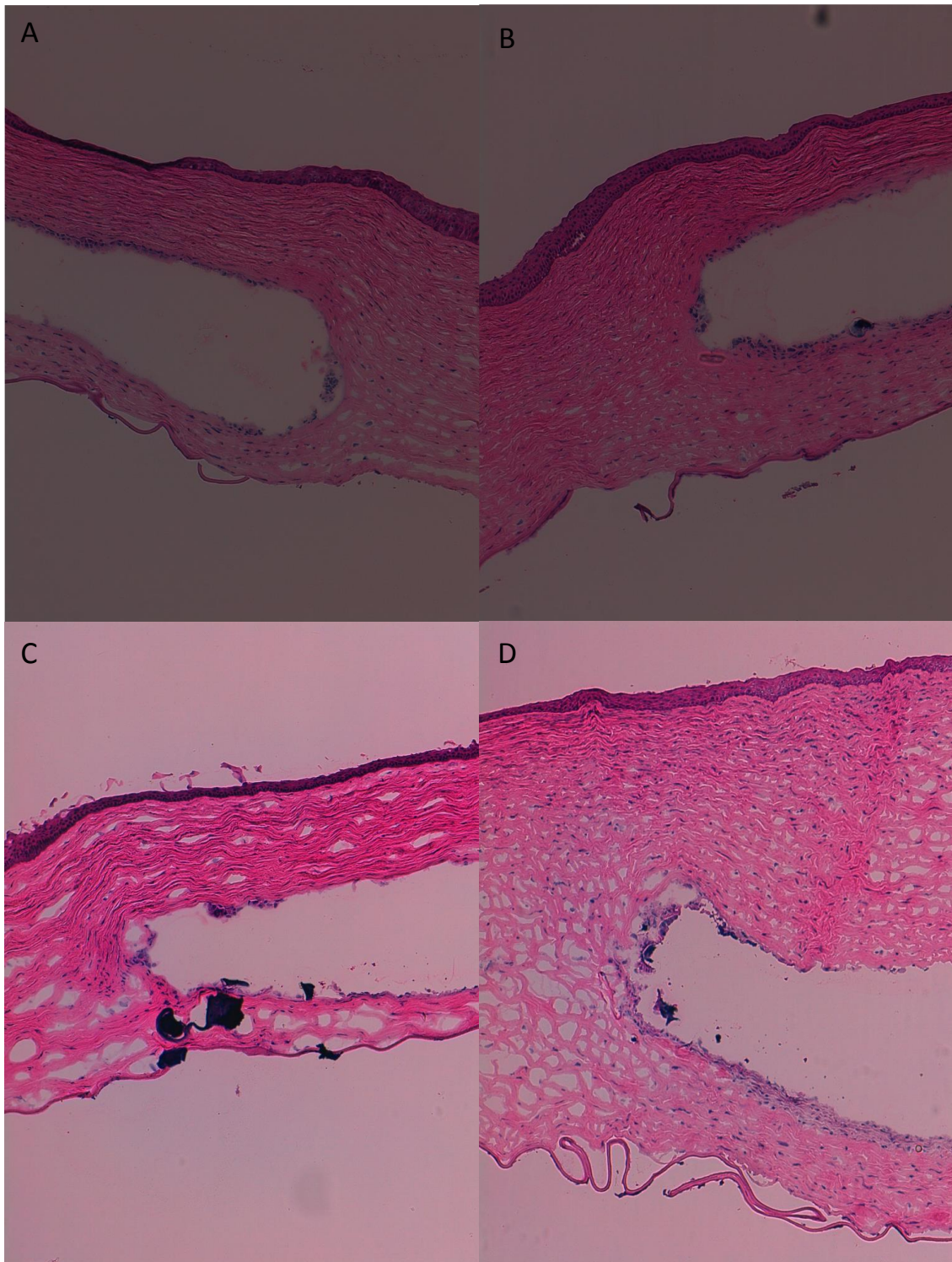


Figura 57. Imágenes a 10 aumentos de los casos 408, 410, 503 y 502 en las que se aprecia la compactación de las fibras de colágeno en el estroma anterior a la lente.

La profundidad a la que se planeó el bolsillo intraestromal fue de 250 μm en todos los casos de los grupos 2 a 5. En los cortes histológicos de las muestras corneales se observó que la profundidad real del plano de disección estromal osciló entre el 50% de espesor corneal y el plano predescemético, tal y como se observa en los casos 401 o 404. En la

mayor parte de los casos el plano de disección se situó entre el 60 y el 80% del espesor corneal (ver Figura 58).

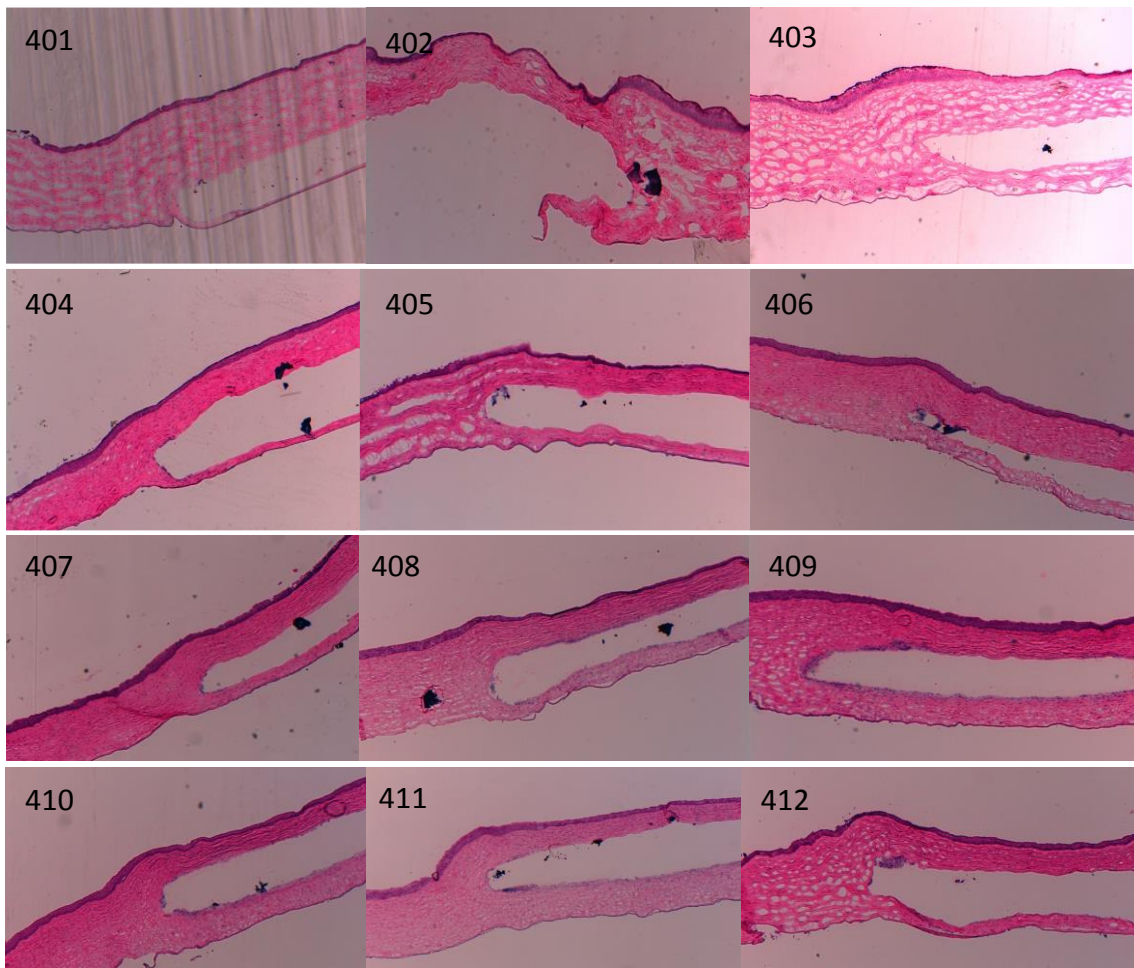


Figura 58. Casos 401 a 412 pertenecientes al grupo 4. Imagen a 4 aumentos de las secciones de los cortes de córnea teñidos con hematoxilina-eosina. En todos los casos se muestra la presencia de un espacio en el estroma corneal medio o posterior que se corresponde con el bolsillo corneal en el que se implantó el lente de PEGDA.

En los bordes de la luz generada por el implante intraestromal pudimos observar la presencia de acúmulos de células y de núcleos celulares que se localizaron preferentemente en los vértices del espacio intraestromal (ver Figura 57). Estas células presentaron características similares a los fibroblastos o a núcleos de queratocitos más o menos aplanados que permanecieron sueltos. En algunos casos pudimos observar la presencia de un recubrimiento interno de la luz en forma de monocapa o de pseudoepitelio poliestratificado, a expensas de una metaplasia pseudo-epiteliomatosa de estos queratocitos localizados en el borde de la luz. En ningún caso pudimos apreciar la presencia de verdaderas células de origen epitelial en el interior de la luz que sugieran un

crecimiento intraepitelial. Sin embargo, debido al procesado de las muestras, un análisis más detallado de las muestras no ha sido posible.

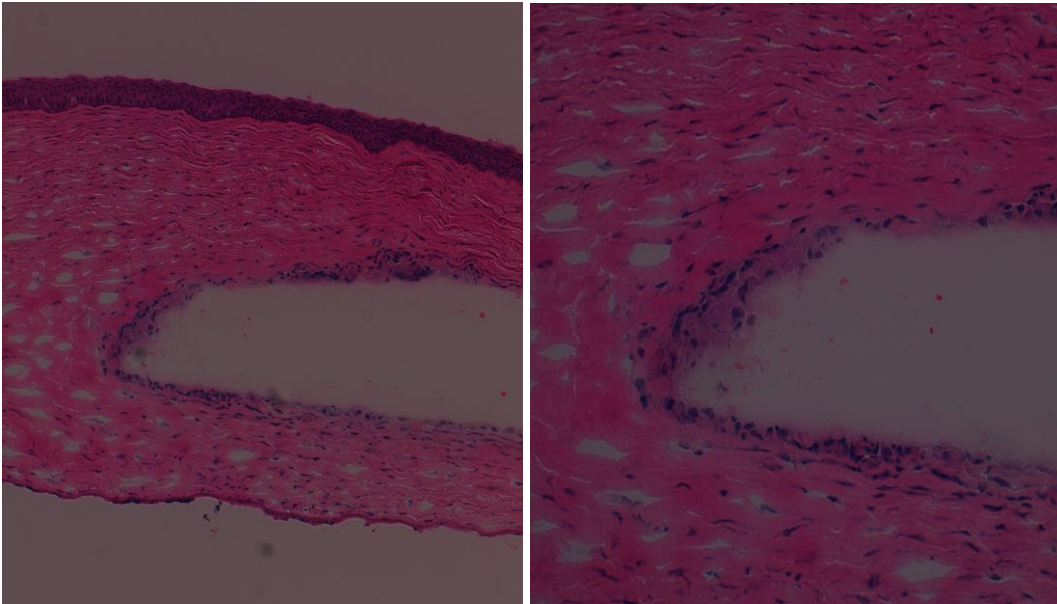


Figura 59. Imagen a 10 y 20 aumentos de la córnea correspondiente al caso 409 del grupo 4. En ambas imágenes se puede apreciar la presencia de acúmulos celulares en el ángulo del reborde del espacio generado por el implante estromal.

7.4. IMPLANTE INTRAESTROMAL

En todos los casos de los grupos 3, 4 y 5 (grupos con implante intraestromal de PEGDA) se observó un espacio más o menos vacío en el centro del tejido estromal descrito anteriormente. Las imágenes de las secciones de tejido mostraron restos del implante de hidrogel de PEG fragmentado y distorsionado que no siempre fueron detectables en todos los casos (ver Figura 60). Estos fragmentos del hidrogel de PEGDA se encontraron tanto en los bordes de la luz resultante tras el implante estromal, en el centro de ésta, sobre el tejido estromal o fuera de la pieza en forma de artefacto. En algún caso, (ver figura 60) se pudo apreciar una leve coloración azulada residual en el espacio ocupado originalmente por el lentículo como vestigio del hidrogel. Ninguna de las imágenes mostró el implante de PEGDA con su estructura, tamaño y forma original y en contacto directo con el estroma circundante.

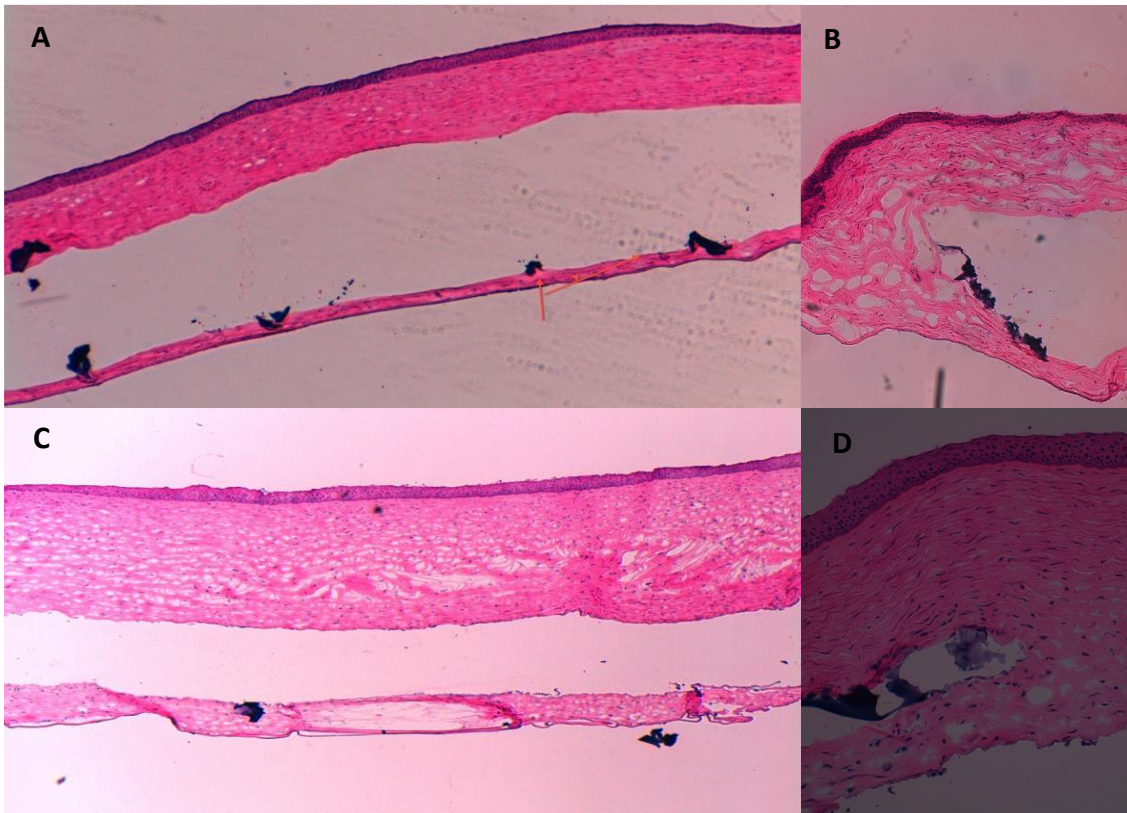


Figura 60. A, B, C y D: Imágenes a 4 aumentos correspondientes a los casos 404, 501, 502 y 406 en las que se aprecian fragmentos del hidrogel de PEGDA, fragmentados dentro y fuera de la luz originada por implante.

7.5. CASOS DE NEOVASCULARIZACIÓN E INFILTRACIÓN ESTROMAL

En las figuras 61, 63 y 64 se muestran ejemplos de 3 casos (216, 310 y 311) con inflamación significativa pertenecientes a los grupos 2 y 3, en los que pudimos apreciar una distorsión de las características de la estructura corneal descrita anteriormente.

En el caso 216 observamos un epitelio adelgazado con una monocapa de células planas y pérdida de las características celulares típicas del epitelio poliestratificado previamente descrito. En áreas más laterales del epitelio se aprecia la exocitosis de células inflamatorias junto a la necrosis de queratocitos subepiteliales formando una pústula (ver Figura 62-C). En el estroma medio pudimos observar la presencia de una proliferación desestructurada de fibras de colágeno junto con la formación de un granuloma y degeneración hialina en el área de la disección quirúrgica. En el estroma anterior pudimos apreciar un aumento del número de queratocitos activados con hipertrofia nuclear, vacuolización de queratocitos y la presencia de una infiltración de leucocitos polimorfonucleares (LPMN), predominantemente eosinófilos, y de algún linfocito junto a los neovasos (ver Figuras 61 y 62). Las características del estroma posterior por debajo de la disección estromal fueron

normales, mostrando una estructura lamelar de las fibras de colágeno y un endotelio de características normales.

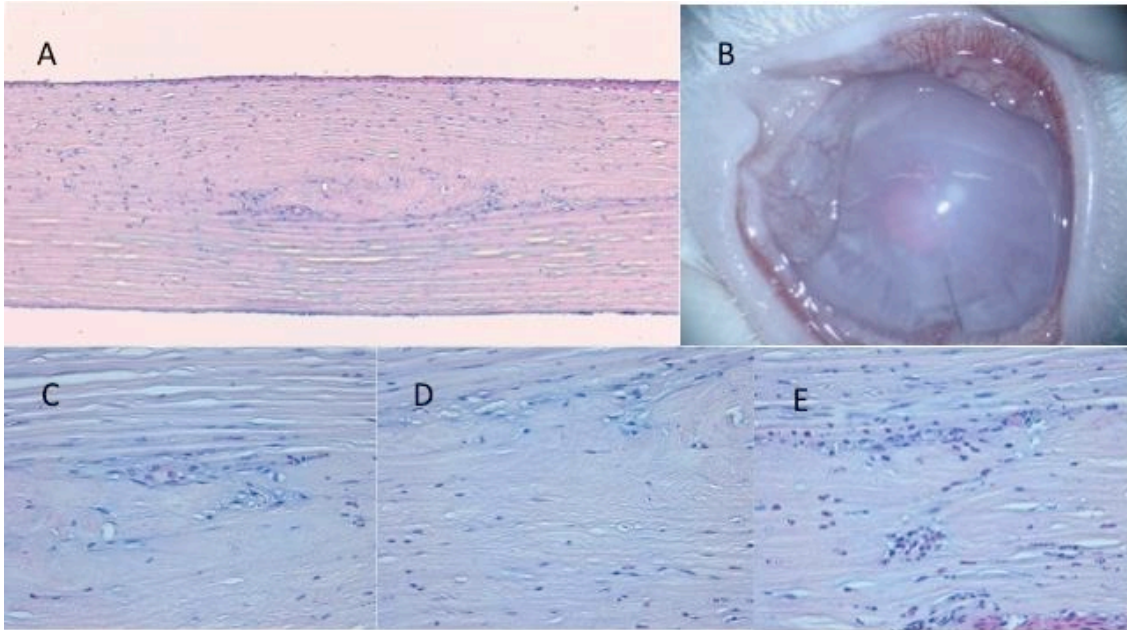


Figura 61. B: imagen biomicroscópica del caso 216 (grupo 2) con presencia de infiltración estromal, edema y neovascularización. A: corte histológico a 10 aumentos de la córnea central del caso 216 teñido con HE. C y D: cortes a 40 aumentos del caso 216. E: imagen a 63 aumentos de la misma sección histológica que la imagen A.

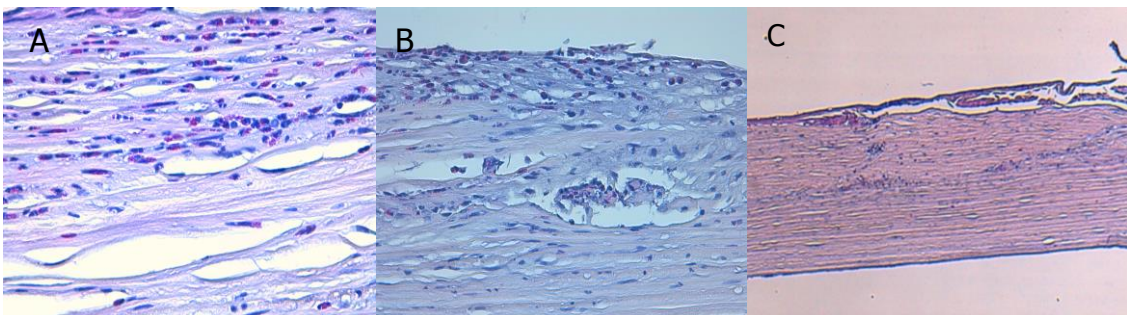


Figura 62. A y B: imágenes a 63 aumentos correspondientes al caso 216 en las que se aprecia a más detalle la presencia de eosinófilos y linfocitos en el estroma anterior (por delante del plano de disección corneal). C: imagen del caso 216 a 4 aumentos en la que se aprecia una pústula epitelial.

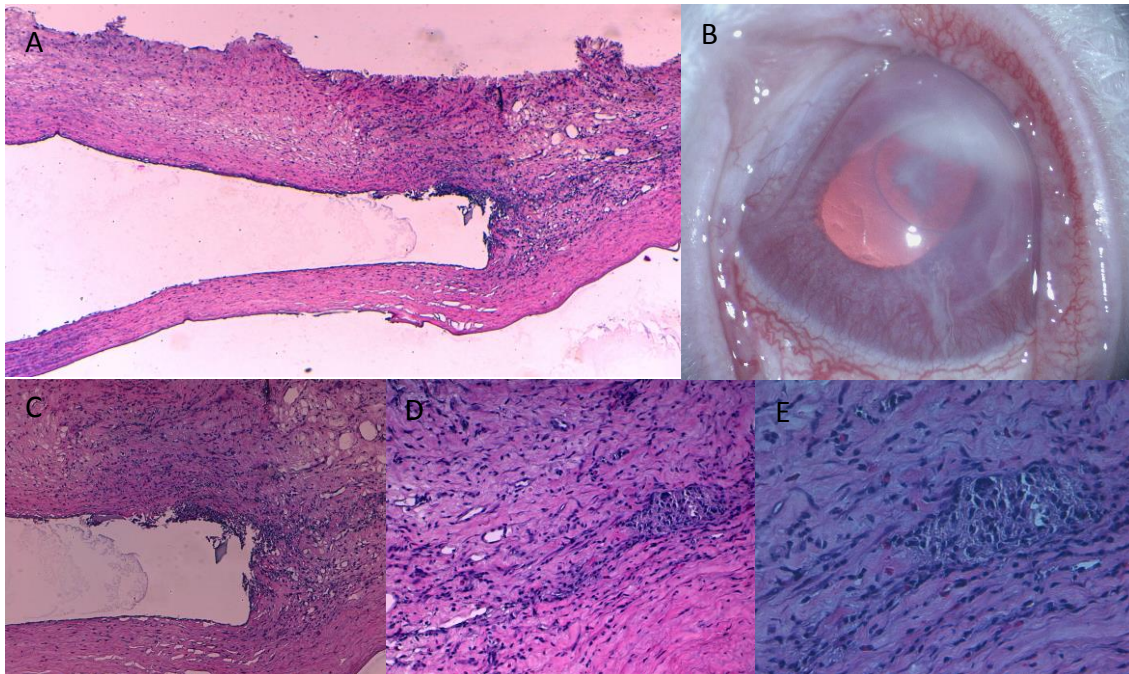


Figura 63. B: imagen biomicroscópica del caso 310 (grupo 3) con presencia de infiltración estromal, edema y neovascularización. A: corte histológico a 4 aumentos de la córnea central del caso 310 teñido con HE en la que se aprecia el espacio generado por el implante intraestromal, los restos del implante de PEGDA y la presencia de células inflamatorias en el estroma. C, D y E: cortes histológicos a 20, 40 y 63 aumentos, respectivamente, del caso 310 en las que se muestran las células inflamatorias y los neovasos con más detalle.

En el caso 310 observamos una ausencia de células epiteliales características sin la presencia de una transición celular marcada entre el estroma anterior y el epitelio. En el estroma anterior se apreció una infiltración masiva por LPMN, predominantemente eosinofílica, junto con algún linfocito entre las lamelas de colágeno, así como la presencia cariorrexis de LPMN y algún macrófago aislado (ver Figura 63). La fibras de colágeno en este estroma anterior mostraron una desestructuración con pérdida del aspecto laminar del colágeno. Entre ellas se pudo observar la presencia de un número elevado de queratocitos activados con núcleo hipertrófico y de fibroblastos, así como la presencia de queratocitos necróticos y vacuolizados. El número de neovasos en el estroma anterior fue elevado sin evidencia de estos en el estroma posterior al plano de disección, tal y como se aprecia en las fotografías biomicroscópicas de la córnea. En la luz estromal central se apreciaron restos del implante original de PEGDA así como acúmulos de núcleos de queratocitos en los bordes. Bordeando la luz se observó la presencia de una monocapa de células planas en forma de metaplasia pseudoepiteliomatosa de queratocitos recubriendo el borde de la luz. Las características del estroma posterior por debajo del implante intraestromal fueron

normales, mostrando una estructura lamelar de las fibras de colágeno y un endotelio de características normales así como la ausencia de células inflamatorias y neovasos.

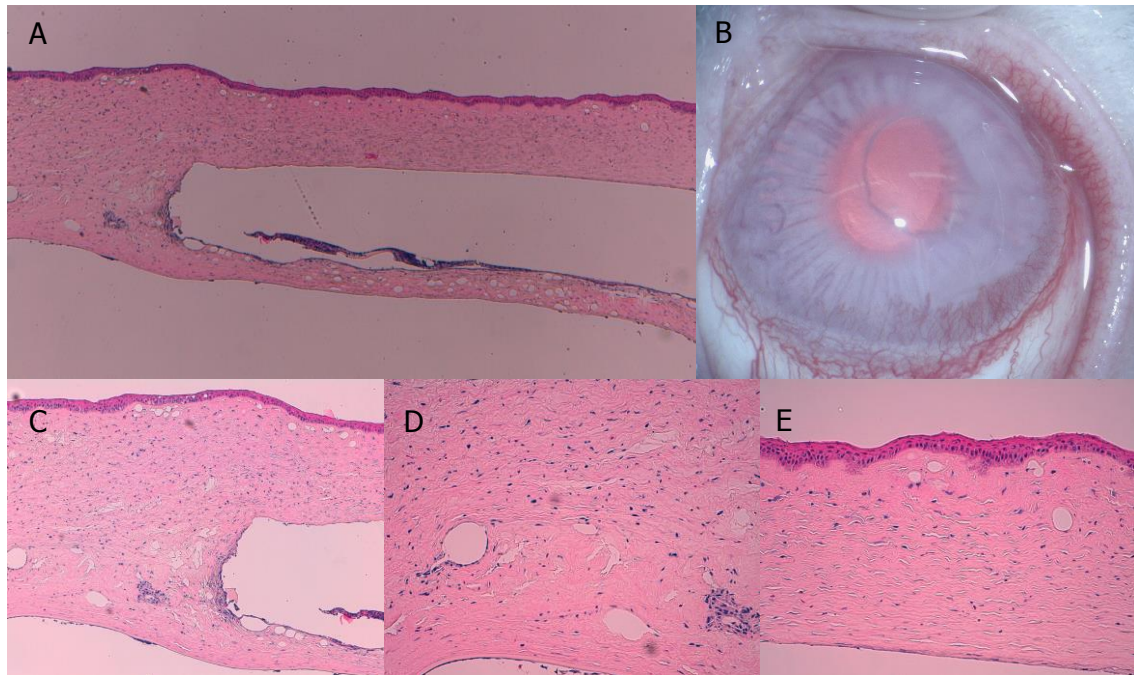


Figura 64. B: imagen biomicroscópica del caso 311 (grupo 3) con presencia de edema estromal y neovascularización. A: corte histológico a 4 aumentos de la córnea del caso 311 teñido con HE en la que se aprecia el espacio generado por el implante intraestromal, los restos del implante de PEGDA y la presencia de células inflamatorias en el estroma. C, D y E: cortes histológicos a 10 y 20 aumentos, respectivamente, del caso 311 en los que se muestran las células inflamatorias y los neovasos con más detalle.

En las imágenes correspondientes al caso 311 se pudo apreciar un epitelio adelgazado sobre el área del implante (ver Figura 64). En el estroma anterior observamos una leve infiltración leucocitaria mayoritariamente eosinofílica, la presencia de queratocitos activados, de queratocitos vacuolizados y cierto grado de desestructuración de las fibras de colágeno. Se pudo apreciar algún neovaso, visible también en las imágenes biomicroscópicas, sin evidencia de éstos en el estroma posterior al plano de disección. Por debajo del implante intraestromal observamos una estructura lamelar de las fibras de colágeno estromales y un endotelio de características normales. Entre las lamelas de estroma posterior pudimos observar la presencia de algún eosinófilo. Bordeando la luz generada por el implante se aprecia una monocapa de células planas de características similares a los queratocitos y restos del implante de PEGDA.

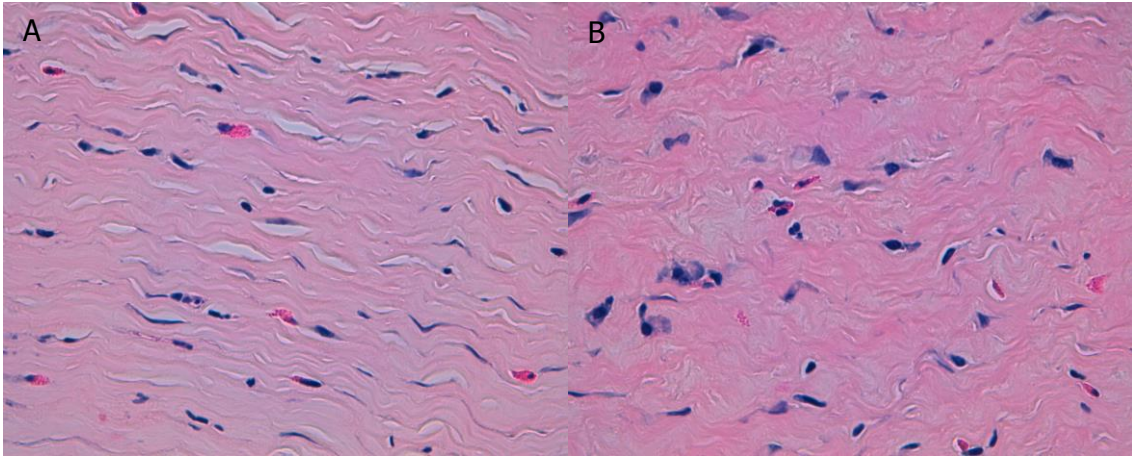


Figura 65. A y B: corte histológico a 63 aumentos de la córnea del caso 311 teñido con HE en el que se aprecia con mayor detalle la presencia del infiltrado de eosinófilos.

8. EXPRESIÓN DE PROTEINAS DE MEC POR RT-qPCR

La tabla 30 muestra los resultados de la expresión de mRNA del colágeno-1A (col-1A), queratocán y metaloproteasa de matriz de tipo 1 (MMP-1) del tejido corneal de los casos pertenecientes a los grupos 2 a 5, por RT-qPCR mediante un método de cuantificación relativa expresado en $\Delta\Delta Ct$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*).

Tabla 30. Expresión de Colágeno-1A, MMP-1 y Queratocán por RT-qPCR

	Colágeno-1A			MMP-1			Queratocán		
	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	DE $\Delta\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	DE $\Delta\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	DE $\Delta\Delta Ct$
Grupo 2	-0,7	1,62	1,59	0,9	0,54	0,84	1,6	0,33	1,76
Grupo 3	-2,94	7,67	1,28	0,41	0,75	0,87	0,28	0,82	1,34
Grupo 4	-1,74	3,34	1,35	0,46	0,73	0,57	1,5	0,35	2,0
Grupo 5	0,26	0,86	1,42	1,9	0,27	0,12	3,56	0,08	2,41

TABLA 30. Media de la expresión $\Delta\Delta Ct$ y $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold change*) de colágeno-1A (col-1A), metaloproteasa de matriz-1 (MMP-1) y queratocán y desviación estándar del $\Delta\Delta Ct$, medidas por RT-qPCR en los grupos 2-5 ($2^{-\Delta\Delta Ct}=1$ referencia; $2^{-\Delta\Delta Ct} >1$ sobreexpresión; $2^{-\Delta\Delta Ct} <1$ infraexpresión).

- Ct= Ciclo humbral.
- ΔCt = Diferencia entre el Ct del gen objetivo y el Ct del gen referencia (*housekeeping gene*).
- $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt en la muestra objetivo - ΔCt de la muestra control (media grupo 1).
- $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = Mide el *fold change* de la expresión del gen objetivo en la muestra objetivo.

La expresión de col-1A, queratocán y MMP-1 de grupo 1 (control) se empleó como referencia para el cálculo de $\Delta\Delta Ct$. Los valores (media +/- DE) de ΔCt para el col-1A, queratocán y MMP-1 se describen en la tabla 31.

Tabla 31. Valores de referencia de la expresión de Colágeno-1A, MMP-1 y Queratocán por RT-qPCR en corneas control.

Colágeno-1A	5,7 +/- 1,6
MMP-1	9,3 +/- 0,6
Queratocán	6,8 +/- 1,7

8.1. EXPRESIÓN DE COLÁGENO-1A

Observamos una sobreexpresión de col-1A de 1,6 *folds*, 7,6 *folds* y 3,34 *folds* en los grupos 2, 3 y 4, respectivamente. En el grupo 5 el col-1A se infraexpresó en 1,4 *folds*. La comparación, en unidades arbitrarias de expresión (UAE), de la expresión del col-1A entre grupos mostró un valor de $p=0,01$. La mayor sobreexpresión de col-1A ocurrió en el grupo 3. Las comparaciones individuales de la expresión de col-1A entre grupos mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 2 y 3 (con y sin LIE) ($p<0,001$), mientras que las diferencias no resultaron estadísticamente significativas entre los grupos 3 y 4 ($p=0,061$). No se realizaron comparaciones del resto de los grupos con el grupo 5 debido al tamaño de la n y a la alta variabilidad en la expresión de col-1A en dicho grupo.

Entre los grupos con LIE encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,011$) en la expresión del col-1A entre los grupos tratados con corticoides (grupos 4 y 5) y el grupo sin corticoides (grupo 3).

8.2. EXPRESIÓN DE MMP-1

Observamos una reducción de la expresión de MMP-1 en todos los grupos a estudio. Esta infraexpresión fue de 4,6 *folds*, 2,5 *folds*, 2,7 *folds* y 7,3 *folds* en los grupos 2, 3, 4 y 5, respectivamente. La diferencia en la infraexpresión (en UAE) entre los cuatro grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,054$). La comparación de las expresiones de MMP-1 entre los diferentes grupos tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre éstos:

- Grupos 2 y 3 ($p=0,117$)
- Grupos 2 y 4 ($p=0,785$)
- Grupos 2 y 5 ($p=0,527$)

- Grupos 3 y 4 ($p=0,819$)
- Grupos 3 y 5 ($p=0,09$)
- Grupos 4 y 5 ($p=0,271$)

Entre los grupos con LIE no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,147$) en la expresión del MMP-1 entre los grupos 4 y 5, tratados con corticoides y el grupo 3 sin corticoides.

8.3. EXPRESIÓN DE QUERATOCÁN

Observamos una reducción de la expresión de queratocán en todos los grupos a estudio. La reducción de la expresión fue de 6,7 *folds*, 1,8 *folds*, 6,8 *folds* y 12 *folds* en los grupos 2, 3, 4 y 5, respectivamente. La diferencia en la magnitud de la infraexpresión (en UAE) entre los cuatro grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,46$). La comparación de las expresiones de queratocán entre los diferentes grupos tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas entre éstos:

- Grupos 2 y 3 ($p=0,58$)
- Grupos 2 y 4 ($p=0,81$)
- Grupos 2 y 5 ($p=0,95$)
- Grupos 3 y 4 ($p=0,99$)
- Grupos 3 y 5 ($p=0,64$)
- Grupos 4 y 5 ($p=0,75$)

La comparación de la expresión de queratocán entre los grupos con LIE tratados con dexametasona (grupos 4 y 5) y no tratados con dexametasona (grupo 3) no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,588$).

DISCUSIÓN

1. DESARROLLO DE LENTES INTRAESTROMALES

1.1. MATERIAL

Las características ideales de los materiales sintéticos para su uso como implantes intraestromales, tanto con fines refractivos como regenerativos, han sido descritas previamente (ver Tabla 4). Así, una lente ha de tener las siguientes propiedades para su correcto funcionamiento como implante intraestromal: transparencia, resistencia mecánica adecuada, permeabilidad al paso de nutrientes y de agua¹⁴⁷ y un índice de refracción (IR) similar o superior al de la córnea.¹⁶⁴ A su vez, el material implantado ha de mantener sus propiedades ópticas tras la implantación *in vivo* en el tejido estromal.¹⁷⁴

1.1.1. HIDROGELES

Los hidrogeles son redes tridimensionales de polímeros hidrófilos que poseen la propiedad de absorber gran cantidad de agua y otros fluidos biológicos sin perder la capacidad de mantener su estructura. Esta capacidad de absorción del agua depende de diferentes factores entre los que se encuentran la concentración del polímero, las propiedades reticulares del hidrogel o la temperatura circundante.¹⁴⁸ Debido a su permeabilidad, a sus propiedades ópticas y a la posibilidad de servir como vehículo para la liberación de fármacos,^{196,197} los hidrogeles han sido empleados en oftalmología tanto para el desarrollo de lentes intraestromales (LIE) con finalidad refractiva como para la fabricación de queratoprótesis como el modelo AlphaCor™.²⁰⁵

1.1.2. MÉTODO DE ENTRECruzAMIENTO DEL HIDROGEL: FOTOPOLIMERIZACIÓN

El presente trabajo es parte de una línea de investigación más amplia del grupo de oftalmología del Hospital Universitario Donostia junto con el área de biomateriales de la Fundación Inasmet-Teknalia cuyo objetivo final es el desarrollo de una lente Core-Skirt para su uso como queratoprótesis.^{206-A} Basándonos en el modelo proporcionado por la queratoprótesis AlphaCor™ del grupo de Chirila²⁰⁵ en el que tanto la zona óptica como la zona periférica de anclaje están fabricados del mismo material, se plantea el desarrollo de un implante de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) con una zona central (CORE) o sistema óptico y un componente periférico (SKIRT) o sistema de anclaje en el que se encapsulan queratocitos y microesferas cargadas con dexametasona. El objetivo de este implante era: 1) conseguir la viabilidad de estos queratocitos aislados de su tejido original que les permita producir componentes de MEC para la integración del implante en la córnea y 2) permitir la liberación de la dexametasona desde las microesferas.

Debido a que la encapsulación de células y de microesferas en el hidrogel era uno de los objetivos de esta línea de investigación y basándonos en la experiencia previa de los investigadores del grupo en encapsulación de queratocitos,^{206-B} se optó por la fotopolimerización como método de entrecruzamiento más apropiado para el desarrollo del hidrogel de los implantes. La ventaja de la fotopolimerización como método de entrecruzamiento de los hidrogeles reside en la posibilidad de crear hidrogeles *in situ*, así como en encapsular células y microesferas en estos hidrogeles.

1.1.3. EL HIDROGEL DE PEGDA

Para la fabricación de nuestro hidrogel se empleó un macrómero de polietilenglicol (PEG) al que se le incorporaron dos acrilatos: polietilenglicol diacrilato (PEDA) ya empleado previamente para la fabricación de implantes y para la liberación de fármacos.^{207,208} El peso molecular del macrómero, de 3400 Da, condicionó el tamaño y la permeabilidad de la malla del hidrogel y su validez para el desarrollo de implantes intracorneales.²⁰⁷

La concentración final de polímero de PEGDA por la que se optó para la dilución fue del 30% con la que el grado de hinchamiento volumétrico (Q) fue de $0,78 \pm 0,15$ mientras que el contenido en agua del hidrogel fue del 79%, similar al de otros implantes estromales como el modelo PermaVision,^{159,162} con un contenido en agua del 78% y al de la córnea, cuyo porcentaje de agua se establece en el 78%.²⁰⁹

1.1.3.1. Propiedades ópticas

La transparencia de los implantes se midió mediante un estudio de transmisión de la luz y fue superior al 98% en el espectro visible (entre 450-700 nm), mientras que en el espectro ultravioleta (250-400 nm) osciló entre el 2,92% y el 93,54%. Igualmente, la absorción de la luz en el espectro ultravioleta osciló entre 1,57 a 0,06 para cada rango. La transparencia corneal es fundamental para el mantenimiento de sus funciones ópticas. De igual manera, los implantes intraestromales, para su uso con finalidades tanto ópticas como terapéuticas, han de mantener estas mismas características de transparencia y han de ser capaces de transmitir cantidades de luz del espectro visible por encima del 90%. Por otro lado, es conocido que la exposición corneal a la luz ultravioleta induce cambios patológicos en la estructura corneal²¹⁰ y que cantidades variables de radiación ultravioleta pueden atravesar la córnea y alcanzar estructuras oculares internas e inducir un daño ocular irreversible.²¹¹ Trabajos recientes han mostrado que los estratos corneales anteriores (epitelio y membrana de Bowman) poseen coeficientes de absorción de luz ultravioleta superiores al estroma corneal, a pesar de que es el estroma corneal, debido a su mayor grosor, el responsable de entre el 70 y el 75% de la absorción de luz ultravioleta de la córnea.²¹² Un

implante intraestromal ideal ha de absorber la mayor cantidad de luz del espectro ultravioleta permitiendo la trasmisión del mayor porcentaje de luz del espectro visible.

El índice de refracción (IR) de la córnea es de $(1,376)^5$ y está teóricamente representado como una función de la hidratación estromal.²¹³ Esta relación teórica asume que la naturaleza óptica de la córnea es común a todos los mamíferos y la distribución de agua en la córnea es uniforme. Sin embargo trabajos posteriores muestran que las características de hinchamiento y la hidratación de los compartimentos anterior y posterior de la córnea difieren.²¹⁴ Por otro lado, cambios en la hidratación del estroma dan lugar a cambios en su IR y subsiguientemente en la óptica corneal. El IR de los implantes intraestromales depende del material y de su grosor siendo de 1,35 en el hidrogel de los implantes de este estudio. En términos generales, un implante intraestromal de hidrogel tiene un IR similar al de la córnea. Implantes de otros materiales con índices de refracción superiores tendrían utilidad refractiva permitiendo una mayor potencia refractiva añadiendo menos volumen, mientras que implantes de similar IR a la cornea (hidrogeles) serían de utilidad para su uso con finalidades terapéuticas o precisarían de un mayor grosor para moldear la córnea con finalidad refractiva.

1.1.3.2. Permeabilidad a la glucosa

De los trabajos de McCarey y Schmidt acerca de la distribución de glucosa en la cornea conocemos que la permeabilidad a la glucosa del hidrogel es el factor determinante en la biocompatibilidad de los implantes estromales.⁴⁵ Más recientemente, Larrea y colaboradores estudiaron la distribución de glucosa corneal tras implantes estromales implantados a diferentes profundidades en los que la concentración de glucosa epitelial desciende hasta un 76% con materiales impermeables, confirmando la importancia de la permeabilidad de los implantes a la glucosa y otros solutos.¹⁴⁷

La permeabilidad a la glucosa del hidrogel se evaluó comparándola con especímenes de córnea de conejo *ex vivo*, para los que obtuvimos unos valores del coeficiente de difusión de la permeabilidad a la glucosa (D) de $D=1,11 \times 10^{-9}$ cm²/s para el hidrogel de PEGDA y $D=1,87 \times 10^{-9}$ cm²/s para la córnea de conejo. Estos resultados muestran que el hidrogel fue permeable a la glucosa pero en menor grado que la córnea control de conejo y que lo descrito por otros autores con diferentes hidrogeles.¹⁹⁴

1.1.3.3. Las dimensiones del implante de PEGDA

La experiencia ha mostrado que de los implantes intraestromales con finalidad refractiva cuyo objetivo no sea el de moldear la superficie anterior de la córnea han de ser lo más

finos posibles,¹⁶⁵ a diferencia de los implantes intracorneales terapéuticos para su uso como sustitutos corneales de mayor grosor. Los implantes intraestromales de hidrogel descritos en la literatura presentan grosores variables desde 350 μm de las series iniciales,²¹⁵ 15-45 μm ¹⁵⁸ o 25-60 μm ¹⁵⁹ en diferentes series con implantes PermaVision, hasta grosores de 32-36 μm de los implantes de hidrogel para presbicia del modelo Raindrop.¹⁷⁶ McCarey y colaboradores describieron que el flujo de glucosa a través de una LIE de hidrogel semipermeable es directamente proporcional al gradiente de concentración de glucosa y al coeficiente de difusión del material e inversamente proporcional al grosor de la lente.⁴⁵ En sus ensayos observaron que la diferencia en la concentración epitelial de glucosa en el cornea central por delante de una LIE de hidrogel (con un contenido en agua del 70%) implantada en el estroma medio descendía de 548 $\mu\text{g/ml}$ a 411 $\mu\text{g/ml}$ al incrementar el grosor de la LIE de 0,5 mm a 2 mm.⁴⁵ En base a estos conocimientos y a la experiencia previa en la fabricación de LIE, decidimos fabricar implantes de 100 μm de espesor central.

Respecto del diámetro de los implantes, de los trabajos iniciales de Maurice conocemos que implantes no permeables de diámetros superiores a 4 mm impiden la difusión lateral de glucosa, por lo que 4 mm sería el diámetro máximo de una LIE no permeable para permitir un adecuado aporte de glucosa al estroma anterior y al epitelio.²¹⁶ Con lentes de hidrogel, la difusión lateral y a través del implante semipermeable de la glucosa se equiparan, por lo que aunque teóricamente, reducir el diámetro de la LIE pudiera permitir una mayor difusión lateral de glucosa, las concentraciones de glucosa en el estroma anterior y el epitelio no varían (450 $\mu\text{g/ml}$) con implantes permeables de entre 4 y 7 mm de diámetro implantados en el estroma medio.⁴⁵ Así, la decisión de fabricar implantes de 4 mm de diámetro se basó en la experiencia previa descrita en la literatura con lentes de hidrogel y en las diferentes series publicadas con implantes de hidrogel (en las que se proporciona su medida), que oscilan entre 4 y 6,5 mm.^{153,159,217,218}

1.2. MICROESFERAS DE PLGA-DEXAMETASONA

El grupo 5, en el que se implantaron lentes intraestromales con microesferas de PLGA (ácido poli láctico-glicólico) cargadas con dexametasona (DXM) encapsuladas en el hidrogel de PEGDA al 30%, se introdujo para estudiar el efecto de la DXM liberada desde las microesferas en la inflamación corneal y en la inhibición de la expresión de metaloproteasa de matriz tipo 1 (MMP-1). La DXM de estos implantes poseería una doble encapsulación: 1) por las microesferas y 2) por la propia encapsulación de las microesferas en el hidrogel.

El objetivo fue:

1. Conseguir un implante intraestromal corneal biocompatible con características de transparencia, permeabilidad e hidratación equiparables a los implantados en los grupos 3 y 4.
2. Obtener un dispositivo de liberación sostenida de DXM mediante un sistema de doble encapsulación.

El PLGA (ácido poli láctico-glicólico) es un co-polimero biodegradable sintético de ácido láctico y glicólico, perteneciente al grupo de los poliésteres, cuyo uso para encapsular fármacos y como dispositivo para liberación controlada se ha extendido en la investigación biomédica por su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica y por su sencillez de formulación.^{219, 220}

El PLGA en oftalmología se ha empleado como implante subconjuntival e intravítreo para la liberación de diferentes principios activos, entre los que se encuentra la dexametasona, y se ha ensayado para el tratamiento de patologías del segmento anterior y posterior del ojo,^{221, 222} con el objetivo de solventar los problemas de penetración del fármaco asociados a la instilación tópica de colirios.²²³ En la actualidad existe un dispositivo de liberación intravítrea de PLGA-DXM comercializado con el nombre de Ozurdex™ (Allergan, Inc., Irvine. CA) indicado para el tratamiento del edema macular diabético, edema macular secundario a oclusión venosa central o de rama retiniana y al edema macular asociado a uveitis posteriores no infecciosas.^{224,225,226}

Mediante la metodología descrita anteriormente, fabricamos microesferas de $1,49 \pm 0,1\mu\text{m}$ de diámetro que se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido. A menor tamaño de las partículas, mayor posibilidad de ser absorbidas por cualquier tipo celular favoreciendo su difusión, de manera que su efecto puede extenderse. Partículas más grandes ejercerían su efecto de forma más localizada.

La eficacia de encapsulación representa la capacidad de carga de las micropartículas con el principio activo, reflejando así la cantidad de principio activo del implante, y fue del $22,8 \pm 12,3\%$. A menor tamaño de las microesferas, menor fue la eficiencia de encapsulación y mayor la heterogeneidad de la carga farmacológica de DXM que fue de $20,8 \pm 11,2 \mu\text{g}$ dexametasona/mg microesfera. La carga teórica de DXM ($2-4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) se estableció basándonos en los datos bibliográficos que definen la carga de dexametasona necesaria para la inhibición in vitro de la proteasa de matriz extracelular tipo I (MMP-I) ($0,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$),²²⁷

DISCUSIÓN

para lo que se incorporó una concentración final de microesferas del 14% (p/p respecto al PEGDA) para un porcentaje teórico de dexametasona del implante de 1,35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2. DISCUSIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

2.1 EL MODELO EXPERIMENTAL: ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL

La elección del conejo albino New Zealand como modelo animal en nuestro estudio se basó en la similitud de las características histológicas que presenta la córnea de conejo con la humana,²²⁸ así como en la experiencia previa del grupo investigador con este modelo animal.^{199,200} Entre sus ventajas se encuentran la fácil estabulación, manipulación, manejo quirúrgico y anestésico y un menor coste económico en comparación con otros modelos animales.

Los modelos animales empleados para estudios oftalmológicos han sido diversos. De entre ellos, el mono presenta una mayor similitud con el humano en cuanto a las características de la córnea.²²⁹ Los problemas del mono para su uso como modelo animal para estudios corneales son múltiples: desde el aspecto económico, a la difícil adquisición y manejo, pasando por consideraciones éticas. Es por todo ello por lo que su uso como modelo animal no se ha generalizado. El modelo murino, por el contrario, debido a sus dimensiones reducidas no resulta el más apropiado para estudios corneales de características similares al nuestro. El conejo albino New Zealand y el cerdo han sido los animales más frecuentemente empleados en estudios experimentales corneales.⁵³

Tal y como se ha descrito en la introducción, el grosor corneal medio del conejo es menor y ronda las 400 μm a diferencia del humano que es superior a 520 μm de media.¹ Por el contrario, el ojo de cerdo, cuyo grosor corneal medio es de 850 μm , resultaría excesivo para valorar la biocompatibilidad de los implantes intraestromales ya que ésta está condicionada por los espesores corneales entre el implante y el endotelio y el implante y el epitelio. Por este motivo, las corneas con un grosor significativamente mayor al humano no serían las idóneas para realizar estudios de biocompatibilidad de materiales intraestromales de estas características.

A pesar de la similitud entre la cornea humana y la del conejo, algunas de las diferencias mencionadas anteriormente entre ambas han influido en nuestro planteamiento quirúrgico. Teniendo en cuenta el grosor corneal medio de 400 μm previamente descrito, se planeó disecar un bolsillo estromal a 250 μm , con el objeto de implantar las lentes a una profundidad de entre el 60 y el 70% del espesor corneal total. No obstante, la mayor curvatura corneal del conejo condicionó la profundidad real a la que se disecaron los bolsillos estromales manuales, tal y como observamos en las muestras histológicas en las que la profundidad del plano de disección fue mayor a lo planeado originariamente. Otra

diferencia notable respecto a la cornea humana es la ausencia de membrana de Bowman (MB) que podría condicionar la respuesta biológica de dicha cornea ante agresiones a la superficie ocular o al estroma anterior. Varios autores han descrito, sin embargo, una buena biocompatibilidad de la cornea de conejos tras implantes intraestromales de hidrogel.^{151,152,158,218,230} Entendemos por todo ello que la elección del conejo como modelo experimental para el estudio de la biocompatibilidad de implantes intraestromales es una buena opción, tal y como lo avala la literatura. Es necesario, sin embargo, un buen conocimiento de las diferencias anatómicas y de las características de su córnea para realizar un adecuado plan quirúrgico y explicar los hallazgos obtenidos.

2.2 ANESTESIA

El protocolo anestésico utilizado en nuestro estudio combinando anestésicos sistémicos (Ketamina y Xilacina) y tópicos (oxibuprocaina y tetracaina) ha sido empleado por el grupo investigador en estudios similares realizados en córneas de conejo.¹⁹⁹ Esta pauta anestésica nos ha permitido realizar los procedimientos quirúrgicos y las exploraciones de MCIV bajo anestesia general mientras que las exploraciones en las que solo se realizó un examen biomicroscópico de la córnea pudieron realizarse bajo anestesia tópica, evitando así las complicaciones técnicas y los riesgos asociados a la anestesia general. Esta posibilidad de realizar exploraciones sin necesidad de sedación o de anestesia general representa una gran ventaja del conejo como modelo animal para experimentación corneal en comparación con otros modelos animales.

2.3 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

2.3.1 ELECCIÓN DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA

Existen diferentes técnicas quirúrgicas descritas en la literatura para la implantación de lentes intraestromales, ya sea realizado *flaps* corneales o disecando un bolsillo estromal. Estos *flaps* corneales automatizados pueden realizarse mediante microqueratomo,^{158,159,160,161,162,163,231} o mediante el uso del laser de femtosegundo (LFS).^{167,168,177} Otros autores como Barraquer,¹²⁸ Beekhuis,¹⁵⁰ Mc Carey,^{152,155} Deg,¹⁴² Salamatrad,²³⁰ Lane,¹⁴⁰ o Choyce,¹³⁸ han utilizado técnicas manuales denominadas "de bolsillo" para implantar lentes intraestromales, tanto en humanos como en otros animales, obteniendo resultados satisfactorios. Este bolsillo estromal puede, a su vez, realizarse de forma manual o automatizada o asistida por LFS, tal y como se propone en publicaciones más recientes.^{166,171,174}

Estudios anteriores con el mismo modelo animal han comparado una técnica automatizada con microqueratomo con una técnica manual para la implantación de LIE. Estos trabajos mostraron mejores resultados con la técnica de bolsillo manual en comparación con las técnicas con *flaps* automatizados en términos de mayor estabilidad de los lentículos, menores pérdidas y descentramientos y una mayor biocompatibilidad.^{199,200} Los autores achacan esta diferencia en los resultados a las dimensiones del lentículo implantado (130 μm de espesor y 6,5 mm de diámetro), que impide una buena coaptación del flap corneal tras el implante así como a la inestabilidad del flap una vez retiradas las suturas.

Debido a la experiencia previa y a las ventajas descritas, decidimos optar por una técnica manual "de bolsillo" para implantar las lentes en el estroma y asegurar las incisiones con un punto de nylon de 10 ceros para mantener la estanqueidad y evitar el crecimiento intraepitelial de la interfase. Éste se mantuvo durante una semana, tras la cual lo retiramos para prevenir el riesgo de neovascularización corneal asociado a las suturas. El uso de nuevas tecnologías como el LFS, no disponible por las características del estudio y su elevado precio, podría haber permitido tallar bolsillos más ajustados al tamaño del implante que nos facilitarían el centrado de las lentes y evitarían un posible desplazamiento de éstas.¹⁷⁴ El empleo más reciente de los parámetros del LFS a 150KHz junto con el uso de un cono de aplanación han reducido el riesgo de aparición de irregularidades en el lecho estromal inducidas por el laser que habían sido observadas anteriormente.^{171,174} La aplicación de estos parámetros ha permitido aumentar la precisión y regularidad de la disección del bolsillo intraestromal, reducir la intensidad de los procesos de reparación tisular y reducir la dispersión de la luz.¹⁶⁵

2.3.2. PROFUNDIDAD DE LA IMPLANTACIÓN

La decisión de implantar las LIE a 250 μm (aproximadamente al 60% del espesor corneal) se basó en la experiencia previa con lentes intraestromales descrita en la literatura que recomienda la implantación de estas lentes de hidrogel entre un 36 y un 60% del espesor corneal.^{141,152,232} Tal y como se ha mencionado anteriormente, existen diferentes factores que condicionan la viabilidad de los ojos tras un implante intraestromal. De los trabajos de Knowles conocemos que la permeabilidad intrínseca del material será el factor determinante en la supervivencia de estos ojos.¹²⁹ Otros factores como el diámetro y grosor de la lente,^{158,232} o la profundidad de implantación, pueden también influir en el resultado.¹⁴⁷

A pesar de no ser el factor determinante, la profundidad de implantación de las lentes intraestromales tiene importantes implicaciones en la supervivencia del implante.¹⁴¹ Se ha

observado que, con lentes no permeables, a mayor profundidad de implantación la difusión lateral de la glucosa y otros solutos es mayor,⁴⁵ la concentración de soluto aumenta¹⁴⁷ y la incidencia de extrusiones disminuye.¹⁵³ Basándonos en los trabajos de Maurice, en teoría, lentes impermeables al agua de menos de 4 mm de diámetro implantadas en el estroma profundo, deberían permitir una función fisiológica normal de la córnea.²¹⁶ A pesar de ello, varios estudios han demostrado que los implantes impermeables no son tolerados por la córnea a largo plazo independientemente de la profundidad a la que se implantan.^{140,142}

La profundidad de implantación también condiciona los resultados tras implantes semipermeables de hidrogel. A diferencia de lo descrito para los implantes impermeables, la concentración de glucosa en el epitelio es mayor al implantar una LIE de hidrogel en el estroma más superficial.⁴⁵ Sin embargo, se ha observado por MCIV que la implantación superficial (110 -180 μm) de lentes Permalens induce adelgazamiento epitelial, disminución del número de queratocitos del estoma anterior y activación de éstos.²³³ Más recientemente, Lindstrom y colaboradores también recomiendan la implantación a una profundidad >200 μm de todas las nuevas LIE para la corrección de presbicia, a excepción del implante Raindrop cuyo mecanismo de acción, moldeando la superficie corneal anterior, requiere de una implantación más superficial.¹⁶⁵

2.4. PAUTA TERAPÉUTICA POSOPERATORIA

Todos los ojos de los grupos 2 a 5 fueron tratados con antibioterapia tópica con tobramicina mediante la instilación de 1 gota cada 8 horas durante la primera semana tras la cirugía. La tobramicina tópica se ha empleado en trabajos previos y ha demostrado ser efectiva para el control de la infección postquirúrgica.^{158,160,162,199,200}

Los grupos 2 y 3 no fueron tratados con corticoides con la finalidad de evaluar los procesos naturales de cicatrización, la supervivencia de los implantes y la incidencia de complicaciones en ausencia de antiinflamatorios. El uso de corticoides se limitó a los grupos 4 y 5. Los ojos del grupo 4 fueron tratados con una combinación fija de tobramicina más fosfato de dexametasona tópica (Tobradex[®]) mediante la instilación de 1 gota cada 8 horas durante la primera semana tras la cirugía, mientras que en el grupo 5 se implantó una LIE con dexametasona encapsulada en microesferas de PLGA. Estudios recientes con LIE para corrección de la presbicia han mostrado que las pautas de corticoterapia posoperatoria han de ser más intensas que las empleadas en el posoperatorio del LASIK para minimizar así la cicatrización de la interfase.¹⁶⁵ La finalidad de incorporar estos grupos 4 y 5, tratados con dexametasona, fue la de evaluar el papel de los corticoides en el

control de la respuesta inflamatoria y la expresión de metaloproteasa de matriz-1 (MMP-1) tras el implante intraestromal de lentes de PEGDA.

2.5. SEGUIMIENTO Y SACRIFICIOS

La secuenciación de los sacrificios se realizó para evaluar los cambios inducidos bien por la técnica quirúrgica como por el implante de PEGDA en la córnea en los diferentes momentos postquirúrgicos a lo largo del seguimiento y permitiéndonos analizar tanto los cambios histológicos como la expresión de proteínas de matriz extracelular (MEC) (colágeno-1, queratocán y MMP-1) mediante RT-qPCR. La principal limitación de la secuenciación de los sacrificios fue la imposibilidad de realizar un análisis estadístico de los datos de cada uno de los tiempos posoperatorios debido al reducido tamaño muestral. Por ello la mayor parte de los sacrificios se planificaron al final del seguimiento en cada grupo para disponer de un número de casos suficiente que permitiera el análisis estadístico de los resultados a los dos meses de la cirugía.

3. DISCUSIÓN DE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN

3.1. EVALUACIÓN CLÍNICA-BIOMICROSCÓPICA

La evaluación clínica de los animales se ha basado en el estudio biomicroscópico de los implantes de PEGDA y en el estudio de la respuesta biológica de las córneas a éstos. Para ello, se evaluaron las características de la córnea, la aparición de signos de inflamación corneal y conjuntival así como la estabilidad y transparencia de los implantes.

3.2. PAQUIMETRÍA

La medición del grosor corneal se empleó como marcador indirecto de inflamación corneal así como para valorar los cambios inducidos por el implante intraestromal de PEGDA. La evolución de los cambios paquimétricos a lo largo del seguimiento nos proporcionó medidas indirectas de la estabilidad y del grosor de los implantes de PEGDA.

Entre las diferentes tecnologías disponibles para la medición paquimétrica, se optó por la paquimetría ultrasónica (PU) y la paquimetría por MCIV. La medida del grosor corneal por PU es el *gold standad* y la tecnología más empleada para el estudio paquimétrico en estudios de estas características.²³⁴ La PU permite obtener medidas fiables y reproducibles del grosor corneal, aunque su medida es técnico dependiente y la alineación correcta es crítica para la exactitud de los resultados ya que el espesor corneal puede variar entre el ápex y otras áreas de la córnea adyacente.⁹² Igualmente, se ha descrito una variabilidad en los valores paquimétricos asociada al modelo de PU empleado.²³⁵

El paquímetro ultrasónico empleado en este estudio fue el DHG *Pachmate Hand Held Pachymeter* (DHG Technology, Inc, Exton, Pa) que realiza 25 mediciones paquimétricas por cada toma y proporciona la media y su desviación estándar. Este modelo de PU ya ha sido empleado anteriormente para la evaluación de pacientes con implantes intraestromales.¹⁶² La obtención de 25 medidas nos permitió detectar aquellos casos con medidas dispares en los que la desviación estándar de la media fue elevada. En estos casos se volvió a realizar una nueva medición para reducir el error aleatorio asociado a un procedimiento inadecuado en el cálculo del grosor corneal.

La MCIV-CS4 se ha empleado para el estudio del grosor corneal con niveles de reproductibilidad bajos hasta la incorporación del "*z-ring*",⁸⁰ que ha permitido mejorar la exactitud de las medidas paquimétricas obtenidas por CS4 y obtener medidas de grosor corneal equiparables a las observadas mediante otros modelos de MCIV como el TSCM.⁷⁶ La medida del grosor corneal por MCIV se empleó para su comparación con los datos de

paquimetría obtenidos por PU ya que se ha descrito que los paquímetros ultrasónicos comercialmente disponibles tienden a sobreestimar el valor paquimétrico real.^{76,92}

3.3. MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

La MCIV se empleó para el estudio y cuantificación de los cambios a nivel celular de las córneas *in vivo* a lo largo del seguimiento del ensayo. Para ello, se realizaron medidas a la semana, al mes y a los dos meses de la cirugía y se analizaron los cambios en el tiempo de los diferentes grupos.

3.3.1. EL MODELO DE MICROSCOPIO CONFOCAL

El modelo de MCIV empleado en este estudio fue el ConfoScan 4 (CS4). La elección del CS4 como modelo de MCIV para este estudio se basó en la experiencia previa de otros autores en su empleo para el estudio de la córnea,^{76,83,84,88,104,203} así como para evaluar implantes intraestromales corneales^{163,174} y a la disponibilidad de esta tecnología en el momento de estudio. Otros modelos de MCIV también han demostrado ser válidos para la evaluación de implantes intraestromales en humanos y en conejos.^{158,162,230,231,236}

3.3.2. METODOLOGÍA DE TRABAJO EMPLEADA

3.3.2.1. Mediciones por MCIV

Tal y como se describe en el apartado 7.6.3. de material y métodos, se realizaron dos mediciones por ojo en cada una de las revisiones, para su evaluación. El número de imágenes por caso necesarias para realizar un análisis cuantitativo fiable de los resultados no está claro. Sí parece, por el contrario, aceptado que los datos proporcionados por el análisis de una sola imagen de MCIV resultan insuficientes para obtener valores fiables de las variables cuantitativas a analizar.⁹⁹

3.3.2.2. Valoración de las imágenes para el análisis cualitativo y cuantitativo

La evaluación de las imágenes la realizó un único observador, para evitar los errores en las medidas derivados del análisis de las imágenes de MCIV por dos o más observadores.²³⁷

3.3.2.2.1. Estudio de las células endoteliales

La estrategia empleada en el análisis de las células endoteliales consistió en el conteo automatizado por parte del *software* y posterior análisis semiautomático de las imágenes ofrecidas por el *software* NAVIS del confocomander. Se optó por este modo de análisis por la repetibilidad y reproducibilidad demostrada por los sistemas automatizados de conteo de células endoteliales por MCIV.⁹⁷ Por otro lado, y a diferencia del método de análisis

manual, nos permite realizar un análisis morfométrico de las células y obtener información acerca del porcentaje de hexagonalidad, coeficiente de variación y medida del área celular media y poder así determinar la presencia de pleomorfismo y polimegetismo. A su vez, el modo semiautomático proporciona ventajas con respecto al modo automatizado ya que permite modificar los bordes celulares que el software del CS4 interpreta de forma errónea y evitar así sobreestimar la densidad celular.^{98,101}

3.3.2.2.2. Estudio de los queratocitos

El conteo celular de queratocitos puede realizarse mediante métodos manuales o automatizados. La estrategia empleada para el estudio de la densidad de queratocitos en el estroma fue una estrategia manual descrita con anterioridad en la literatura.^{84,238,239} El conteo manual requiere realizar un marcado de las áreas hiperreflectivas correspondientes a los núcleos de los queratocitos dentro de un área predefinida. Los inconvenientes de este tipo de conteo serían: 1) su duración y 2) la variabilidad intra e inter observador.²⁴⁰ Esta variabilidad viene determinada por la subjetividad a la hora de marcar como queratocitos los objetos hiperreflectivos que supuestamente corresponden a los núcleos de los queratocitos en una imagen de MC de bajo contraste. A pesar de que, en general, la reproducibilidad y la repetibilidad de la densidad de queratocitos medida de forma manual es buena, hay quien ha descrito coeficientes de variación intra e inter-examinador de hasta 5,2% y 2,9%, respectivamente.²³⁹ Debido a esta variabilidad de las estrategias manuales, otros autores han sugerido que el empleo de estrategias automatizadas para el estudio de la densidad de los queratocitos ofrece resultados más reproducibles.^{95,96,237}

La densidad de queratocitos se expresó en densidad por unidad de área (células/mm²) tal y como se describe por diferentes autores.^{83,84,87,100} Otros, por el contrario, recomiendan la expresión de la densidad de queratocitos en densidad por unidad de volumen (células/mm³) debido a la disposición tridimensional de los queratocitos en el estroma corneal que, a diferencia de las células endoteliales, no forman una monocapa plana.^{72,84,95,99,236} La medición volumétrica de la densidad de queratocitos requiere conocer la profundidad de campo de cada aparato de MC.⁹⁴

3.3.2.2.3. Análisis de la interfase

Con el objeto de evaluar la correlación entre: 1) las características morfológicas y la intensidad de la reflectividad de la interfase y 2) los hallazgos clínicos e histológicos, se realizó un análisis de las imágenes obtenidas por MCIV en cada revisión. Para ello, se seleccionaron las imágenes correspondientes a la interfase caracterizadas por la presencia de un pico hiperreflectivo en el gráfico *Z-scan*. Posteriormente se realizó un análisis

cualitativo de las características morfológicas de estas imágenes de la interfase que se clasificaron en cuatro grupos en función del grado de preservación del estroma corneal a ese nivel. Al mismo tiempo, se realizó un análisis cuantitativo de la intensidad de la reflectividad de la interfase (en LRU) al tiempo que analizamos la reflectividad de las diferentes estructuras corneales mediante la localización del eje-Z de cada imagen en el gráfico *Z-scan* que nos proporciona el CS4.²⁰³

3.4. HISTOLOGÍA

El principal objetivo del análisis histológico en este trabajo ha sido analizar los cambios hallados en el estroma corneal inducidos por la técnica quirúrgica de disección estromal manual y por el implante intraestromal de PEGDA. Para ello, se realizaron cortes histológicos que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE). La HE se empleó con el objeto de analizar los cambios inducidos en la celularidad y en la estructura de la córnea. El análisis histológico nos permitió establecer una correlación entre los hallazgos observados por biomicroscopía, paquimetría y por MCIV con lo observado en los cortes histológicos.

El estudio diseñado planteó sacrificios secuenciales de los conejos de cada uno de los grupos para poder, así, analizar los cambios histológicos en los diferentes momentos posoperatorios, tal y como se describe en el apartado 2.5. La mayor parte de los casos se sacrificaron a la finalización de cada una de las fases del estudio, para evaluar histológicamente, en cada uno de los grupos, el mayor número de ojos a la conclusión de cada fase y poder realizar un análisis estadístico de los datos. Debido al tamaño reducido de cada grupo, las muestras de los casos sacrificados antes de los 2 meses fueron pocas y se realizaron con una finalidad descriptiva, para evaluar los cambios histológicos en cada tiempo posoperatorio, ya que su número resultó insuficiente para el análisis estadístico.

3.5. RT-qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) es el método de elección para cuantificar RNA expresado a bajos niveles. Es un método sensible y específico que se basa en la monitorización de la acumulación del material de amplificación objetivo durante los diferentes ciclos de la PCR.²⁴¹

La cuantificación de expresión genética se realizó mediante un método de cuantificación relativa: $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ fold change. Su ventaja radicaría en que no requiere estándares con concentraciones determinadas y en que nos muestra la magnitud de los cambios en los niveles de expresión del RNAm del gen a estudio para compararlos con otro gen de referencia que se expresó en unidades arbitrarias de expresión.²⁴²

Los genes de las proteínas estudiados fueron los del colágeno 1A, el queratocán y la metaloproteasa de matriz-1 (MMP-1). El queratocán es una proteína central (*core protein*) del queratán sulfato y un marcador específico de queratocitos altamente expresado en el estroma corneal normal.²⁴³ Se ha observado que su expresión se asocia a la producción de MEC y está implicado en la transparencia corneal.²⁴⁴ El análisis de su expresión se empleó para evaluar su utilidad como indicador de transparencia corneal. El colágeno 1A es el principal colágeno del estroma corneal y se analizó para evaluar la funcionalidad de los queratocitos tras la cirugía y el implante de LIE.¹⁸ La MMP-1 se introdujo como marcador de colagenolisis para valorar la intensidad de la inhibición de su expresión con dexametasona tanto por vía tópica como mediante microesferas de PLGA-dexametasona encapsuladas en el hidrogel de PEGDA.

4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

4.1. SEGUIMIENTO Y EVOLUCIÓN DEL PESO DE LOS CONEJOS

Los conejos de todos los grupos presentaron pesos comparables en el preoperatorio y, en todos los casos, hubo una progresión similar con valores medios del incremento de peso comparables, sin que observáramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,35$). Todos los conejos, individualmente, incrementaron su peso a lo largo de los meses (ver anexo pesos) y no se objetivaron fallecimientos ni procesos intercurrentes que condicionaran el estado general de los conejos a lo largo del seguimiento. De estos datos podemos concluir que las diferencias en las variables clínicas observadas entre los diferentes grupos (que se discutirán más adelante) no pueden ser atribuidas a las diferencias en la evolución del peso ni al desarrollo de los conejos durante el seguimiento.

4.2 ESTUDIO BIOMICROSCÓPICO/CLÍNICO:

4.2.1. VARIABLES QUIRÚRGICAS:

Las variables quirúrgicas analizadas fueron: 1) el tiempo de duración de la cirugía, 2) la longitud de la incisión corneal y 3) el diámetro del bolsillo estromal disecado.

La duración media de los procedimientos osciló entre 6,33 minutos de media en el grupo 5 y 7,57 minutos de media en el grupo 3. No hubo diferencias significativas ($p=0,73$) en la duración media de los procedimientos entre los diferentes grupos, con o sin implante intraestromal, de manera que las diferencias observadas en las variables clínicas entre los diferentes grupos no pudieron ser atribuidas a la duración de los procedimientos.

La longitud media de las incisiones corneales osciló entre 3,48 mm de media en el grupo 2 y 4,5 mm de media en el grupo 5. Se optó por realizar incisiones de longitud suficiente para evitar la fractura por un excesivo plegamiento de las lentes durante la implantación. La longitud media de las incisiones mostró diferencias significativas ($p=0,019$) entre los grupos, aunque el análisis por subgrupos solo mostró diferencias significativas entre los grupos 2 y 5. La diferencia hallada entre los grupos 2 y 5, aunque estadísticamente significativa, no tuvo relevancia clínica y podría atribuirse al pequeño tamaño muestral del grupo 5 y a la no necesidad de implantar una LIE en los casos del grupo 2, que pudo condicionar el menor tamaño de las incisiones en este grupo. Al finalizar los procedimientos se suturaron las incisiones para evitar el crecimiento intraepitelial de la interfase descrito por otros autores tras implantes intraestromales de diferentes materiales mediante

métodos de bolsillo estromal manual.^{138,140,142,150,152,155,230} El análisis del crecimiento intraepitelial fue histológico y se discutirá más adelante en el apartado 4.5.3.2.

El diámetro medio de los bolsillos estromales osciló entre 8,14 mm de media en el grupo 3 y 9,11 mm de media en el grupo 4. Este diámetro medio mostró diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los grupos, aunque el análisis por subgrupos solo mostró diferencias significativas entre el grupo 3 y los grupos 2 y 4. El tamaño del bolsillo estromal estuvo condicionado por la necesidad de implantar y centrar una lente de 4 mm de diámetro en el estroma corneal y los diámetros medios en todos los grupos excedieron en más de 4 mm el del implante, por lo que las diferencias en el tamaño del bolsillo halladas entre grupos carecen de significación clínica. La discrepancia entre el diámetro del bolsillo y las dimensiones del implante pudo condicionar el centrado quirúrgico o el riesgo de desplazamiento de las LIE durante el seguimiento y se analizará más adelante en los apartados 4.2.3.4 (Centrado de las lentes) y 4.2.3.5 (Desplazamiento de las lentes).

4.2.2. VARIABLES CLÍNICAS

La buena tolerancia a largo plazo de los implantes intraestromales de hidrogel ha sido ampliamente descrita en la literatura.^{152,158,160,202,215,232,245} Existen, sin embargo, variaciones en la respuesta biológica ante un mismo material implantado²⁴⁶ y se han descrito casos de complicaciones asociadas a estos implantes de hidrogel.^{153,247,248}

Las variables clínico-biomicroscópicas analizadas para evaluar la biocompatibilidad de los implantes de PEGDA fueron las siguientes: hiperemia conjuntival, secreción, edema corneal, infiltración, neovascularización corneal, opacidad de la interfase, presencia ulceración o defectos epiteliales, lisis estromal, perforación corneal y extrusión de los implantes.

4.2.2.1. Hiperemia y secreción conjuntival

La hiperemia conjuntival y la secreción son marcadores inespecíficos de inflamación ocular frecuentes tras cualquier proceso quirúrgico en oftalmología. La prevalencia de hiperemia conjuntival y de secreción fue disminuyendo a lo largo del posoperatorio sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos intervenidos a lo largo del seguimiento. ($p=0,068$; $p=0,077$; $p=0,22$; $p=0,36$ y $p=0,69$ para la hiperemia y $p=0,078$; $p=0,12$; $p=0,68$; $p=1$ y $p=1$ para la secreción a los días 1, 7, 15, 30 y 60).

Al analizar la prevalencia de hiperemia entre casos no tratados con corticoides y aquellos a los que se les administró dexametasona bien por vía tópica o en microesferas de PLGA-

dexametasona, observamos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a las 24 horas y a la semana de la cirugía ($p=0,026$ y $p=0,006$ respectivamente). Estas diferencias entre ambos grupos no resultaron estadísticamente significativas a los 15, 30 y 60 días ($p=0,12$, $p=0,58$ y $p=0,8$). De estos resultados podemos concluir que los ojos de los grupos tratados con corticoides consiguen controlar la inflamación de forma más precoz (0% de incidencia de hiperemia conjuntival a la semana de la cirugía en los grupos 4 y 5) que aquellos de los grupos a los que no se les administró una pauta de corticoides.

Al analizar la diferencia en la prevalencia de hiperemia conjuntival entre los grupos con y sin implante intraestromal (grupo 2 frente a grupos 3, 4 y 5), no observamos diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,42$; $p=0,17$; $p=0,48$; $p=0,39$ y $p=0,61$ a los 1, 7, 15, 30 y 60 días respectivamente), por lo que no podemos atribuir a las lentes intraestromales una mayor incidencia de hiperemia.

4.2.2.2. Edema corneal

La aparición de edema corneal leve los primeros días tras un implante intraestromal que desaparece dejando un leve *haze* es frecuente. Salamatrand lo describe en todos los ojos de conejo de su serie y en la mayoría de los casos este edema desaparece para el día 5-10 tras la cirugía, no objetivándose ningún caso de edema corneal o hiperemia conjuntival al mes de la implantación.²³⁰ La incidencia global de edema en todos los grupos de nuestro estudio presentó un pico entre las 24 horas y los 7 días y fue paulatinamente disminuyendo a lo largo del tiempo en las sucesivas revisiones, en concordancia con lo descrito por Salamatrand. La incidencia global de edema estromal en todos los grupos fue del 31,1% a las 24 horas, del 31,9% a la semana y del 15,9% a las dos semanas, desapareciendo en todos los casos al mes de la cirugía salvo en un único caso del grupo 3. La comparación del porcentaje de casos de edema entre los diferentes grupos mostró valores de $p=0,01$; $p=0,04$; $p=0,09$; $p=0,9$ y $p=1$ a los días 1, 7, 15, 30 y 60 respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas y a la semana que pueden ser atribuidas a los picos de incidencia de edema corneal a las 24 horas en el grupo 2 y a la semana en el grupo 3.

Al comparar la incidencia de edema entre los casos con y sin LIE (grupo 2 frente a grupos 3, 4 y 5) observamos que hubo diferencias significativas ($p=0,002$) a las 24 horas de la cirugía mientras que las diferencias a partir de la semana no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,26$; $p=0,27$; $p=0,39$ y $p=1$). Dentro del grupo sin tratamiento corticoideo al comparar el edema corneal entre los grupos con y sin LIE (grupos 2 y 3), observamos que el patrón de aparición del edema varió entre ambos grupos. En el grupo 2

el pico de aparición de edema fue a las 24 horas (57,1%) y decreció al 40%, 11%, 0% y 0% en las revisiones a los días 7, 15, 30 y 60. Por el contrario en el grupo 3, el pico de incidencia de edema fue más tardío a los 7 días (42,9%) y tardó más tiempo en resolverse siendo del 31,6%, 6% y 0% a los días 15, 30 y 60. Parks sugiere que este edema corneal podría ser secundario al trauma quirúrgico en el momento de la implantación y no al implante en sí mismo.²⁴⁶ Sin embargo, la diferencia en el patrón de los tiempos de aparición y resolución del edema corneal entre los diferentes grupos, con y sin LIE, nos sugiere que la presencia de una LIE pudiera estar relacionada con cambios en el patrón temporal de aparición y resolución del edema corneal postquirúrgico.

La comparación de la incidencia acumulada de casos de edema corneal entre grupos tratados con y sin corticoides (grupos 4 y 5 frente a grupos 2 y 3) mostró diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas ($p=0,012$) y a la semana de la cirugía ($p=0,013$), mientras que las diferencias no resultaron estadísticamente significativas a los días 15, 30 y 60 respectivamente ($p=0,28$; $p=0,41$ y $p=1$). Estos resultados estarían en sintonía con lo descrito al analizar la incidencia de hiperemia conjuntival, ya que observamos que el edema corneal en los grupos tratados con corticoides desaparece de forma más precoz que en los grupos a los que no se les administró corticoides.

En la mayor parte de los casos el edema estromal observado fue leve (grado 1) salvo en 5 casos (216, 310, 311, 314 y 321) (8,6% del total de casos intervenidos y 10,8% del total de casos con LIE), de los cuales dos (casos 216 y 310) fueron los que presentaron un mayor edema y se comentaron en el apartado 4.2.2.4 (infiltración estromal). La aparición de casos más severos de edema corneal tras implantes intraestromales de hidrogel ha sido descrita previamente y su incidencia varía en la literatura. Beekhuis describe 5 casos (15,6%) de edema corneal severo tras implantes de etafilcon y lidofilcon en ojos de mono²⁴⁷ e Ismail reporta una incidencia del 5% tras implantes de lentes Permavision en corneas de conejo.¹⁵⁸ La incidencia de edema corneal moderado-severo en nuestra serie coincide con lo descrito en la literatura.

4.2.2.3. Neovascularización corneal

La incidencia global de neovascularización corneal (NVC) entre todos los grupos a estudio fue del 6,3% (5 casos), uno perteneciente al grupo 2 y cuatro casos pertenecientes al grupo 3.

Al analizar la relación entre el implante y la aparición de NVC, observamos que 4 de los 5 casos (80%) con NVC ocurrieron en ojos en los que se implantó una LIE y que la incidencia

de NVC entre los ojos con implante de una LIE fue del 10,8% (4 casos de 37). La incidencia de neovascularización tras LIE descrita en la literatura es variable. Con implantes impermeables de polisulfona la incidencia de neovascularización osciló entre un 69,2% en la serie de Deg,¹⁴² 33% de McCarey,¹⁴³ 9,75% de Climenhaga,¹⁴¹ y un 5,5% en la de Lane.¹⁴⁰ La aparición de casos de NVC en las diferentes series con implantes intraestromales no permeables fue una constante y la incidencia reportada creció en función del tiempo de seguimiento de los casos de cada una de las series. La incidencia con implantes de hidrogel se redujo considerablemente en comparación con lo descrito anteriormente con implantes impermeables. De hecho, son varias las series que específicamente describen una ausencia de casos de NVC tras implantes de hidrogel en animales y en humanos.^{158,160,162,230,231,245} A pesar de esto, sí se han descrito casos de neovascularización tras implantes de hidrogel en algunas series: Parks reporta una incidencia del 18,2% (4 casos de 22) con implantes de lidofilcon A en monos,²⁴⁶ McDonald reporta 3 casos (4,1%) de NVC tras implantes de lidofilcon A y B en monos²⁴⁸ y Beekhuis, 5 casos de NVC (15,6%) en monos tras implantes de etafilcon y lidofilcon.²⁴⁷ La aparición de casos de NVC en estas y otras series con implantes permeables al agua y a la glucosa sugiere que existen otros factores diferentes a la permeabilidad del implante que pudieran ser causantes de NVC. Aspectos como la técnica quirúrgica, el insuficiente lavado del lecho estromal o el modelo animal empleado se han sugerido como posibles causas.²⁴⁷ Uno de los casos de NVC de nuestra serie pertenecía al grupo 2 mientras que los 4 casos restantes pertenecían al grupo 3, tal y como se ha descrito anteriormente, a pesar de lo cual no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas en la aparición de NVC entre los diferentes grupos a estudio. A partir de los resultados obtenidos no podemos afirmar que los implantes de PEGDA se asocien de forma significativa al desarrollo de NVC.

Al analizar la relación entre la NVC y el tratamiento corticoideo observamos que todos los casos con NVC pertenecieron a los grupos 2 y 3. Ningún caso de los grupos 4 y 5 tratados con corticoides tópicos o con microesferas de PLGA-dexametasona en el implante desarrolló NVC. Las diferencias, sin embargo, no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,556$, $p=1$, $p=1$, $p=1$, y $p=1$ a los 1, 7, 15, 30 y 60 días, respectivamente).

Las prostaglandinas han demostrado ser causantes de inflamación ocular así como de aumentar la permeabilidad vascular y la vasodilatación y su papel en el desarrollo de NVC fue subrayado por BenEzra.²⁴⁹ Estudios posteriores en modelos experimentales de NVC en ojos de conejo han sugerido que la síntesis a nivel local de prostaglandinas pudiera ser responsable de la infiltración leucocitaria y la NVC.²⁵⁰ Los corticoides son agentes antiinflamatorios capaces de bloquear la síntesis de prostaglandinas a partir de la inhibición

de la fosfolipasa A2 y han demostrado ser capaces de suprimir la infiltración leucocitaria e inhibir la angiogénesis corneal en modelos de NVC experimental.^{250,251} A pesar de que las diferencias no han resultado ser estadísticamente significativas en nuestro estudio, probablemente debido a la baja incidencia de NVC en todos los grupos (incluidos aquellos no tratados con corticoides) y al tamaño muestral reducido, la ausencia de casos de NVC en ojos tratados con corticoides resulta clínicamente relevante. Estos resultados sugieren que tanto la dexametasona tópica como la encapsulada en microesferas de PLGA empleada en los grupos 4 y 5, podría ser eficaz en la inhibición de la angiogénesis corneal, aunque sería preciso un estudio con mayor tamaño muestral para confirmar esta hipótesis.

4.2.2.4. Infiltración corneal

La infiltración se apreció como un área grisácea con opacidad estromal y se observó en casos que presentaron edema corneal moderado-severo, hiperemia, secreción conjuntival y NVC y fueron catalogados como casos con inflamación significativa. Los casos con infiltración estromal fueron dos: caso 216 y 310 pertenecientes a los grupos 2 y 3, respectivamente. La aparición del edema corneal fue a las 24 horas en el caso 216 y a la semana en el caso 310, evolucionando hacia la infiltración estromal y NVC en el plazo de una semana. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Beekhuis en su serie de casos en la que el edema estromal moderado-severo tras el implante de una LIE aparece entre los días 3 a 12 y evoluciona hacia la NVC y opacidad estromal.²⁴⁷ Sin embargo, conocemos que la intensidad de la respuesta inflamatoria corneal al trauma quirúrgico en los diferentes modelos animales es variable, y mientras la del mono parece ser ligeramente mayor a la del humano, la del conejo muestra una inflamación del segmento anterior ante un trauma ocular considerablemente mayor debido a la gran labilidad de la barrera hemato-acuosa.²²⁹ Debido a esto, los resultados obtenidos con implantes estromales en diferentes modelos animales pueden no ser directamente comparables.

El diagnóstico diferencial de los casos de infiltración corneal de estas características incluye la queratitis infecciosa. Ninguno de los casos desarrolló un defecto epitelial ni ulceración estromal que pudiera suponer una vía de entrada para gérmenes causantes de una queratitis infecciosa y los cultivos realizados para descartar la presencia de infección corneal resultaron negativos tanto para bacterias como para hongos. A su vez, el análisis histológico realizado tras el sacrificio no mostró signos de una infiltración por leucocitos polimorfonucleares (LPMN) sugestiva de infección bacteriana (ver apartado 4.5.4. Anatomía patológica. Casos de inflamación significativa). Por ello entendemos que ambos casos se deben a procesos inflamatorios secundarios a la técnica quirúrgica o al implante de PEGDA.

4.2.2.5. **Úlcera corneal, lisis estromal y perforación**

No hubo ningún caso de úlcera corneal ni defecto epitelial secundario a la técnica quirúrgica ni al implante de LIE. La ausencia de defectos epiteliales y de ulceración estromal por delante del implante nos indica que la difusión de glucosa, bien lateralmente o bien a través del implante, fue suficiente para mantener la integridad de estas estructuras.⁴⁵

4.2.2.6. **Haze/opacidad de la interfase**

La presencia biomicroscópica de una opacidad significativa en la interfase en los ojos de los grupos 2 a 5 se limitó a los dos casos con infiltración estromal anteriormente descritos sin que observáramos presencia de opacidad o *haze* leve en la interfase del resto de los casos a lo largo del seguimiento. Salamatrand describe una *haze* leve generalizado tras implantes de hidrogel en conejos y sugiere que su aparición tras el implante de una LIE se relaciona con los procesos de cicatrización estromal en el área de disección estromal.²³⁰ Estos hallazgos biomicroscópicos contrastan con lo observado por MCIV y en las muestras histológicas que se analizaran con detalle en el apartado correspondiente (ver apartado 4.4.3.3. Microscopía confocal. Características de la interfase y apartado 4.5.3.2. Anatomía patológica. Estroma).

4.2.3. ESTADO DE LOS IMPLANTES INTRAESTROMALES

4.2.3.1. **Transparencia**

La transparencia de los implantes de PEGDA *ex-vivo* está condicionada por las propiedades ópticas del implante discutidas en el apartado 1.1.3.1, que en ningún caso se vieron modificadas durante el seguimiento de los ojos con LIE a estudio (grupos 3 a 5). Ninguna de las lentes se opacizó ni modificó sus características físicas, demostrando una buena biodisponibilidad para su uso como implante intraestromal en concordancia con lo descrito en la literatura con implantes de hidrogel de diferentes materiales.

4.2.3.2. **Deterioro e irregularidad de los implantes**

Los implantes fueron circulares y sus bordes regulares en todos los casos a excepción de siete casos (cuatro del grupo 3, dos del grupo 4 y un caso del grupo 5) en los que se pudo apreciar alguna irregularidad en el borde del implante.

Al analizar la relación de la irregularidad del borde de los implantes con otras variables clínicas, observamos que de los 4 casos de neovascularización corneal en ojos con LIE, el 50% presentaban irregularidades en el borde de la LIE. Teniendo en cuenta que fueron 7

casos de un total de 37 los que presentaron algún grado de irregularidad, los casos de neovascularización en este grupo supusieron el 28% de total mientras que entre los ojos con implantes regulares, la neovascularización ocurrió en el 6,7%. Esta diferencia entre grupos no resultó estadísticamente significativa ($p=0,15$).

A pesar de no haber hallado diferencias estadísticamente significativas entre la irregularidad de los implantes y la aparición de signos clínicos de inflamación, es conocida la relación entre el diseño de los implantes y el desarrollo de complicaciones.^{231,247} Además del material empleado para su fabricación, el diseño de los implantes, tanto en forma como en tamaño, así como la ausencia de irregularidades del implante son necesarios para asegurar la biocompatibilidad de un implante intraestromal.

4.2.3.3. Depósitos

No hemos hallado ningún caso de pequeños depósitos sobre el hidrogel en la interfase estroma-lente que muestran, con frecuencia variable, algunas otras series tras implantes intraestromales de hidrogel: 88,2%,¹⁶² 29%²⁴⁸ o 37%.²¹⁵ El origen de estos depósitos tras el implante de una LIE es incierto y no es exclusivo de los casos con implante de LIE ya que se han observado en casos control intervenidos y sin implante intraestromal, lo que sugiere que puedan ser debidos al proceso quirúrgico y no al implante en sí mismo.²⁴⁸

4.2.3.4. Centrado de los implantes

El porcentaje de casos de descentramiento de la LIE (medido en el posoperatorio inmediato) osciló entre un 33,3% en el grupo 5 y un 47,6% en el grupo 3, sin que hubiera diferencias significativas entre los grupos 3, 4 y 5 ($p=0,78$). El tamaño medio de los bolsillos corneales en nuestra serie fue de 8,69 mm y el diámetro de las lentes a implantar de 4 mm. Esta discrepancia entre el diámetro de las lentes y del bolsillo ha podido condicionar el adecuado centrado de las mismas. Sin embargo, no hemos hallado una asociación entre el diámetro del bolsillo y la presencia de descentramientos ($p=0,384$).

La experiencia con los nuevos diseños de LIE para corrección de la presbicia nos ha mostrado la importancia del centrado de los implantes con finalidad refractiva en los que descentramientos de 0,5 mm del eje visual pueden reducir significativamente la calidad de las imágenes.¹⁶⁸ Localizar el eje visual puede resultar difícil en la práctica. Éste suele situarse inferonasal al centro de la pupila y se puede identificar marcando el primer reflejo de Purkinje o el reflejo corneal con luz coaxial.²⁵² El uso de LFS podría facilitar el centrado de las LIE ya que permite disecar bolsillos estromales más ajustados al tamaño del

implante.¹⁶⁶ Este centrado, a su vez, estará condicionado por la precisión al localizar el eje visual sobre el que centraremos el tallado del bolsillo estromal.

Por otro lado, al analizar la repercusión del centrado de las LIE y su relación con otras variables clínicas, observamos que el 50% de los casos de NVC corneal en los ojos con LIE, se correspondía con casos en los que la LIE presentaba algún grado de desplazamiento. A pesar de que estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos ($p=0,63$) y que no podemos descartar que el azar explique estos resultados, entendemos que pueden tener relevancia clínica y que tal vez puedan estar condicionados por el tamaño muestral.

4.2.3.5. Desplazamiento de los implantes (migración)

Se observaron tres casos de desplazamiento de la LIE durante el seguimiento, dos de ellos pertenecientes al grupo 3 y uno al grupo 4. En todos los casos se trató de ojos en los que inicialmente observamos un desplazamiento de la LIE de grado 2 a las 24 horas de la cirugía y que en la exploración a la semana pasó a ser de grado 1. Estos casos de desplazamiento de los implantes en nuestra serie deberían interpretarse con cautela debido a la discrepancia entre lo registrado en las hoja de seguimiento y lo observado en las fotografías. Esta discrepancia, a su vez, podría deberse al tamaño variable de las pupilas en cada una de las exploraciones y a la posición del ojo al realizar la fotografía.

Otros autores con diferentes modelos de LIE que fueron implantados tras realización de un *flap* corneal con microqueratomo muestran una estabilidad de los lenticúlos variable. Beekhuis describió una incidencia de desplazamientos del 27% (3 de 11 casos) tras implantar lentes de hidrogel en monos y que atribuyó al frotamiento excesivo de los ojos.²⁴⁷ Ismail y colaboradores en un grupo de 20 ojos de conejo a los que se les implantó una LIE de hidrogel tipo PermaVision® tras realizar un *flap* mecánico con microqueratomo, describen un único caso (5%) de desplazamiento leve de uno de los lenticúlos al mes de la cirugía que los autores también atribuyeron a la manipulación de la herida por parte del conejo.¹⁵⁸ En humanos, y con el mismo modelo de implante PermaVision, Michieletto describe un 10% de desplazamientos (1/10 casos),¹⁵⁹ Ismail describe 2 casos de desplazamiento en 23 pacientes (8,6%)¹⁶⁰ y Mullet una incidencia de descentramiento mayor de 1mm en 10 de 34 ojos (29,3%) de los que 7 requirieron un reposicionamiento (no se detalla si estaban descentrados o se desplazaron durante el seguimiento).¹⁶²

Con los implantes AcuFocus (Kamra) de 1ª generación, Seyeddain publica dos casos de descentramiento que requirieron de un recentramiento quirúrgico,¹⁶⁷ Tomita reporta una incidencia de recentramiento de los implantes del 1,1% (2 casos de 360)¹⁶⁸ y Yilmaz una

incidencia del 0%.²⁵³ Estas LIE de primera generación de 10 µm de grosor se implantaron tras realizar *flaps* corneales de 170 y 200 µm respectivamente. El papel del LFS para disecar bolsillos estromales para el implante de LIE se ha estudiado recientemente. Este procedimiento quirúrgico permite disecar bolsillos estromales ajustados al tamaño del implante, minimizando así el riesgo de desplazamiento posoperatorio tal y como describe Dexl, con un 0% de desplazamiento tras implantes Kamra de tercera generación de 5 µm de espesor en un bolsillo corneal realizado con LFS a 230 µm de profundidad.¹⁶⁶

El desplazamiento de un implante intraestromal puede deberse tanto a la técnica quirúrgica, al tamaño del bolsillo estromal como al diseño de implante. En estudios anteriores se ha observado que tanto la disección manual de un bolsillo estromal como la creación de un *flap* resultaron válidas para el implante de LIE de estas características. A pesar de ello, en nuestra muestra, el tamaño de bolsillo disecado manualmente, superior al diámetro del implante, podría condicionar el adecuado centrado de éstos así como el riesgo de descentramiento posoperatorio. A pesar de esta discordancia, la incidencia global de desplazamiento de las lentes en este estudio fue del 8,1% (3 de 37 casos), similar a la descrita en la literatura con LIE de hidrogel, aunque menor a la descrita con los nuevos implantes para la presbicia. No hemos hallado una relación directa entre el tamaño de este bolsillo y la existencia de desplazamientos del implante durante el seguimiento ($p=0,384$).

4.2.3.6. Migración anterior y extrusión de los implantes

Desde los primeros intentos de Barraquer en 1949 con lentes impermeables de *plexiglass*,¹²⁷ que dieron lugar a la aparición de necrosis del estroma anterior a los implantes y a la extrusión de éstos, se sabe que la permeabilidad de los implantes al agua y a los solutos (especialmente a la glucosa), condiciona la biocompatibilidad de las LIE y su supervivencia en el estroma corneal.^{45,147} Otros factores ya descritos como el tamaño, el diseño y profundidad del implante pueden tener algún papel pero la permeabilidad del material es el factor principal.¹²⁹

La extrusión de un material haloplástico intraestromal viene habitualmente precedida de una necrosis estromal del tejido suprayacente que posibilita la dislocación del material implantado en el estroma. Los casos de necrosis estromal, adelgazamiento epitelial y extrusión de los implantes impermeables de polisulfona y PMMA han sido atribuidos a la nutrición inadecuada de la córnea por delante del implante debido a la naturaleza del material implantado.^{127,138,140,142,143,144,145} La experiencia nos muestra que, a pesar de los primeros casos de extrusión descritos por Dohlman tras implantar LIE de hidrogel de poliglicerol metacrilato (PGMA) que se atribuyeron a la insuficiente permeabilidad y a

problemas mecánicos secundarios a su diseño plano,¹⁵¹ los implantes de hidrogel, con contenido en agua variable, han mostrado buenos resultados y ausencia de extrusiones a largo plazo.^{152,154,155,230,232,246}

En sintonía con lo descrito anteriormente, no hemos encontrado ningún caso de extrusión ni de migración anterior del implante durante el periodo de seguimiento en ninguno de los ojos a los que se les implantó una LIE. Esta incidencia de extrusiones es, a su vez, sensiblemente inferior al 25% de pérdida del lentículos mostrada en trabajos de características similares tras implantes intraestromales con técnica de disección manual de bolsillo corneal en ojos de conejo y que los autores atribuyeron tanto al material como al diseño del implante,¹⁹⁹ o al 12,3% de extrusiones de McDonald con implantes de hidrogel de Lidofilcon A y B en monos, que los autores atribuyeron al frotamiento o a una insuficiente tensión de los puntos de sutura corneal.²⁴⁸

4.2.4. ANÁLISIS GLOBAL DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y DEL ESTADO DE LOS IMPLANTES.

1. La biocompatibilidad de los implantes de PEGDA fue buena, presentando una baja incidencia de complicaciones.
2. No hubo casos de lisis estromal, migración anterior ni extrusión de los implantes.
3. Los implantes se mantuvieron estables y conservaron sus propiedades físicas a lo largo del seguimiento.
4. El empleo de dexametasona tópica o mediante microesferas de PLGA encapsuladas acortó la fase de inflamación.
5. El empleo de dexametasona tópica o mediante microesferas de PLGA encapsuladas disminuyó la incidencia de casos de inflamación severa y de neovascularización corneal.

4.3. PAQUIMETRÍA

4.3.1. Paquimetría Ultrasónica (PU)

La paquimetría preoperatoria media de los grupos a estudio fue similar, no hallando diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,844$). En los grupos 2, 3, 4 y 5 (tanto con LIE como sin LIE) observamos un incremento paquimétrico estadísticamente significativo entre el preoperatorio y el posoperatorio inmediato ($p<0,001$) que podríamos atribuir a la inflamación inducida por la cirugía ya que estos valores se redujeron para la revisión al día siguiente de la cirugía, alcanzando valores similares a los hallados en la revisión a los dos meses en los grupos 2, 4 y 5. En el grupo 3, por el contrario, el grosor corneal medio se mantuvo elevado hasta la revisión del mes en el que la paquimetría volvió a ser similar al de los otros dos grupos con LIE (grupos 4 y 5). Este grosor corneal medio, significativamente más elevado en el grupo 3, tanto a la semana ($p=0,001$) como a las dos semanas ($p=0,003$) se explica por la presencia de varios casos con edema e inflamación significativa dicho grupo (casos 308, 310 y 311 y en menor medida 312, 314 y 321). Una posible explicación para este grosor corneal medio más elevado en estas dos revisiones puede ser la ausencia de tratamiento antiinflamatorio de los ojos del grupo 3 (solo tratados con tobramicina) en comparación con los otros dos grupos en los que se empleó dexametasona (DXM) tanto por vía tópica en el grupo 4 como mediante implantación de microesferas cargadas de DXM en el hidrogel en el grupo 5. Estos cambios en la paquimetría concuerdan con lo hallado en el estudio biomicroscópico en el que observamos que los ojos de los grupos tratados con DXM consiguieron normalizar el edema corneal de forma más precoz que en aquellos en los que no se emplea DXM. En estos 2 últimos grupos (grupos 2 y 3), el número de ojos con engrosamiento corneal secundario a un proceso inflamatorio fue mayor, en especial a la semana y a las dos semanas tras la cirugía. Estos datos vendrían a corroborar la utilidad de la PU como método indirecto de medida del grado de inflamación (edema) corneal.

El incremento medio en el grosor corneal a los 2 meses respecto de los valores preoperatorios medios fue de $99,11 \mu\text{m}$; $117,1 \mu\text{m}$ y $83 \mu\text{m}$ en los grupos 3, 4 y 5 y resultó estadísticamente significativo para los grupos 3 y 4 ($p<0,001$; $p=0,01$ respectivamente). No se pudo realizar un análisis estadístico de los datos del grupo 5 debido a su reducido tamaño muestral. Este incremento del grosor corneal podría atribuirse a la LIE implantada cuyo grosor teórico era de $100 \mu\text{m}$. A diferencia de lo observado en los grupos con LIE, la diferencia paquimétrica entre el preoperatorio y los 2 meses no resultó estadísticamente significativa en el grupo 2 ($p=0,238$). Esta diferencia en el incremento paquimétrico entre los grupos con y sin LIE sugiere que el incremento del grosor corneal en la revisión final a

los 2 meses podría ser atribuible a la presencia de un implante estromal. El grosor corneal medio no mostró diferencias estadísticamente significativas en los grupos con LIE (grupos 3 a 5) con valores de $p=0,11$; $p=0,19$ y $p=0,59$ para la diferencia de medias entre grupos 3-4, 3-5 y 4-5, respectivamente.

Ninguno de los ojos intervenidos, tanto en el grupo 2 sin LIE como en los grupos 3, 4 y 5 con LIE, presentó un adelgazamiento paquimétrico en los diferentes momentos de seguimiento posoperatorio en comparación con el preoperatorio. Estos datos concuerdan con los hallazgos biomicroscópicos ya descritos con ausencia de casos de *melting* corneal y de lisis estromal anterior y posterior. Igualmente, muestra que tampoco hubo casos de adelgazamiento estromal subclínico que pudiera atribuirse a la presencia de un implante intraestromal, al hidrogel de PEGDA o a la propia técnica quirúrgica e indican que la biocompatibilidad de los implantes fue buena a lo largo de los dos meses de seguimiento posoperatorio.

4.3.2. Paquimetría por microscopía confocal in-vivo (MCIV)

Los valores de paquimetría media medidos mediante MCIV en los grupos 1, 2 y 3 presentaron una distribución a lo largo del seguimiento similar a los de la PU. Obtuvimos datos a la semana, al mes y a los dos meses de la cirugía por lo que no pudimos establecer comparaciones entre el preoperatorio y el posoperatorio inmediato. La paquimetría del grupo 1 (grupo sin intervención quirúrgica) se usó como control preoperatorio. En el grupo 2 no hubo diferencias significativas entre la paquimetría a la semana, al mes y a los 2 meses ($p<0,001$), al igual que observamos por PU, donde solo hallamos diferencias estadísticamente significativas con la paquimetría preoperatoria en el posoperatorio inmediato, sin que observáramos diferencias en la paquimetría en el resto de tiempos de seguimiento. En el grupo 3, la paquimetría media a la semana de la cirugía fue superior a la observada al mes y a los dos meses con diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($p=0,001$ y $p=0,24$ respectivamente). La paquimetría media al mes y a los dos meses no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,76$). Estos resultados, al igual que lo observado en el grupo 2, concuerdan con los hallazgos obtenidos por PU en los que observamos que el grosor corneal medio en el grupo 3 se incrementa en el posoperatorio inmediato y no se normaliza hasta la revisión al mes, a partir de la cual las medidas no muestran diferencias con las obtenidas en la exploración final a los dos meses.

4.3.3. Comparación de la paquimetría medida por ultrasonidos y MCIV

La medición exacta del grosor corneal es fundamental en el preoperatorio y seguimiento de la cirugía corneal. Sin embargo, las diferentes tecnologías que disponemos para ello no han demostrado ser consistentes.⁹⁴ Por ello, hemos intentado establecer el grado de concordancia entre las medidas de grosor corneal medidas por PU y las medidas por MCIV en los diferentes grupos a estudio.

La estimación del grado de concordancia entre la paquimetría medida por ultrasonidos (PU) y la paquimetría medida por MCIV se realizó midiendo el coeficiente de correlación intraclase (CCI). El CCI,²⁵⁴ que se acepta como índice de concordancia para datos continuos, describe la variación total que se explica por la diferencia entre los casos de cada grupo. La consistencia de las mediciones realizadas mediante dos técnicas se evaluó mediante el CCI y el grado de acuerdo para valor de CCI propuesto por Landis y Koch.²⁵⁵ (Tabla 32) La concordancia entre las dos técnicas para la medición de la paquimetría en nuestro estudio (PU y MCIV) ha sido diferente entre los 3 grupos. En el grupo 1 el CCI fue de 0,46 y su intervalo de confianza oscilaba entre -0,43 y 0,79 mostrando un grado de acuerdo moderado entre ambas técnicas. En el grupo 2 el CCI fue de 0,19; 0,09 y 0,57 para los diferentes tiempos de estudio y sus intervalos de confianza fueron grandes oscilando entre -0,37 a 0,61; -0,37 a 0,53 y -0,18 a 0,88 respectivamente, mostrando un grado de acuerdo entre ambas técnicas de leve a moderado. Por el contrario en el grupo 3 el CCI para los diferentes tiempos de estudio fue de 0,95; 0,94 y 0,89 respectivamente, con intervalos de confianza pequeños: 0,88 a 0,98; 0,83 a 0,98 y 0,68 a 0,97, mostrando un grado de acuerdo muy elevado entre ambas técnicas de medición.

Tabla 32: Grado de acuerdo para cada valor de CCI propuesto por Landis y Koch.

VALOR	GRADO DE ACUERDO
0	Pobre
0,01-0,2	Leve
0,021-0,4	Regular
0,41-0,6	Moderado
0,61-0,8	Sustancial
0,8-1	Casi Perfecto

Analizando las gráficas de Bland y Altman, observamos que la media de las diferencias de la paquimetría medida por PU y por MCIV en nuestro estudio fue 10,8 μm mayor por PU que por MCIV. Estos resultados son similares a lo que muestran otros trabajos en los que la PU es más gruesa que la medida por MCIV, como en el estudio de McLaren que describe grosores 39 μm más delgados medidos por MCIV en comparación con PU.⁹² Sin embargo, analizando el intervalo de confianza (IC) de estas diferencias observamos que éste era muy amplio (de +80,4 a -58,8 μm). Del mismo modo, el análisis por grupos mostró resultados similares con diferencias de -0,7 μm ; +27,3 μm y +14,6 μm para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. A pesar de que la mayoría de los casos mostraban diferencias que se encontraban dentro del IC, los IC al 95% de estas diferencias medias fueron muy amplios y oscilaron entre +97,7 a -81,1 μm en el grupo 1, +87,8 a -33,2 μm en el grupo 2 y +89 a -59,9 μm en el grupo 3 respectivamente, revelando una gran variabilidad en la diferencia de las medidas obtenidas por PU y MCIV. Por otro lado, analizando los datos individualmente, se observó una gran variabilidad entre casos en los que la paquimetría medida por MCIV mostraba valores tanto inferiores como superiores a los medidos por ultrasonidos, siendo esta variabilidad aleatoria y no relacionada con el grosor corneal ni con la presencia o ausencia de LIE. Una ventaja del método de Bland-Altman para estudiar la concordancia entre diferentes métodos es que la magnitud de la diferencia considerada como aceptable entre la PU y por MCIV no es una decisión estadística sino clínica, y depende de si la concordancia es suficiente para el propósito clínico.²⁵⁶ Así, podemos apreciar que la práctica totalidad de casos muestran diferencias entre ambas técnicas que se encuentran dentro del IC al 95% pero con valores de diferencias en la paquimetría (tanto superiores como inferiores para una u otra técnica) que muestran una gran variabilidad, de hasta 80 μm , y que clínicamente resultan significativas. Así, y a pesar de que la diferencia media en el grosor medido por ambos instrumentos no fue muy grande, tanto la gran variabilidad de las medidas obtenidas mediante MCIV como los valores de CCI (a excepción de los valores obtenidos en el grupo 3) muestran un grado de concordancia pobre entre ambas técnicas.

Tal y como se describe en trabajos anteriores, los valores de espesor corneal medidos por PU son más consistentes que los medidos por MCIV.^{92,257} A pesar de que la precisión de los valores medidos por PU son técnico dependientes y están condicionados por la posición del paquímetro y por la presión ejercida sobre la córnea, los resultados obtenidos mediante PU en el presente estudio han resultado más fiables que los obtenidos por MCIV. A pesar de la variabilidad de las medidas proporcionadas por cada modelo de PU, las medidas obtenidas por PU en los diferentes grupos de ojos de nuestro estudio, mostraron valores que permitieron establecer una correlación clínico-paquimétrica adecuada mientras que los

valores obtenidos por MCIV nos mostraron una alta variabilidad que no pudo ser atribuible a las características clínicas individuales de cada córnea.²³⁵ McLaren, sin embargo, estima que el grosor corneal obtenido por la mayoría de los PU comercialmente disponibles tiende a sobreestimar el valor paquimétrico real y que los resultados obtenidos por MCIV, a pesar de ser menos consistentes, son más exactos.^{76,92}

4.4. MICROSCOPIA CONFOCAL *IN VIVO*

El estudio mediante MCIV nos permitió estudiar a nivel celular las características de los diferentes estratos corneales tras la intervención y poder compararlos, posteriormente, con los hallazgos histológicos *post mortem*.

4.4.1. EPITELIO

La MCIV nos permitió estudiar los cambios en las características morfológicas de las células epiteliales tras disección de un bolsillo estromal y tras el implante de lentes intraestromales de PEGDA. La MCIV nos permitió distinguir, en los grupos 2 y 3, células basales, células intermedias aladas y células epiteliales superficiales de características similares a las observadas en el grupo 1 sin que apreciáramos diferencias en sus características morfológicas a lo largo del seguimiento. El epitelio corneal mantuvo su integridad en todos los casos a excepción de los casos 211 y 216 en el grupo 2 y de los casos 311 y 321 en el grupo 3, en los que no pudimos obtener imágenes válidas o en los que no fue posible la visualización de células epiteliales de las características previamente descritas. Todos ellos fueron casos que biomicroscópicamente presentaron una opacidad o edema corneal, mostrando así una buena correlación entre los hallazgos biomicroscópicos y lo observado por MCIV. En el resto de los casos solo observamos leves alteraciones del epitelio que atribuimos a la presencia de artefactos durante la realización del procedimiento y que no modificaron significativamente las características celulares normales.

Los hallazgos observados coinciden con lo descrito en la literatura tras realizar disecciones estromales manuales o *flaps* corneales, o tras implantes de LIE de hidrogel de materiales diferentes en conejos y en humanos, en los que no observaron cambios en las características epiteliales.^{158,230,231} Otros autores, por el contrario, si han hallado cambios epiteliales, describiendo un adelgazamiento epitelial tras el implante intraestromal de lentes PermaVision,²³⁶ o la presencia de puntos hiperreflectivos en el epitelio corneal a una mayor actividad celular tras la cirugía.¹⁷⁴

4.4.2. ENDOTELIO

Tal y como se ha mencionado en el apartado de los resultados, los endotelios corneales de todos los casos de los grupos 1 a 3 mostraron características normales sin que apreciáramos cambios inducidos por la cirugía en la revisión a los 2 meses.

No hubo diferencias estadísticamente ni clínicamente significativas en la densidad de células endoteliales (DCE) a lo largo del seguimiento entre grupos ($p=0,232$) ni dentro de cada uno de los grupos, ($p=0,072$ y $p=0,231$ en los grupos 2 y 3 respectivamente). Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar la DCE del grupo control con la DCE en los diferentes tiempos de seguimiento tanto en el grupo 2 ($p=0,698$; $p=0,063$ y $p=0,061$) como en el grupo 3 ($p=0,2$; $p=0,907$ y $p=0,96$). Estos resultados coinciden con los descrito por diferentes autores que han reportado ausencia de cambios en la densidad de células endoteliales tras realizar *flaps* para LASIK,^{258,259} tras implantes intraestromales de hidrogel en conejos^{158,230} y en humanos,^{62,231} o tras implantes para la corrección de la presbicia de diferentes modelos: Kamra,¹⁶⁹ Raindrop,¹⁷⁴ o Invue.¹⁷¹ Por el contrario, Saelens describe una disminución de la densidad de células endoteliales en dos pacientes a los 22 años tras la implantación intraestromal de lentes de lidofilcón.¹⁶³

El análisis morfológico del tamaño celular endotelial tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas en la área celular a lo largo del seguimiento entre grupos ($p=0,26$) ni dentro de cada grupo, ($p=0,082$ y $p=0,26$). Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar el área celular endotelial de las córneas del grupo control con las de los diferentes tiempos de seguimiento tanto en el grupo 2 ($p=0,82$; $p=0,055$ y $p=0,061$) como en el grupo 3 ($p=0,16$; $p=0,861$ y $p=0,941$). El análisis del coeficiente de variación del tamaño celular (CVTC) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,026$), aunque sí hubo diferencias significativas en la comparación intra-grupo en el grupo 2 ($p=0,038$). Al comparar el CVTC del grupo control con el observado en los diferentes tiempos de seguimiento tanto en el grupo 2 ($p=0,121$; $p=0,895$ y $p=0,216$) como en el grupo 3 ($p=0,004$; $p=0,396$ y $p=0,129$), solo observamos diferencias estadísticamente significativas con los datos de la exploración a la semana en el grupo 3. Los valores del CVTC fueron del 19% en el grupo control e inferiores al 30% (valor límite para definir el polimegetismo) en todos los tiempos de seguimiento de los grupos 2 y 3 a excepción de la exploración a la semana en el grupo 3, previamente mencionada, en la que el valor del CVTC fue del 30,65%. Entendemos que la relevancia clínica de este dato es poco significativa ya que los valores absolutos son próximos a la normalidad y a que se normalizan en revisiones sucesivas.

El análisis morfológico de la hexagonalidad endotelial tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas en la comparación intra-grupo, ($p=0,174$ y $p=0,211$ para los grupos 2 y 3) aunque sí hubo diferencias estadísticamente significativas para la comparación inter-grupos ($p=0,026$). Al comparar el porcentaje de hexagonalidad del grupo control con la hexagonalidad en los diferentes tiempos de seguimiento tanto en el grupo 2 ($p=0,096$; $p=0,009$ y $p=0,424$) como en el grupo 3 ($p=0,003$; $p=0,071$ y $p=0,391$) observamos diferencias estadísticamente significativas con los datos de la exploración al mes en el grupo 2 y a la semana en el grupo 3. El pleomorfismo se define como el porcentaje de hexagonalidad inferior al 60% y observamos que la hexagonalidad fue superior al 60% en todas las exploraciones salvo en estas revisiones al mes en el grupo 2 (58,86%) y a la semana en el grupo 3 (50,43%). Al analizar el valor de estas diferencias, observamos que el porcentaje de hexagonalidad medio fue del 65,9% en el preoperatorio y del 65,05% y 63,68% en la exploración a los dos meses en los grupos 2 y 3 respectivamente, por lo que no se aprecian diferencias ni clínica ni estadísticamente significativas respecto del preoperatorio en ninguno de los dos grupos. Por lo tanto, al analizar la hexagonalidad en cada tiempo de seguimiento, entendemos que las diferencias (estadísticamente significativas) observadas en estos tiempos de seguimiento intermedio, tendrían escasa relevancia clínica debido a que los valores absolutos no son significativos y a que estos se normalizaron para la revisión a los dos meses.

Los cambios morfológicos en la revisión a la semana del grupo 3, tanto en el CVTC como en el porcentaje de hexagonalidad, coinciden con el mayor número de casos de inflamación en este grupo detectados en la revisión a la semana y que podrían haber sido la causa de estos hallazgos. La literatura que analiza los cambios endoteliales tras realizar *flaps* con microqueratomo^{258,259} o implantes intraestromales,^{158,162,231} menciona la ausencia de cambios morfológicos endoteliales aunque no detalla si se trata del tamaño o de la forma de las células ni si hay cambios temporales en la morfología celular que se normalizan en revisiones posteriores, tal y como hemos hallado en nuestro estudio.

4.4.3. ESTROMA

Las imágenes del estroma anterior y posterior de las córneas de conejo de nuestra muestra mostraron las características imágenes, descritas por diferentes autores, de queratocitos de forma ovalada con núcleos hiperreflectivos y citoplasmas de menor reflectividad embebidos en una matriz extracelular hiporreflectiva.²⁶⁰

4.4.3.1. Densidad de queratocitos

La densidad media de queratocitos en el grupo control (no intervenido) fue mayor (1035 ± 98 cel/mm²) en el estroma anterior que en el posterior (702 ± 92 cel/mm²), tal y como se describe por diferentes autores tanto en humanos como en conejos.^{71,261,262} Los valores de la densidad de queratocitos en córneas de conejo varían en las diferentes series desde 1821 y 1158 cel/mm² en estroma anterior y posterior, respectivamente, descritos por Salamatrad,²³⁰ hasta valores entre 380 y 201 cel/mm² en estroma anterior y posterior en la serie de Reichard.²⁶¹ Los datos obtenidos en las diferentes series han de ser comparados con cautela, debido a que: 1) el estrato estromal a estudio puede no ser el mismo y la densidad de queratocitos varía en función de éste,²³⁸ 2) hay diferencias en la medición en función del MC utilizado,^{76,95} 3) los valores pueden venir expresados en diferentes unidades que no son directamente comparables,⁷¹ y 4) los datos corresponden a series en humanos y en conejos que no son comparables entre sí.

Al analizar los cambios en la densidad de queratocitos en los diferentes grupos, observamos que la densidad de queratocitos en el estroma anterior y posterior no varió como consecuencia de la intervención quirúrgica ni del implante de LIE. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y las medias de la densidad de los queratocitos a los 7, 30 y 60 días en ninguno de los grupos intervenidos, (con y sin implante de LIE) tanto en el estroma anterior como posterior. Estos datos coinciden con lo descrito por Twa y colaboradores, que no observaron cambios en la densidad de queratocitos a las 6 semanas de realizar *flaps* de LASIK en conejos.²³⁸ Otros autores, por el contrario, han descrito una disminución en la densidad de los queratocitos tras LASIK en humanos en porcentajes variables y hasta 5 años después del procedimiento.^{259,263,264} En ojos con implantes estromales, Salamatrand no reporta cambios en la densidad de queratocitos en estroma anterior ni posterior tras implantar LIE de hidrogel en conejos.²³⁰ Petroll y colaboradores, por el contrario, describen una reducción de los queratocitos en áreas adyacentes al implante de hidrogel PermaVision,²³⁶ aunque no cuantifican la densidad de queratocitos y otros autores que realizaron estudios de MCIV tras implantes intaestromales de hidrogel, hablan de normalidad sin mencionar densidades.^{158,231,245}

Dentro de cada grupo, no observamos diferencias en la densidad de queratocitos del estroma anterior entre los diferentes tiempos de evaluación en el grupo 2 ($p=0,23$) ni en el grupo 3 ($p=0,76$). En el estroma posterior, sin embargo, no observamos diferencias en el grupo 3 ($p=0,27$) mientras que en el grupo 2 hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes momentos de evaluación ($p=0,011$). Estas diferencias

pueden deberse a la mayor densidad de queratocitos detectada en la revisión a la semana (803 cel/mm²) que coincide con lo descrito en la literatura, que sugiere que el incremento en la densidad de los queratocitos observado durante el posoperatorio precoz puede deberse a la mayor presencia de núcleos y citoplasma de queratocitos activados e estas fases.^{174,238} Esta mayor densidad de queratocitos en la revisión a la semana disminuyó en las sucesivas revisiones con diferencias respecto del grupo control que no resultaron estadísticamente significativas, tal y como se ha mencionado anteriormente.

Tampoco observamos diferencias significativas en el análisis multivariante entre los dos grupos intervenidos (grupos 2 y 3) a lo largo del seguimiento en el estroma anterior ni en el posterior ($p=0,33$ y $p=0,1$). Estos resultados indican que ni la cirugía de disección lamelar manual ni el implante de una LIE dieron lugar a cambios significativos en la densidad de los queratocitos anteriores ni posteriores al plano de disección estromal en nuestra muestra.

4.4.3.2. Queratocitos activados (QA)

La activación de queratocitos, consistente en la aparición de cambios morfológicos caracterizados por un aumento de la reflectividad citoplasmática y un mayor tamaño, ovalización e hiperreflectividad de sus núcleos, ha sido descrita en humanos y en conejos tras diferentes procedimientos corneales como LASIK,^{236,258,265} DALK,²⁶⁰ o tras implantes intraestromales.^{162,163,231,236}

Los procesos de reparación estromal requieren de la activación de los queratocitos quiescentes adyacentes a la zona acelular inducida por el trauma corneal y de la producción de MEC por parte de éstos.²⁶⁰ En los primeros días de la reparación tisular, el número de queratocitos disminuye en el área adyacente a la herida quirúrgica, y éstos vuelven a repoblar el estroma a partir del séptimo día.²⁶⁰ Los mecanismos por los cuales los queratocitos desaparecen en el posoperatorio precoz no están del todo claros aunque se ha descrito que hay mecanismos apoptóticos involucrados.²⁶⁶ La presencia de QA en el estroma tras un proceso quirúrgico suele ser pasajera en el tiempo con un pico a la semana de la cirugía y una duración variable. En conejos, se han podido detectar hasta 1-2 semanas tras LASIK²⁶⁵ y hasta 10 semanas tras DALK.²⁶⁰ Tras implantes intaestromales de hidrogel en humanos, Malandrini observó que los QA desaparecen hacia los 12 meses tras la cirugía.¹⁷⁴

La presencia de QA en la región de la interfase (en el grupo 2) anterior y posterior a la LIE de PEGDA (en el grupo 3) fue generalizada en nuestra muestra. Además de la presencia de

estos QA, observamos queratocitos de características normales tanto en este área de activación de queratocitos como anterior y posterior a la misma en todos los casos. El estroma posterior permaneció libre de QA al igual que lo describen otros autores.^{174,231,236}

4.4.3.3. Estudio de Interfase

4.4.3.3.1. Reflectividad de la Interfase

El éxito de un procedimiento quirúrgico corneal se basa, entre otros, en la conservación de la transparencia del tejido. La aparición de un *haze* secundario a la existencia de una interfase puede dar lugar a un fenómeno de dispersión anómala de la luz. El estudio de las córneas por MCIV nos permitió visualizar las estructuras corneales con alta magnificación y analizarlas a nivel celular al tiempo que pudimos establecer criterios morfológicos de clasificación de la interfase. Asimismo, nos permitió cuantificar la intensidad de la reflectividad de la interfase mediante el análisis de los valores proporcionados en forma de *light reflectance units* (LRU) (a mayor transparencia menor reflectividad).²⁰³ Por otro lado, el gráfico *Z-scan* del CS4, mediante el análisis de la difusión de la luz a través de estructuras de mayor o menor transparencia, nos proporcionó información cuantitativa a cerca de los distintos estratos corneales y de la intensidad de la reacción tisular en la interfase. Los perfiles del gráfico *Z-scan* nos mostraron un pico de reflectividad (en el eje y) en los pacientes del grupo 2 mientras que en el grupo 3 observamos dos picos de mayor reflectividad en la interfase estroma-lente a cada lado de un valle hiporreflectivo que se corresponde con el implante (ver Figura 41).¹⁶³

La intensidad de la reflectividad de la interfase (LRU) en el grupo 2 no mostró diferencias estadísticamente significativas a lo largo del seguimiento ($p=0,613$). Por el contrario, la intensidad de reflectividad de la interfase anterior en el grupo 3 mostró valores crecientes en los sucesivos tiempos de evaluación con diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($p=0,021$). A su vez, la comparación de la reflectividad entre los grupos 2 y 3 a lo largo del seguimiento, mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p=0,029$), siendo la intensidad media de esta reflectividad superior en el grupo con LIE en todas las exploraciones. La medición a los dos meses de niveles de reflectividad iguales o superiores a los observados en la exploración a la semana, podría deberse a la persistencia de una inflamación subclínica con queratocitos activados y partículas hiperreflectivas o al desarrollo de fibrosis en el plano de disección. El seguimiento de los casos, limitado a dos meses, no nos ha permitido evaluar cambios a más largo plazo que, tal vez, pudieran proporcionarnos información acerca de la naturaleza de esta mayor reflectividad.

En la córnea sana los núcleos de los queratocitos son las únicas estructuras capaces de dispersar la luz y es conocido que la diferencia evidente entre el índice de refracción (IR) de los queratocitos y de la MEC circundante pueda dar lugar a la aparición de *haze*.^{27,28,113} Este *haze* corneal se originará a partir de la luz reflejada y dispersada por pequeñas partículas o por superficies que dividen estructuras con diferente IR y los cambios en la intensidad de este *haze* nos indicarán una mejoría o deterioro del tejido corneal. La cuantificación del *haze* en este estudio nos ha permitido valorar objetivamente cambios en la interfase a lo largo del seguimiento.²⁰¹ No obstante, una limitación a la expresión de la reflectividad en forma de LRU deriva de la dificultad para estandarizar estas medidas. La cuantificación de la reflectividad en LRU solo nos permite realizar comparaciones a lo largo del tiempo en estudios longitudinales como el nuestro ya que estas unidades en las que expresamos el *haze* deberían estandarizarse para poder compararlas con los resultados obtenidos con diferentes MC y en diferentes laboratorios, por lo que no es posible extrapolar ni comparar nuestros resultados.^{99,201}

4.4.3.3.2. Características morfológicas de la interfase

Tal y como se describe en el apartado correspondiente de los resultados (apartado 6.4.2), pudimos observar una desestructuración de la arquitectura estromal normal en el 92,9% de los casos del grupo 2 y en el 100% de los casos del grupo 3 a los dos meses de la cirugía. De acuerdo con la clasificación propuesta en función de la conservación de la estructura estromal, un 7,1 % de los casos del grupo 2 mostraba una interfase tipo 1, sin cambios respecto de la arquitectura estromal normal. La aparición de una interfase secundaria a una disección lamelar o al implante de lentes intraestromales ha sido previamente estudiada por MCIV mostrando características morfológicas variadas. Se ha descrito que las características de la interfase tras DALK varían en función de la técnica, con patrones característicos en función de la profundidad del plano de disección.²⁰³ Tras implantes de lentes intraestromales, Mallandrini describe la aparición de depósitos difusos hiperreflectivos de material amorfo en el estroma intermedio sobre la superficie anterior del implante, a pesar de lo cual describe que la respuesta del tejido al implante es "casi inerte". Alió describe la presencia de partículas hiperreflectivas no metálicas, aumento de la MEC y presencia de células epitelioides.²³¹ Saelens observa una superficie rugosa de alta reflectividad con depósitos de restos celulares mientras que Petroll describe un *haze* difuso (mayor en los casos con LIE que en los casos solo con *flap*), presencia de depósitos hiperreflectivos en la superficie y estructuras de morfología epitelioides.^{163,236}

La correlación entre las características morfológicas de la interfase y la presencia de edema o infiltración estromal no fue concluyente. En el grupo 2, el caso 216 fue el único que

presentó un grado de infiltración clínica significativa y se presentó en la exploración a la semana. En las imágenes de MCIV, las características de la interfase del caso 216 mostraron una imagen con patrón de interfase tipo 4. Sin embargo, otros 6 casos presentaron una interfase tipo 4 (ausencia de estructuras estromales reconocibles) sin que se observara un *haze* clínicamente manifiesto. En el grupo 3, el caso 310 presentó edema e infiltración estromal severos que se correlacionaban con un patrón de interfase tipo 4 por MCIV. Los cuatro casos restantes con inflamación moderada (casos 305, 308, 311 y 314) también mostraron interfases de tipo 3 (50%) y de tipo 4 (50%) en la última revisión previa a su sacrificio. Sin embargo el porcentaje de casos con interfases tipo 3 y 4 fue mayoritario entre los casos del grupo 3 (85,7% a los 2 meses) por lo que un elevado número de casos sin edema ni *haze* biomicroscópicamente evidente también mostró una interfase con desestructuración de la arquitectura estromal normal por MCIV.

Al analizar los casos que histológicamente mostraron una cicatriz significativa en el plano de disección del bolsillo estromal en el grupo 2 (casos 201, 209, 216, 217 y 222), observamos que uno de ellos (caso 217) presentó una interfase tipo 2, otros 3 casos (201, 209 y 222) presentaron una interfase tipo 3, mientras que el caso 216 mostró una interfase tipo 4 en la última exploración realizada con MCIV previa al sacrificio (ver Figuras 42-44). En el grupo 3, la correlación entre la morfología de la interfase por MCIV y los hallazgos histológicos resultó más compleja debido a que hubo cambios en el estroma anterior y en la luz generada por la presencia del implante que nos dificultan la interpretación de las imágenes. Estos resultados muestran que las características morfológicas de la interfase observadas por MCIV no se correlacionan con los cambios histológicos observados en la interfase estromal.

4.4.3.3.3. Partículas hiperreflectivas en la interfase

El porcentaje de casos con presencia de partículas hiperreflectivas en el estroma pómimo a la interfase en la exploración a la semana fue del 90% y 90,5% en los grupos 2 y 3, respectivamente, y fue decreciendo de forma significativa ($p=0,031$) entre la semana y la revisión final a los dos meses en ambos grupos. La aparición de un elevado número de puntos hiperreflectivos asociado a la presencia de queratocitos activados y acúmulo de MEC anormal en las fases iniciales de la cirugía se ha observado tras diferentes procedimientos corneales como: DSAEK,²⁶⁷ DALK,^{203,260} LASIK,^{258,259,265,268,269} o tras el implante de lentes intraestromales.^{158,163,174,231,236} La duración de estas partículas en el estroma tras la cirugía corneal es desconocida. Ismail describe que desaparecen al mes de la cirugía tras implantes PermaVision,¹⁵⁸ aunque se ha descrito la presencia depósitos similares hasta 3-4 años tras cirugía LASIK.²⁶⁹ El seguimiento limitado a dos meses de

nuestra serie, no nos ha permitido evaluar la evolución de estas partículas a más largo plazo. Sin embargo, en la revisión a los dos meses, aunque en menor porcentaje que inicialmente, pudimos observar partículas en el 42,8% y 53,3% de los casos en los grupos 2 y 3, en contraposición a lo descrito por Ismail y colaboradores.¹⁵⁸

La variabilidad en el número de estas partículas fue muy grande y osciló entre 0 y 960 partículas/mm² entre los diferentes casos sin que observáramos diferencias estadísticamente significativas en el número de partículas entre ambos grupos ($p=0,337$). Sin embargo, la densidad de partículas osciló entre los diferentes tiempos de evaluación, con una media de 25 partículas/mm² y 76,6 partículas/mm² en los grupos 2 y 3 a los dos meses. Petroll analiza la densidad de partículas tras realizar *flaps* estromales con LFS con y sin implante de LIE y describe densidades medias de partículas inferiores a las observadas por nosotros (67,7+/-53,2 partículas/mm² con LIE frente a 16,3+/-22,1 sin LIE).²³⁶ Otros autores, sin embargo, han descrito densidades de partículas hiperreflectivas superiores a las observadas en nuestra serie.^{259,265,269} No hemos observado una asociación entre el número de partículas hiperreflectivas y el grado de reflectividad de la interfase ni entre las partículas hiperreflectivas y la presencia de queratocitos activados, visibles en todos los casos, en consonancia con lo descrito por Petroll.²³⁶

El significado clínico de estas partículas es incierto. Inicialmente observadas tras procedimientos como el LASIK, se pensó que pudieran deberse a restos metálicos secundarios al microqueratomo pero recientemente también se han descrito tras *flaps* realizados con LFS.²³⁶ Malandrini sugiere que puedan ser productos de degeneración celular del tejido corneal ablacionado, partículas de polvo del quirófano, remanentes de las torundas/hemostetas empleadas o restos de secreciones de las glándulas de Meibomio.¹⁷⁴ Pérez-Gomez postula que puedan deberse la presencia de queratocitos apoptóticos,²⁶⁹ mientras que Dawson, tras analizar *ex vivo* especímenes corneales por MC, sugiere que puedan deberse a vacuolas intracitoplasmáticas de los queratocitos.²⁷⁰

La presencia de partículas hiperreflectivas en cantidades y frecuencias comparables en ambos grupos (2 y 3), así como la literatura que describe su presencia tanto tras *flaps* corneales como tras implantes intraestromales sugiere que su aparición pueda estar más relacionada con la propia técnica quirúrgica que con el implante en sí.^{158,174,236,269,270} Tampoco hemos hallado una relación entre la existencia de estas partículas o su densidad por MCIV y otras variables biomicroscópicas.

4.4.3.4. **Implantes intraestromales**

Por MCIV, los implantes intraestromales se visualizaron como un valle hiporreflectivo entre imágenes hiperreflectivas correspondientes a las interfases (ver apartado anterior) tal y como lo describen diferentes autores.^{163,236} Esta observación en el gráfico *Z-scan* nos ha permitido medir el grosor de la LIE calculando la distancia entre el inicio y el final del valle hiporreflectivo dentro del estroma corneal.

Los grosores medios de las LIE medidos por MCIV fueron de 109,85 μm , 118,14 μm y 104,63 μm a los días 7, 30 y 60, sin que observáramos diferencias ni clínica ni estadísticamente significativas a lo largo del seguimiento. El valor medio del grosor de las LIE a los 2 meses de la cirugía es similar al grosor teórico de los implantes, de aproximadamente 100 μm , y concuerda con el incremento paquimétrico global medido tanto por PU como por MCIV que fue de 98,89 μm y de 97,55 μm , respectivamente.

4.4.4. ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS DE LA MCIV

1. La MCIV ha resultado ser una herramienta válida para estudiar cualitativa y cuantitativamente la respuesta corneal a nivel celular tras disección estromal manual y tras el implante intraestromal de lentes de PEGDA.
2. No hemos hallado cambios cuantitativos ni cualitativos en el endotelio corneal secundarios a la disección estromal o al implante de lentes intraestromales de PEGDA.
3. La densidad de queratocitos del estroma anterior y posterior no se modificó significativamente como consecuencia de la disección estromal o el implante de lentes intraestromales de PEGDA.
4. Ambos grupos (2 y 3) con disección estromal y con implante de LIE de PEGDA dieron lugar a activación de queratocitos.
5. No hemos hallado una relación entre el implante de una LIE de PEGDA y la aparición de partículas hiperreflectivas (presentes en ambos grupos). Tampoco hemos hallado una relación entre la aparición de partículas hiperreflectivas, ni el número de estas, y los hallazgos biomicroscópicos.
6. No hemos observado una correlación entre las características morfológicas de la interfase por MCIV y los hallazgos histológicos.

4.5. HISTOLOGÍA

La presencia de un implante intraestromal da lugar a una serie de cambios histológicos en la córnea como consecuencia de: 1) las propias modificaciones inducidas por la técnica quirúrgica, 2) los procesos de inflamación inducidos por la técnica quirúrgica y por la presencia del implante intraestromal de hidrogel y 3) por los procesos de regeneración y reparación corneal secundarios a la técnica quirúrgica y a los cambios inflamatorios inducidos por ésta.^{205,271}

4.5.1. EPITELIO

El estudio histológico nos mostró un epitelio de características similares a las del grupo control en todos los casos de los grupos 2 a 5 a excepción de los casos 209 y 216 en el grupo 2 y los casos 310 y 311 del grupo 3. La modificación en el grosor epitelial de estos casos, tanto en el grupo 3 sobre el área del implante intraestromal como en el grupo 2 por encima del plano de disección estromal, coincide con lo descrito por otros autores tras comparar 2 grupos: 1) con *flaps* corneales y 2) tras implantar polímeros de hidrogel de perfluoropoliether (PFPE) en córneas de conejo.²⁷² Las causas de este adelgazamiento epitelial secundario al *flap* corneal no están claras pero se ha sugerido que puedan deberse al corte de los nervios corneales por el microqueratomo²⁷³ o a la especie (conejo) empleada como modelo animal.²⁷⁴ En los casos con LIE de hidrogel, el adelgazamiento epitelial ha sido descrito por varios autores y se ha sugerido que puede estar relacionado con el grosor del implante y la difusión de glucosa a través del material del implante o con factores mecánicos que inducen un abombamiento de la córnea.^{153,248,272,275,276} De cualquier forma, no está clara la significación patológica que este adelgazamiento epitelial pueda tener y su existencia no parece tener repercusión en la calidad óptica de estos ojos.²⁷¹

En todos los casos de los grupos 3 a 5 observamos una hiperplasia epitelial y un engrosamiento de las células epiteliales en las zonas de transición justo anteriores a los bordes de la LIE. Se ha sugerido que este hallazgo pudiera deberse a un intento del tejido por regularizar la superficie corneal tras el encurvamiento artificial inducido por el implante intraestromal.^{140,272,275,276,277}

4.5.2. ENDOTELIO

El endotelio corneal y la membrana de Descemet se mantuvieron intactos en todos los casos. Los únicos hallazgos de alteraciones en el endotelio se debieron a artefactos debidos al procesamiento de las muestras para su análisis histológico. La conservación del endotelio, incluso en los casos que presentaron una inflamación clínica, confirma los

hallazgos biomicroscópicos en los que la inflamación corneal se limita a los estratos corneales anteriores al implante y está en concordancia con lo descrito tras implantes de hidrogel en ojos de conejo por otros autores.^{230,275,276} Los resultados histológicos también concuerdan con los hallazgos obtenidos por MCIV en los que hemos observado un endotelio de características normales que no se ha visto alterado por la técnica quirúrgica ni por la presencia del implante de hidrogel.

4.5.3. ESTROMA

Los queratocitos son las células principales del estroma corneal. Son células mesenquimales aplanadas que poseen largos procesos celulares mediante los cuales se unen entre ellos por uniones tipo GAP.^{5,278} En condiciones de reposo están quiescentes pero ante un daño tisular rompen sus uniones celulares, se convierten en móviles y actúan como fibroblastos degradando y formando colágeno. Estos queratocitos son conocidos como queratocitos activados y pueden recibir señales de activación por citoquinas, factores solubles, otras células o por la presencia de un cuerpo extraño.²⁷⁸ La presencia de queratocitos activados en los cortes histológicos se observó en todos los grupos, especialmente en los grupos 2 y 3 y fue más evidente en el estroma anterior y en el adyacente al implante, tal y como lo describe Samples, y tal y como se observa en las imágenes de MCIV de las córneas de los grupos 2 y 3 en las que no observamos queratocitos activados en el estroma posterior.²⁷⁵ Sampes sugiere que la presencia de estos queratocitos activados en ausencia de células inflamatorias en el tejido puede estar estimulada por el hidrogel.²⁷⁵ El hallazgo de queratocitos activados en cortes histológicos en los diferentes momentos posquirúrgicos nos indica que los procesos de regeneración y remodelado corneal continúan hasta meses después de la cirugía.²⁷⁸

4.5.3.1. Estroma grupo 2

En las muestras histológicas de las córneas del grupo 2 (con disección estromal y sin implante) el estroma corneal no mostró diferencias significativas con el de las córneas control, salvo en cinco casos (casos 201, 209, 216, 217 y 222). La presencia de una fibrosis colágena en el plano de disección estromal en estos casos se manifiesta en forma de desestructuración de la arquitectura lamelar con fibras de colágeno desorganizadas y depósito de material extracelular.

Ante una agresión quirúrgica los queratocitos tienen el potencial de convertirse en células capaces de degradar y producir MEC. Durante el proceso de cicatrización las fibras de MEC dañadas son digeridas y sustituidas por otras de forma más desordenada. Posteriormente, durante el remodelado tisular, estas fibras serán digeridas y sustituidas por otras cuyo

diámetro y organización se asemeja al de las fibras originales.²⁷⁹ Estudios ultraestructurales de córneas de conejo intervenidas mediante cirugía lamelar han mostrado la presencia de material extracelular amorfo, colágeno desorganizado y queratocitos degenerados de características similares a las observadas en estos cinco casos del grupo 2.^{280, 281}

4.5.3.2. Estroma grupos 3, 4 y 5

En los grupos 3, 4 y 5 (con LIE) se pudo apreciar el espacio generado por el implante de hidrogel en el estroma medio. El bolsillo estromal se visualizó como un espacio vacío de aspecto rectangular o trapezoidal en el estroma medio-posterior. Las características de este bolsillo estromal fueron similares en los tres grupos así como en los casos sacrificados en los diferentes momentos tras la intervención. Las características del tejido estromal adyacente al implante de PEGDA coincidieron con las halladas por otros autores con implantes de hidrogel de diferentes materiales.^{230,248,276,282} Pudimos apreciar la compresión de las lamelas del colágeno en los bordes del implante, la compactación de las fibras de colágeno por encima del implante o una densidad de queratocitos mantenida en el estroma circundante junto a una cicatriz hipocelular en los bordes laterales del implante. Otros autores han mostrado una hipocelularidad de queratocitos en el estroma anterior por delante del implante no observada en nuestra serie con LIE de PEGDA y que se ha sugerido pudiera deberse a la mala difusión de nutrientes por la impermeabilidad del material empleado.^{138,142}

La visualización correcta de los implantes de PEGDA no fue posible en la mayoría de los casos de nuestro estudio y solo pudimos observar fragmentos residuales del implante original en los bordes del bolsillo estromal fuera de su localización inicial. Esta dificultad para procesar correctamente el hidrogel para su visualización adecuada en cortes histológicos se debe a la naturaleza de estos polímeros con alto contenido hídrico y a que son materiales muy sensibles a los cambios ambientales.²⁸² Por todo ello, los hidrogeles no pueden ser procesados correctamente mediante métodos convencionales ya que los cambios de pH y de temperatura, requeridos para procesar muestras congeladas, o la deshidratación de las muestras con alcohol, para su procesamiento en parafina, dan lugar a cambios estructurales en la arquitectura de los hidrogeles y del complejo hidrogel-estroma. Los sistemas de procesamiento mediante resinas de glicol metacrilato permitirían mantener un pH estable durante la fijación del tejido, evitando así que el hidrogel, de alto contenido en agua y pH-dependiente, se expanda o se contraiga.^{283,284} De este modo, podríamos analizar la relación hidrogel-estroma sin artefactos inducidos por los métodos convencionales de procesamiento de muestras.²⁸²

En todos los casos de los grupos 3 a 5 pudimos observar la presencia de células en los bordes de la luz estromal. Estas células aparecieron con morfologías, distribuciones y localizaciones variadas: 1) agrupadas en formaciones celulares heterogéneas (probablemente núcleos de queratocitos acumulados) tal y como proponen Salamatrad y colaboradores,²³⁰ 2) aisladas, o 3) en hileras constituidas por una monocapa de queratocitos aplanados bordeando la luz estromal, como consecuencia de una metaplasia pseudoepiteliomatosa. La presencia de estas células junto a la luz puede deberse a la mala conservación del implante de PEGDA en la muestra. La distorsión de la forma o del tamaño de los implantes durante el procesamiento histológico puede alterar cualquier crecimiento celular alrededor del implante, dando lugar a la presencia de crecimientos celulares sobre el mismo o el acúmulo de células fuera de su localización de origen en la córnea *in vivo*.²⁸² La presencia de monocapas de queratocitos aplanados bordeando la luz generada por el implante también descrita previamente tras LIE de hidrogel puede deberse a la migración de queratocitos y a su incapacidad para invadir el hidrogel.²⁷⁶

En ningún caso observamos queratocitos o fibras de colágeno adheridos al implante de PEGDA en los cortes histológicos de los sacrificios realizados en los diferentes tiempos tras la cirugía, tal y como había sido descrito previamente por McCarey y colaboradores tras implantar lentes intraestromales de PHEMA.²⁷⁶ Esto sugiere que los hidrogeles son materiales bien tolerados por la córnea que generan nula o mínima inflamación y ausencia de respuesta tisular al mismo.¹⁵¹

No encontramos ningún caso de crecimiento intraepitelial tras el implante intraestromal en ninguno de los grupos de nuestro estudio. Las células halladas en los bordes de la luz fueron, en todos los casos, queratocitos modificados, sin evidencia de células de origen epitelial. No obstante, la presencia de células epiteliales en la interfase tras un implante de LIE ha sido descrita por otros autores y podría tener su origen en: 1) un insuficiente lavado del espacio estromal previo a la implantación o tras completar la cirugía o 2) en la ausencia de una correcta aposición de los bordes de la incisión tras completar el procedimiento.
^{230,231,271}

La presencia de queratocitos vacuolizados tras implantación de LIE ya ha sido descrita previamente tanto en casos con inflamación significativa como en otros sin signos clínicos de inflamación.^{142,275} Esta vacuolización de queratocitos puede deberse a diferentes causas como: enfermedades de depósito, desecación o inflamación de la córnea y se asocian característicamente con un infiltrado inflamatorio en el estroma adyacente. En ocasiones se puede presentar una falsa vacuolización perinuclear debida a la artefactación de la muestra

por el procesamiento.²⁸⁵ La presencia de queratocitos vacuolizados en nuestra muestra se observó en los casos con inflamación significativa del grupo 3.

A diferencia de lo descrito por Rodrigues, Parks o Mullet, tanto con implantes impermeables,¹⁴⁴ como con lentes de hidrogel,^{162,246} no hemos hallado cristales lipídicos en el estroma posterior al implante. Estos depósitos pueden deberse a la formación de lípidos por parte de los queratocitos como respuesta inespecífica al estrés mecánico o metabólico.^{144,246} En primates se ha observado que la respuesta de los queratocitos a los implantes intraestromales de hidrogel puede dar lugar a la formación de lípidos como los descritos anteriormente, a depósitos de fibras de colágeno por encima y por debajo del implante,²⁷⁵ o a la presencia de una membrana similar a la basal en la interfase estroma-hidrogel.²⁸⁶

4.5.4. CASOS CON INFLAMACIÓN SIGNIFICATIVA

La necrosis aséptica y la neovascularización corneal representan diferentes formas de disfunción aguda de la fisiología corneal normal a diferencia del adelgazamiento corneal, la hipocelularidad estromal o la vacuolización de queratocitos, analizadas previamente, que representan formas crónicas de disfunción debidas a la mala difusión de nutrientes.¹⁴² Algunos autores han sugerido que las características morfológicas del epitelio corneal por encima del implante pueden servir como marcadores de viabilidad celular y secundariamente de biocompatibilidad del implante.²⁷⁶ Esto justificaría nuestros hallazgos, ya que tres de los cuatro casos con pérdida de la morfología epitelial normal se corresponden con los casos en los que observamos una inflamación clínica significativa.

Todos los casos de neovascularización corneal clínica en el momento de su sacrificio mostraron neovasos en los cortes histológicos. El análisis de los casos con neovascularización corneal, todos ellos pertenecientes a los grupos 2 y 3, nos mostró la presencia de un infiltrado leucocitario (predominantemente eosinofílico) así como de algunos linfocitos junto con neovasos en los cortes histológicos. La presencia de un infiltrado de LPMN y linfocitos asociados a la neovascularización corneal podría explicar el papel que los leucocitos pudieran tener, a partir de la liberación de sustancias vasogénicas, en el desarrollo de la neovascularización inducida experimentalmente, tal y como se ha observado en estudios previos con el mismo modelo animal.²⁸⁷ Otros investigadores han sugerido que tanto la neovascularización como la presencia de un infiltrado inflamatorio de LPMN pudieran depender de un tercer factor independiente que se desarrolla en respuesta al daño corneal inducido y que produciría efectos vasogénicos y quimiotácticos de leucocitos.²⁸⁸

La inflamación es la principal forma de reacción ante cualquier daño tisular y se sabe que cuando un material extraño entra en contacto con un tejido biológico, éste responde dando inicio a una respuesta inflamatoria aguda que se suele continuar con un proceso de reparación tisular. En ensayos experimentales con implantes de PHEMA en córneas de conejo se ha observado que en fases iniciales de la inflamación, las células que predominantemente infiltran el tejido corneal son los LPMN (eosinófilos, basófilos y mayoritariamente neutrófilos), mientras que en fases más tardías, el macrófago pasa a tener un papel dominante en la respuesta inflamatoria crónica.²⁸⁹ Esta respuesta inflamatoria es inicialmente secundaria al daño quirúrgico y en un segundo tiempo inducida por el material implantado.²⁸⁹ Estos autores observaron que la respuesta inflamatoria tras la implantación estromal de una lente de hidrogel difería de la respuesta inducida exclusivamente por el daño quirúrgico. Así, en las primeras horas, la respuesta tisular al implante de hidrogel sigue el patrón característico de respuesta al daño tisular inducido quirúrgicamente y se pueden observar neutrófilos durante las primeras 24-48 horas que posteriormente desaparecerían en los casos de reparación tisular normal.²⁸⁹ Estas células inflamatorias podrían generar mediadores intracelulares que darán lugar a la activación de queratocitos quiescentes que se encuentran en la vecindad.²⁷⁸ En una segunda fase, el hidrogel intraestromal podría funcionar como reservorio de mediadores que controlarían los procesos de reparación tisular y perpetuarían el reclutamiento de células inflamatorias que pueden permanecer de forma prolongada en función de la tolerancia al material.²⁸⁹ La mayor parte de los casos de nuestra serie, tanto en el grupo 2 (sin hidrogel) como en los grupos 3 a 5 (con implante de PEGDA) no mostraron presencia de células inflamatorias en los cortes histológicos. Los sacrificios de los conejos se realizaron de forma secuencial a la semana, 2 semanas, 4 semanas y 8 semanas tras la cirugía, lo que justificaría la ausencia de reacción inflamatoria en estos casos debido a la supervivencia limitada de los neutrófilos en el tejido corneal tras la cirugía en casos de reparación tisular normal, que no supera las 48 horas.²⁹⁰ Así, en estos casos, los únicos cambios histológicos apreciables fueron los secundarios a la reparación tisular normal.

En los casos 216, 310 y 311 pudimos observar una reacción inflamatoria en la muestra histológica. Esta infiltración de células inflamatorias estaba mayoritariamente compuesta por eosinófilos, aunque también fueron visibles algunos linfocitos, macrófagos aislados y cariorrexis de neutrófilos. La explicación de esta infiltración mayoritaria por eosinófilos en la muestra no está clara. Las únicas publicaciones que describen la presencia de infiltración eosinofílica tras implantes intraestromales fueron la de Deg y colaboradores tras implantar lentes de polisulfona en córneas de monos sin que hallaran una explicación para la presencia de éstos y la de Vijayasecaran y colaboradores que describen la presencia de

eosinófilos aislados en ojos de conejo tras implantes de PHEMA para cuya presencia no aportan una explicación.^{142,289}

4.5.5. EL PAPEL DE LOS CORTICOIDES

De los resultados histológicos de este estudio podríamos concluir que el uso de dexametasona tópica o encapsulada en microesferas de PLGA en el implante, resultó ser eficaz en el control de la inflamación y en la inhibición de la angiogénesis observando la ausencia de neovascularización o infiltración estromal por LPMN en el examen histológico de todas las córneas pertenecientes a los grupos 4 y 5. Estos hallazgos confirmarían lo observado en el análisis biomicroscópico descrito en el apartado 4 de resultados y el papel que los corticoides pudieran tener como agentes antiangiogénicos y antiinflamatorios. (Ver apartado 4.2.2.3)

4.5.6. ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS HISTOLÓGICOS

1. Los datos histológicos confirman los hallazgos clínicos y de MCIV en los que la ausencia de extrusión de los implantes y de *melting* estromal indican una buena biocompatibilidad y una adecuada permeabilidad al oxígeno y los nutrientes.
2. Se ha observado un adelgazamiento epitelial en los casos con inflamación significativa, mayoritariamente pertenecientes al grupo 3. En los grupos con LIE se ha observado una hiperplasia epitelial anterior al borde de los implantes.
3. No hemos hallado células de origen epitelial que sugieran crecimiento intraepitelial de la interfase. Las células observadas en el borde de la luz generada tras el implante de PEGDA tienen son de origen mesenquimal.
4. No ha sido posible la visualización de los implantes de PEGDA *in situ* en los cortes histológicos debido al tipo de procesamiento de las muestras.
5. Los datos histológicos confirman la ausencia de infiltración de LPMN y linfocitos así como de neovascularización corneal histopatológica tanto en los casos tratados con dexametasona tópica o encapsulada en microesferas de PLGA (grupos 4 y 5), confirmando su eficacia como agente antiangiogénico y antiinflamatorio en esta muestra.

4.6. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE MEC POR RT-qPCR

4.6.1. METALOPROTEASA DE MATRIZ TIPO 1 (MMP-1)

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP) son enzimas capaces de degradar la matriz extracelular. En función del sustrato de degradación, las MMP se dividen en 3 subtipos: colagenasas intersticiales (MMP-1 y MMP-8), estromelisininas (MMP-3 y MMP-10) y gelatinasas (MMP-2 y MMP-9).²⁹¹ La MMP-1 es una colagenasa, capaz de degradar el colágeno-1, presente en una gran variedad de células sanas incluidos los queratocitos, las células epiteliales y las células endoteliales.²⁹² El equilibrio entre colagenogénesis y colagenolisis es crucial durante los procesos de reparación del tejido corneal. La excesiva colagenolisis inducida por la MMP-1 en las fases iniciales tras la cirugía corneal con implantes intraestromales de hidrogel puede dar lugar a una cicatrización inadecuada y a una disminución de la deposición de colágeno, que puede comprometer la permanencia corneal del implante a medio y largo plazo.²⁹³ Así, el ratio entre las MMP y los inhibidores tisulares de las MMP corneales parece ser determinante en el equilibrio entre la síntesis y la degradación del colágeno.²⁹⁴

Los hidrogeles pueden actuar como depósito de factores de crecimiento y otras sustancias liberadas durante la rotura de la MEC.²⁹³ Se ha visto que el hidrogel de PHEMA, puede dar lugar a la activación del complemento por la vía alternativa y a la quimotaxis de macrófagos secundaria.²⁹⁵ Se ha observado que la inhibición directa de la MMP-1 puede ser de utilidad en el control de los procesos de *melting* corneal a pesar de que la principal enzima gelatinolítica implicada en los procesos de reparación tisular en el posoperatorio temprano es la MMP-9.²⁹³

La expresión de MMP-1 se empleó como marcador de la actividad colagenolítica a la vez que evaluamos la actividad anticolagenolítica de la dexametasona tópica o encapsulada en microesferas de PLGA en la inhibición de la expresión de MMP-1. El aumento de la expresión de MMP-1 se utilizó como marcador inflamatorio. Observamos una reducción en la expresión del MMP-1 en todos los grupos de nuestra muestra. Esta reducción de la expresión varió entre 2,5 folds de media en el grupo 3 y 7 folds en el grupo 5, con diferencias que no resultaron estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,054$). Al analizar el efecto de la dexametasona en la expresión de MMP-1 en los diferentes grupos con LIE, observamos que la infra expresión del MMP-1 fue mayor en los grupos tratados con corticoides (grupos 4 y 5) que en el grupos sin corticoides (grupo 3) con diferencias que no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,165$).

De los resultados de la expresión de MMP-1 en los diferentes grupos de la muestra, observamos que su expresión se reduce en todos los grupos con y sin implante de LIE. Estos hallazgos concuerdan con la ausencia de casos de lisis estromal, *melting* o perforación de los diferentes grupos del estudio. Por otro lado, el empleo de dexametasona, tanto tópica como liberada a partir de microesferas de PLGA-dexametasona encapsuladas en el PEGDA, ha mostrado la inhibición de la expresión de MMP-1 en córneas con LIE en 2,7 y 7,3 *folds* en los grupos 4 y 5, respectivamente, a pesar de que las diferencias respecto del grupo 3 no han resultado estadísticamente significativas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Fiton tras implantes intracorneales en córneas de conejo que halló una reducción de la expresión de MMP-1 tras tratamiento con medroxiprogesterona, o Lu que observó una reducción dosis dependiente de la síntesis de MMP-1 tras exponer fibroblastos de conejos en cultivos tridimensionales a dosis decrecientes de dexametasona.^{293,294} A pesar de ello, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la expresión de MMP-1 en el grupo no tratado con dexametasona (grupo 3) indica que la inhibición de la MMP-1 por la dexametasona no ha resultado ser un marcador útil para evaluar la actividad anticolagenolítica de la dexametasona en nuestra muestra.

4.6.2. COLÁGENO-1A

El colágeno tipo 1 es, junto con el colágeno 5, el principal colágeno del estroma corneal.¹⁸ Su síntesis (en equilibrio con la colagenolisis descrita previamente) resulta fundamental en los procesos de reparación tisular corneal. La expresión de colágeno-1A se midió para evaluar la funcionalidad de los queratocitos tras la cirugía de disección estromal manual y tras el implante de una LIE de PEGDA.

La expresión del colágeno-1A aumentó en todos los grupos de nuestra muestra salvo en el grupo 5 en el que su expresión se redujo. La amplitud del incremento de la expresión varió entre 1,6 *folds* de media en el grupo 2 y 7,7 *folds* de media en el grupo 3, con diferencias que resultaron estadísticamente significativas entre los cuatro grupos ($p=0,01$). La expresión de colágeno-1A en el grupo 5 presentó gran disparidad entre sus casos, lo cual, añadido a la escasa n y a la discordancia entre la inhibición de su expresión y los hallazgos clínicos observados, hace que estos resultados deban interpretarse con cautela. El aumento de la expresión del colágeno-1A en los grupos 2 a 4 fue inversamente proporcional a la expresión de MMP-1 que se empleó como marcador de colagenolisis en esos mismos grupos e indicaría una respuesta funcional normal de los queratocitos tras la cirugía en estos grupos.

4.6.3. QUERATOCÁN

Los proteoglicanos (PG) del estroma corneal son moléculas complejas, responsables del carácter hidrofílico de la córnea, esencial para su transparencia.²⁹⁶ La composición de proteoglicanos de la córnea difiere de la de otros tejidos conectivos siendo el queratán sulfato el más abundante de ellos. El queratocán, una de las tres principales proteínas centrales (*Core proteins*) que constituyen el queratán sulfato, se expresa característicamente en la córnea²⁴³ y parece tener un papel importante tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la transparencia corneal.^{244,297}

Ante un trauma corneal, los queratocitos dañados esta agresión mueren por apoptosis.^{298,299} Algunos de los queratocitos viables en la vecindad son activados para proliferar^{299,300} pero producen relativamente poca MEC.^{301,302,303} Esta MEC contiene lumicán y queratocán formando cadenas de queratán sulfato a bajos niveles.³⁰³ Posteriormente, las células observadas en las fases iniciales de los procesos de cicatrización podrían ser miofibroblastos hiper celulares que pueden convertirse en: 1) miofibroblastos productores de gran cantidad de colágeno pero de escasa cantidad de queratán sulfato, dando lugar a una MEC desordenada y opaca, o 2) fibroblastos de la herida que, al igual que los queratocitos, producen altos niveles de colágeno, lumicán y queratocán y dan lugar a una MEC ordenada que restaura la transparencia corneal.^{244,303,304,305}

La expresión del queratocán se redujo en todos los grupos de nuestra muestra. Esta reducción de la expresión varió entre 1,8 *folds* de media en el grupo 3 y 12 *folds* de media en el grupo 5, con diferencias que no resultaron estadísticamente significativas entre grupos ($p=0,46$). Al analizar el efecto de la dexametasona en la expresión de queratocán en los diferentes grupos con LIE, observamos que la infra-expresión del queratocán fue mayor en los grupos tratados con corticoides (grupos 4 y 5) que en el grupo sin corticoides (grupo 3) a pesar de que estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,441$).

Globalmente observamos que la expresión de queratocán se redujo como consecuencia de la intervención y del implante de una LIE y que la dexametasona, tanto tópica como liberada a partir de microesferas de PLGA-dexametasona, inhibieron su expresión en córneas con LIE. De los resultados de la expresión de queratocán en los diferentes grupos y basándonos en los resultados de transparencia corneal observados biomicroscópicamente y por MCIV, podríamos concluir que la expresión de queratocán no ha resultado ser un parámetro útil para valorar el grado de transparencia de la córnea en nuestra muestra,

debido a la mayor inhibición de su expresión en los grupos 4 y 5 que mostraron mayor transparencia biomicroscópica.

4.6.4. ANÁLISIS GLOBAL DE LOS RESULTADOS de RT-qPCR

1. Se ha observado una inhibición de la expresión de MMP-1 en los grupos tratados con dexametasona, tanto tópica como encapsulada en microesferas de PLGA. La diferencia en la amplitud de la inhibición de su expresión en los diferentes grupos no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas.
2. La expresión de col-1A aumentó en los grupos 2 a 4 como consecuencia del proceso quirúrgico y del implante de una LIE.
3. La inhibición de la expresión de MMP-1 en los grupos 2 a 4 fue inversamente proporcional a la expresión de colágeno-1A.
4. La expresión de queratocán se redujo en todos los grupos como consecuencia de la cirugía y del implante de la LIE sin que observáramos diferencias estadísticamente significativas en la magnitud de la expresión de éste entre los diferentes grupos.
5. La expresión de queratocán no ha mostrado una buena correlación con los hallazgos clínicos para su empleo como marcador de la transparencia corneal en nuestra muestra.

CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN GENERAL

Los hallazgos clínico-biomicroscópicos, paquimétricos y por microscopía confocal *in vivo* (MCIV), así como los resultados histológicos y de expresión de proteínas de matriz extracelular mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) de los especímenes corneales obtenidos tras el sacrificio han mostrado una buena biocompatibilidad de los implantes de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) para su empleo como implante intraestromal corneal.

1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

1. Se han podido fabricar implantes de polietilenglicol diacrilato (PEGDA) válidos para su uso como implante intraestromal corneal. Los implantes han mantenido las características estructurales y de transparencia tras la implantación y a lo largo del seguimiento del estudio.
2. La técnica quirúrgica de disección estromal manual en la córnea de conejo ha demostrado ser válida y reproducible para la implantación de lentes intraestromales de las características empleadas en este estudio.
3. Los hallazgos biomicroscópicos han mostrado una buena biocompatibilidad de los implantes intraestromales de PEGDA con una baja incidencia de complicaciones y ausencia de *melting* corneal, lisis estromal y extrusión de los implantes en el modelo experimental de conejo *in vivo*.
4. La microscopía confocal *in vivo* (MCIV) nos ha permitido el estudio de las córneas *in vivo* a nivel celular, mostrando una ausencia de cambios en la densidad de los queratocitos y de las células endoteliales secundaria a la disección estromal o a la implantación de lentes de PEGDA. Igualmente, nos ha permitido estudiar los cambios inducidos en el estroma corneal, así como las características morfológicas y la intensidad de la reflectividad de la interfase.
5. El empleo de dexametasona tópica o mediante liberación por microesferas de PLGA-dexametasona ha demostrado ser efectivo en el control de la inflamación corneal, tal y como se ha observado en los hallazgos biomicroscópicos, paquimétricos e histológicos, con ausencia de inflamación significativa en los grupos tratados con dexametasona (4 y 5). El análisis de la expresión de metaloproteasa de matriz de tipo 1 (MMP-1) por RT-qPCR revela que la dexametasona no ha demostrado diferencias estadísticamente significativas en la inhibición de su expresión en nuestra muestra.

CONCLUSIONES

6. El análisis histológico de los especímenes corneales obtenidos tras el sacrificio nos ha permitido establecer una correlación clínico-histológica e histológico-MCIV de los hallazgos, proporcionando un mayor entendimiento de las observaciones clínicas y la confirmación histológica de los cambios observados por MCIV.
7. El análisis de la expresión por RT-qPCR de la expresión de colágeno 1A (col-1A), metaloproteasa de matriz-1 (MMP-1) y queratocán ha mostrado una mayor expresión de col-1A y una infraexpresión de la MMP-1 que se correlaciona con los hallazgos clínicos. Los resultados de la expresión de queratocán no han sido concluyentes y no han resultado ser válidos para su empleo como marcador de la transparencia en la muestra analizada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nishida T. Cornea. In Kraemer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. Cornea. Fundamentals of cornea and external disease 2nd ed. Vol 1. Philadelphia: Elsevier Mosby. 2005:3-26.
2. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 2007; 17:26–36.
3. Mishima S. Corneal Thickness. *Surv Ophthalmol* 1968; 13:57-96.
4. Rüfer F, Schröder A, Erb C. White-to-white corneal diameter; normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea* 2005; 24:259–261.
5. Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 1957; 136:263-286.
6. Barraquer. En: Barraquer: Distrofias y degeneraciones corneales. Atlas y texto. Barcelona 2004. Ed Esprax.
7. DelMonte D, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Sur* 2011; 37:588-598.
8. Pfister RR. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1973; 12:654-668.
9. Gipson IK, Yankauckas M, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Rinehart W. Characteristics of a glycoprotein in the ocular surface glycocalyx. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:218-227.
10. Doughty MJ. Morphometric analysis of the surface cells of rabbit corneal epithelium by scanning electron microscopy. *Am J Anat* 1990; 189:316-328.
11. Buck RC. Ultrastructural characteristics associates with the anchoring of the corneal epithelium in several classes of vertebrates. *J Anat* 1983; 137:743-756.
12. Hanna C. Proliferation and migration of epithelial cells. *Am J Ophthalmol* 1966; 61:55-62.
13. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24:1442-1443.
14. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye* 1989; 3:141-157.
15. Komai Y, Ushiki T. The three dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:2244-2258.
16. Moller-Pedersen T, Ledet T, Ehlers N. The keratocyte density of human donor corneas. *Curr eye Res* 1994; 13:163-169.
17. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF. The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2000; 19:185-193.
18. Birk DE, Fitch JM, Linsenmayer TF. Organization of collagen type I and V in the embryonic chicken cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27:1470-1477.
19. Kern P, Menasche M, Robert L. Relative rates of biosynthesis of collagen type I, type V and type VI in calf cornea. *Biochem J* 1991; 274:615-617.
20. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:2244-2258.
21. Castoro JA, Bettelheim AA, Bettelheim FA. Water concentration gradients across bovine cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29:963-968.
22. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* 1997; 11:465-471.
23. Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2004; 78:503-512.
24. Parfitt GJ, Pinali C, Young RD, Quantock AJ, Knupp C. Three-dimensional reconstruction of collagen-proteoglycan interactions in the mouse corneal stroma by electron tomography. *J Struct Biol* 2010; 170:392-397.
25. Goldman JN, Benedek GB. The relationship between morphology and transparency in the nonswelling corneal stroma of the shark. *Invest Ophthalmol* 1967; 6:574-600.

26. Moller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res* 2003; 78:553-560.
27. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petrol WM, Jester JV. Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy: a 1-year confocal microscopic study. *Ophthalmology* 2000; 107:1235-1245.
28. Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WY, Cavanagh HD, Petroll WM, Piatigrosky J. The celular basis of corneal transparency: evidence of corneal crystallins. *J Cell Sci* 1999; 112:613-622.
29. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal Anatomy Redefined. A novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). *Ophthalmology* 2013; 120:1778-1785.
30. Grayson: Anatomia. En Grayson: Enfermedades de la córnea, cuarta edición, Madrid 1999. Harcourt Brace España, SA.
31. Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultraestructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol* 1982; 100:1942-1947.
32. Fitch JM, Birk DE, Linsenmayer C, Linsenmayer TF. The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *J Cell Biol* 1990; 110:1457-1468.
33. Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakawara S, Manabe R. Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Curr Eye Res* 1981; 1:553-556.
34. Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Robinson BJ, Rich NM. Postnatal development of corneal endothelium. *Inv Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27:44-51.
35. Nucci P, Brancato R, Mets MB, Shevel SK. Normal endothelial cell density range in childhood. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:247-248.
36. Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:779-782.
37. Bates AK, Hiorns RW, Cheng H. Modelling of changes in the corneal endothelium after cataract surgery and penetrating keratoplasty. *Br J Ophthalmol* 1992; 76:32-35.
38. Polse KA, Brand RJ, Cohen SR, Guillon M. Hypoxic effects on corneal morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:1542-1554.
39. Maurice DM. The permeability to sodium ions of living rabbit's cornea. *J Physiol* 1951; 112:493-495.
40. Verkman AS. Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp Eye Res* 2003; 76:137-143.
41. Thoft RA, Friend J, Dohlman CH. Corneal glucose concentration: Flux in the presence and absence of epithelium. *Arch Ophthalmol* 1971; 85:467-472.
42. Friend J. Biochemistry of ocular surface epithelium. *Int ophthalmol Clin* 1979; 19:73-91.
43. Khodadoust AA, Lawrence WH. Diurnal variation in corneal endotelial morphology. *Ophthalmology* 1984; 91:1125-1128.
44. Koch JM, Refojo MF, leong FL, Kenyoon KR. Keratopathy of the rabbit cornea following complete eyelid closure. *Acta Ophthalmologica* 1989; 67:108-114.
45. McCarey BE, Schmidt FH. Modeling glucose distribution in the cornea. *Curr Eye Res* 1990; 9:1025-1039.
46. Müller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Trevo TMT. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp ye Res* 2003; 76:521-542.
47. Wilson SE, Netto M, Ambrosio RJ. Corneal cells: Chatty in development, homeostasis, wound healing and disease. *Am J Ophthalmol* 2003; 136:530-536.
48. Nishida T, Chikama T, Morishige N, Yanai R, Yamada N, Saito J. Persistent epithelial defects due to neurotrophic keratopathy treated with a sustance p-derived peptide and insulin-like growth factor 1. *Jpn J Ophthalmol* 2007; 51:442-447.
49. Davis FA. The anatomy and Histology of the eye and orbit of the rabbit. *Trans Am Ophthalm Soc* 1929; 27:400.2-441.
50. Bozkir G. Measurment of axial lenth and radius of corneal curvature in the rabbit eye. *Acta Med Okayama* 1997; 51:9-11

-
51. Duke-Elder WS, Duke-Elder PM. Some physico-chemical factors influencing the intraocular pressure. *Experiments On The "Perfused" Eye*. *Br J Ophthalmol* 1929; 13:385-400.
 52. Andrews SE. Corneal diseases of rabbits. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 2002; 5:341-356.
 53. Peiffer R, Phom-Thorsen L, Corcoran K. Models in Ophthalmology and vision research. In: Manning P, Ringler D, Newcomer C, Ed. *The biology of the laboratory rabbit*, 2nd ed. San Diego 1994.
 54. Doughty MJ. The cornea and corneal endothelium in the aged rabbit. *Optom Vis Sci* 1994; 71:809-818.
 55. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 16:597-613.
 56. Wollensak G, Mazzotta C, Kalinski T, Sel S. Limbal and conjunctival epithelium after corneal cross-linking using riboflavin and UVA. *Cornea* 2011; 30:1448-1454.
 57. Rapuano CJ, Fishbaugh JA, strike DJ. Nine point corneal thickness measurements and keratometry readings in normal corneas using ultrasound pachymetry. *Insight* 1993; 18:16-22.
 58. 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.
 59. Chan T, Payor S, Holden BA. Corneal thickness profiles in rabbits using an ultrasonic pachometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24:1408-1410.
 60. Chakrabarti HS, Craig JP, Brahma A, Malik TY, McGhee CM. Comparison of corneal thickness measurements using ultra-sound and Orbscan slit-scanning topography in normal and post-LASIK eyes. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27:1823-1828.
 61. Barkana Y, Gerber Y, Elbaz U, Schwartz S, Ken-Dror G, Avni I, Zadok D. Central corneal thickness measurement with the Pentacam Scheimpflug system, optical low-coherence reflectometry pachymeter, and ultrasound pachymetry. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31:1729-1735.
 62. Amano S, Honda N, Amano Y, Yamagami S, Miyai T, Samejima T, Ogata M, Miyata K. Comparison of corneal thickness measurements by rotating Scheimpflug camera, ultrasonic pachymetry, and scanning-slit corneal topography. *Ophthalmology* 2006; 113: 937-941.
 63. Marisch MW, Bullimore MA. The repeatability of corneal thickness measures. *Cornea* 2000; 19:792-795.
 64. Lackner B, Schmidinger G, Pieh S, Funovics MA; Skorpik C. Repeatability and reproducibility of central corneal thickness measurement with Pentacam, Orbscan, and ultrasound. *Optom Vis Sci* 2005; 82:892-899.
 65. Módis L Jr, Langenbucher A, Seitz B. Scannig-slit and specular microscopic pachymetry in comparison with ultrasonic determination of corneal thickness. *Cornea* 2001; 20:711-714.
 66. Suzuki S, Oshika T, Oki K, Sakabe I, Iwase A, Amano S, Araie M. Corneal thickness measurements: scanning-slit corneal topography and noncontact specular microscopy versus ultrasonic pachymetry. *J Cataract refract Surg* 2003; 29:1313-1318.
 67. Sedaghat MR, Daneshvar R, Kargozar A, Derakhshan A, Darei M. Comparison of central corneal thickness measurement using ultrasonic pachymetry, rotating scheimpflug camera, and scanning-slit topography. *Am J Ophthalmol* 2010;150: 780-789.
 68. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J* 1990; 16:65-73.
 69. Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 1993; 100:1444-1454.

70. Bohnke M, Masters RB. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:553-628.
71. Niederer RL, McGhee CNJ. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 2009; 29:30-58.
72. Erie LC, McLaren JW, Patel SV. Confocal Microscopy in Ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 2009; 148:639-646.
73. Minsky M. Memoir of inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 1988; 10:128-138.
74. Petroll WJ, Jester JV, Cavanagh HD. In vivo confocal imaging: general principles and applications. *Int Rev Exp Pathol* 1996; 36:93-129.
75. Lemp MA, Dilly PM, Boyde A. Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea* 1985; 4:205-209.
76. McLaren JW, Nau CB, Patel SV, Bourne WM. Measuring corneal thickness with the Confoscan 4 and z-ring adapter. *Eye Contact Lens* 2007; 33:185-190.
77. Petran M, Hadravsky M. Tandem scanning microscope, a new tool for three-dimensional microanatomy. *Prog Clin Biol Res* 1989; 295:551-558.
78. Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea* 2000; 19:712-722.
79. Masters BR, Thaer AA. In vivo human corneal confocal microscopy of identical fields of subepithelial nerve plexus, basal epithelial, and wing cells at different times. *Microsc Res Tech* 1994; 29:350-356.
80. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:225-236.
81. Stave J, Zinser G, Grümmer G, Guthoff R. Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures. *Ophthalmologie* 2002; 99:276-280.
82. Hara M, Morishige N, Chikama T, Nishida T. Comparison of confocal microscopy and noncontact specular microscopy for evaluation of the corneal endothelium. *Cornea* 2003; 22:512-515.
83. Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning confocal microscopy. *Cornea* 1998; 17:485-492.
84. Popper M, Morgado AM, Quadrado MJ, Van Best JA. Corneal cell density measurement in vivo by scanning slit confocal microscopy: method and validation. *Ophthalmic Res* 2004; 36:270-276.
85. Eckard A, Stave J, Guthoff RF. In vivo investigations of the corneal epithelium with the confocal Rostock Laser Scanning Microscope (RSLM). *Cornea* 2006; 25:127-131.
86. Rong B, Yan XM. In vivo study of normal human limbal and central corneas using laser confocal microscope. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2006; 42:17-21.
87. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Pandey RM, Vajpayee RB. In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J ophthalmol* 2003; 51:225-230.
88. Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea* 2001; 20:374-384.
89. Mastropasqua L, Nubile M. *Confocal Microscopy of the cornea*. Slack incorporated. Thorofare NJ. 2002.
90. Li HF, Petroll WM, Moller-Pedersen T, Maurer JK, Cavanagh HD, Jester JV. Epithelial and corneal thickness measurements by in vivo confocal microscopy through focusing (CMTF). *Curr Eye Res* 1997; 16:214-221.
91. Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:333-339.

92. McLaren JW, Nau CB, Erie JC, Bourne WM. Corneal thickness measurement by confocal microscopy, ultrasound, and scanning slit methods. *Am J Ophthalmol* 2004; 137:1011-1020.
93. Brugin E, Ghirlando A, Gambato C, Mildena E. Central corneal thickness: z-ring corneal confocal microscopy versus ultrasound pachymetry. *Cornea* 2007; 26:303-307.
94. McLaren JW, Nau CB, Kitzmann AS, Bourne WM. Keratocyte density: comparison of two confocal microscopy. *Eye Contact Lens* 2005; 31:28-33.
95. McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Automated assessment of keratocyte density in stromal images from the ConfoScan 4 confocal microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:1918-1926.
96. Patel SV, McLaren JW, Camp JJ, Nelson LR, Bourne WM. Automated quantification of keratocyte density by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:320-326.
97. Imre L, Nagimihaly A. Reliability and reproducibility of corneal endothelial image analysis by in vivo confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239:356-360.
98. Kitzmann AS, Winter EJ, Nau CB, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Comparison of corneal endothelial cell images from a noncontact specular microscope and a scanning confocal microscope. *Cornea* 2005; 24:980-984.
99. Patel DV, McGhee CN. Quantitative analysis of in vivo confocal microscopy images: A review. *Surv Ophthalmol* 2013; 58:466-475.
100. Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, Efron N. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2001; 78:706-711.
101. Klais CM, Bühren J, Kohnen T. Comparison of endothelial cell count using confocal and contact specular microscopy. *Ophthalmologica* 2003; 217:99-103.
102. Müller A, Craig JP, Grupcheva CN, McGhee CN. The effects of corneal parameters on the assessment of endothelial cell density in the elderly eye. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:325-330.
103. Sheng H, Parker EJ, Bullimore MA. An evaluation of the ConfoScan3 for corneal endothelial morphology analysis. *Opt Vis Sci* 2007; 84:888-895.
104. Erie EA, McLaren JW, Kittleson KM, Patel SV, Erie JC, Bourne WM. Corneal subbasal nerve density: a comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens* 2008; 34:322-325.
105. Patel DV, McGhee CNJ. Mapping of the normal human corneal subbasal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:4485-4488.
106. Sato T, Akiyama K, Shibata H. A new surgical approach to myopia. *Am J Ophthalmol* 1953; 36:823-829.
107. Fyodorov SN, Agranovsky AA. Long-term results of anterior radial keratotomy. *J Ocular Therapy Surg* 1982; 1:217-232.
108. Trokel SL, Sirinivasan R, Braren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmology* 1983; 96:710-715.
109. Krueger RR, Trokel RL, Schubert HD. Interaction of ultraviolet laser light with the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26:1455-1464.
110. Marshall J, Trokel S, Rothery S, Krueger R. Photoablative reprofiling of the cornea using an excimer laser: photorefractive keratectomy. *Lasers Ophthalmol* 1986; 1:21-48.
111. Maguen E, Salz JJ, Nesburn AB, Warran C, Macy JI, Papaioannou T, Hofbauer J, Berlin MS. Results of excimer laser photorefractive keratectomy for the correction of myopia. *Ophthalmology* 1994; 101:1548-1557.
112. Corbett MC, Prydal JI, Verma S, Oliver KM, Pande M, Marshall J. An in vivo investigation of the structures responsible for corneal haze after photorefractive keratectomy and their effect on visual function. *Ophthalmology* 1996; 103:1366-1380.

113. Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:487-501.
114. Carones F, Vigo L, Scandola E, Vacchini L. Evaluation of the prophylactic use of mytimicin-C to inhibit haze formation after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2001; 28:2088-2095.
115. Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Stathi EZ, Frenschok O, Greorgiadis A. Laser in situ keratomileusis. *Lasers surg med* 1990; 10:463-468.
116. Hersh PS, Brint SF, Maloney RK, Durie DS, Gordon M, Michelson MA, Thomson VM, Berkeley RB, Schein OD, Steinert RF. PRK vs LASIK for moderate to high myopia: a randomized prospective study. *Ophthalmology* 1998; 105:1512-1523.
117. Jacobs JM, Taravella MJ. Incidence of intraoperative flap complications in laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2002; 28:23-28.
118. Ambrosio RJ, Tervo T, Wilson SE. LASIK-associated dry eye and neurotrophic epitheliopathy: pathophysiology and strategies for prevention and treatment. *J Refract Surg* 2008; 24:396-407.
119. Linebarger EJ, Hardten DR, Lindstrom RL. Diffuse lamellar Keratitis: Diagnosis and management. *J Cataract Refract Surg* 2000; 26:1072-1077.
120. Pallikaris IG, Kymionis GD, Astyrakakis NI. Corneal ectasia induced by laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27:1796-1802.
121. Binder PS, Lindstrom RL, Stulting RD, Donnenfeld E, Wu H, McDonnell P, Rabinowitz Y. Keratoconus and corneal ectasia after LASIK. *J Cataract Refract Surg* 2005; 31:2035-2038.
122. Randleman JB, Woodward M, Lynn MJ, Stulting RD. Risk assessment of ectasia after corneal refractive surgery. *Ophthalmology* 2008; 115:37-50.
123. Azar DT, Ang RT, Lee JB, Kato T, Chen CC, Jain S, Gabison E, Abad JC. Laser subepithelial keratomileusis: electron microscopy and visual outcomes of flap photorefractive keratectomy. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12:323-328.
124. Tanioka H, Hieda O, Kawasaki S, Nakayi Y, Kinoshita S. Assessment of epithelial integrity and cell viability in epithelial flaps prepared with the epi-LASIK procedure. *J Cataract Refract Surg* 2007; 33:1195-1220.
125. Lee HK, Lee KS, Kim JK, Kim HC, Seo KR, Kim EK. Epithelial healing and clinical outcomes in excimer laser photorefractive surgery following three epithelial removal techniques: mechanical, alcohol, and excimer laser. *Am J Ophthalmol* 2005; 139:56-63.
126. Sakimoto T, Rosenblatt MI, Azar DT. Laser eye surgery for refractive errors. *Lancet* 2006; 367:1432-1447.
127. Barraquer JI. Queratoplastia refractiva: estudios e informaciones oftalmológicas 1949; 2:10-30.
128. Barraquer JI. Modification of refraction by means of intracorneal inclusions. *In Ophthalmol Clin* 1966; 6:53-78.
129. Knowles. Effect of intralamellar plastic membranes on corneal physiology. *Am J Ophthalmol* 1961; 51:1146-1156.
130. Troutman RC, Swinger C. Refractive keratoplasty: keratophakia and keratomileusis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1978; 76:329-339.
131. Kaufman HE. The correction of aphakia. *Am J Ophthalmol* 1980; 89:1-10.
132. Werblin TP, Klyce SD. Epikeratophakia: The surgical correction of aphakia. I. Lathing of corneal tissue. *Curr Eye Res* 1981; 1:123-129.
133. Werblin TP, Kaufman HE. Epikeratophakia: The surgical correction of aphakia. II. Preliminary results in a non-human primate model. *Curr Eye Res* 1981; 1:131-137.
134. Werblin TP, Kaufman HE. Epikeratophakia: The surgical correction of aphakia. III. Preliminary results of a prospective clinical trial. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:1957-1960.
135. McDonald MB, Kaufman HE, Aquavella JV, Durrie DS, Hiles DA, Hunkeler JD, Keates RH, Morgan KS, Sanders DR. The nationwide study of epikeratophakia for aphakia in adults. *Am J Ophthalmol* 1987; 103:358-365.

136. McDonald MB, Kaufman HE, Aquavella JV, Durrie DS, Hiles DA, Hunkeler JD, Keates RH, Morgan KS, Sanders DR.. The nationwide study of epikeratophakia for myopia. *Am J Ophthalmol* 1987; 103:375-383.
137. McDonald MB, Kaufman HE, Durrie DS, Keates RH, Sanders DR. Epikeratophakia for keratoconus. The nationwide study. *Arch Ophthalmol* 1986; 104:1294-1300.
138. Choyce DP. The correction of refractive errors with polysulfone corneal inlays; a new frontier to be explored? *Trans Ophthalmol Soc UK* 1985; 104:332-342.
139. Kirkness CM, Steele AD, Garner A. Polysulphone corneal inlays. Adverse reactions: A preliminary report. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1985; 104:343-350.
140. Lane SL, Lindstrom RL, Cameron JD, Thomas RH, Mindrup EA, Waring GO 3rd, McCarey BE, Binder BS. Polysulfone corneal lenses. *J Cataract Refract Surg* 1986; 12:50-60.
141. Climenhaga H, MacDonald JM, McCarey BE, Waring GO. Effect of diameter and depth on the response to solid polysulphone intracorneal lenses in cats. *Arch Ophthalmol* 1988; 106:818-824.
142. Deg JK, Binder PS. Histopathology and clinical behavior of polysulphone intracorneal implants in the baboon model. *Polysulphone lens implants. Ophthalmology* 1988; 95:506-515.
143. McCarey BE, Lane SL, Lindstrom RL. Alloplastic corneal lenses. *Int Ophthalmol Clin* 1988; 28:155-163.
144. Rodrigues MM, McCarey BE, Waring GO 3rd, Hidayat AA, Kruth H. Lipid deposits posterior to impermeable intracorneal lenses in rhesus monkeys: clinical, histochemical and ultrastructural studies. *Refract Corneal Surg* 1990; 6:32-37.
145. Choyce DP. Semi-rigid corneal inlays used in the management of albinism, aniridia and ametropia. *Ophthalmology* 1982; 89:55.
146. Horgan SE, Fraser SG, Choyce DP, Alexander WL. Twelve year follow-up of unfenestrated polysulfone intracorneal lenses in human sighted eyes. *J Cataract Refract Surg* 1996; 22:1045-1051.
147. Larrea X, De Courten C, Feingold V, Burger J, Buchler P. Oxygen and glucose distribution after intracorneal lens implantation. *Optom Vis Sci* 2007; 84:1074-1081.
148. Peppas NA, Mikos AG. Preparation methods and structure of hydrogels, in: NA Peppas (Ed), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy, Vol.1*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1986; 1-27.
149. Refojo MF. Permeation of water through some hydrogels. *J Appl Polymer Sci* 1965; 9:3417-3426.
150. Beekhuis WH, McCarey BE. Hydration stability of intracorneal hydrogel implants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26:1634-1636.
151. Dohlman CH, Refojo MF, Rose J. Synthetic polymers in corneal surgery. I. Glyceryl Methacrylate. *Arch Ophthalmol* 1967; 77:252-257.
152. McCarey BE, Andrews DM. Refractive keratoplasty with intrastromal hydrogel lenticular implants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981; 21:107-115.
153. Werblin TP, Blaydes JE, Fryczkowski A, Peiffer R. Stability of the hydrogel intracorneal implants in non-human primates. *CLAO J* 1983; 9:157-161.
154. Koenig SB, Hamano T, Yamaguchi T, Kimura T, McDonald MD, Kaufman HE. Refractive Keratoplasty with hydrogel implants in monkeys. *Ophthalmic Surg* 1984; 15:225-229.
155. McCarey BE, Van Rij G, Beekhuis WH, Waring GO. Hydrogel keratophakia: a freehand pocket dissection in the monkey model. *Br J Ophthalmol* 1986; 70:187-191.
156. Beekhuis W, McCarey BE, Van Rij G, Waring GO. Hydrogel keratophakia: a microkeratome dissection in the monkey model. *Br J Ophthalmol* 1986; 70:192-198.
157. McDonald MB, McCarey BE, Storie B, Bewerman RW, Salmeron B, Rij G, Knight PM. Assessment of the long-term corneal response to hydrogel intrastromal lenses implanted in monkey eyes for up to five years. *J Cataract Refr Surg* 1993; 19:213-222.

158. Ismail MM. Correction of hyperopia by intracorneal implants. *J Cataract Refr Surg* 2002; 28:527-530.
159. Michieletto P, Ligabue E, Balestrazzi A, Balestrazzi A, Giglio S. PermaVision intracorneal lens for the correction of hyperopia. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30:2152-2157.
160. Ismail MM. Correction of hyperopia by intracorneal lenses. *J Cataract Refr Surg* 2006; 32:1657-1660.
161. Verity SM, McCulley JP, Bowman RW, Cavanagh HD, Petroll WM. Outcomes of PermaVision intracorneal implants for the correction of hyperopia. *Am J Ophthalmol* 2009; 147:973-977.
162. Mullet ME, Alió JL, Knorz MC. Hydrogel Intracorneal Inlays for the correction of hyperopia. Outcomes and complications after 5 years of follow-up. *Ophthalmology* 2009; 116:1455-1460.
163. Saelens IE, Bleyen I, Hillenaar T, Thiadens AA, Houdijn Beekhuis WH, Remeijer L, van Rij G. Long-term follow-up of hydrogel intracorneal lenses in two aphakic eyes. *J Cataract Refract Surg* 2010; 36:2200-2203.
164. Evans MDM. Synthetic corneal implants. In: *Biomaterials and regenerative medicine*. Traian Chirila editor. Woodhead publishing limited, Cambridge 2010; 65-133.
165. Lindstrom RL, MacRae SM, Pepose JY, Hoopes PC. Corneal inlays for presbyopia correction. *Curr Opin Ophthalmol* 2013; 24:281-287.
166. Dexl AK, Seyeddain O, Riha W, Hohensinn M, Rückl T, Hitzl W, Grabner G. Reading performance after implantation of a modified corneal inlay design for the surgical correction of presbyopia: 1-year follow-up. *Am J Ophthalmol* 2012; 153:994-1001.
167. Seyeddain O, Riha W, Hohensinn M, Nix G, Dexl AK, Grabner G. Refractive surgical correction of presbyopia with the AcuFocus small aperture corneal inlay: two-year follow-up. *J Refr Surg* 2010; 26:707-715.
168. Tomita M, Kanamori T, Waring GO 4th, Yukawa S, Yamamoto T, Sekiya K, Tsuru T. Simultaneous corneal inlay implantation and laser in situ keratomileusis for presbyopia in patients with hyperopia, myopia, or emmetropia: six-month results. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38:495-506.
169. Seyeddain O, Hohensinn M, Riha W, Nix G, Rückl T, Grabner G, Dexl AK. Small-aperture corneal inlay for the correction of presbyopia: 3-year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38:35-45.
170. Dexl AK, Jell G, Strohmaier C, Seyeddain O, Riha W, Rückl T, Bacherneegg A, Grabner G. Long-term outcomes after monocular corneal inlay implantation for the surgical compensation of presbyopia. *J Cataract Refract Surg* 2015; 41:566-575.
171. Bouzoukis DI, Kymionis GD, Panagopoulou SI, Diakonis VF, Limnopoulou AN, Portaliou DM, Pallikaris IG. Visual outcomes and safety of small diameter intrastromal refractive inlay for the corneal compensation of presbyopia. *J Refr Surg* 2012; 28:168-173.
172. Baily C, Kohnen T, O'Keefe M. Preloaded refractive-addition corneal inlay to compensate for presbyopia implanted using a femtosecond laser: one-year visual outcomes and safety. *J Cataract Refract Surg* 2014; 40:1341-1348.
173. Limnopoulou AN, Bouzoukis DI, Kymionis GD, Panagopoulou SI, Plainis S, Pallikaris AI, Feingold V, Pallikaris IG. Visual outcomes and safety of a refractive corneal inlay for presbyopia using femtosecond laser. *J Refract Surg* 2013; 29:12-18.
174. Malandrini A, Martone G, Canovetti A, Menabouni L, Balestrazzi A, Fantozzi C, Lenzetti C, Fantozzi M. Morphologic study of the cornea by in vivo confocal microscopy and optical coherence tomography after bifocal refractive corneal inlay implantation. *J Cataract Refract Surg* 2014; 40:545-557.
175. Garza EB, Gomez S, Chayet A, Dishler J. One-year safety and efficacy results of a hydrogel inlay to improve near vision in patients with emmetropic presbyopia. *J Refract Surg* 2013; 29:166-172.
176. Whang WJ, Yoo YS, Joo CK, Yoon G. Changes in Keratometric Values and Corneal High Order Aberrations After Hydrogel Inlay Implantation. *Am J Ophthalmol* 2017; 173:98-105.

-
177. Whitman J, Dougherty PJ, Parkhurst GD, Olkowski J, Slade SG, Hovanesian J, Chu R, Dishler J, Tran DB, Lehmann R, Carter H, Steinert RF, Koch DD. Treatment of Presbyopia in Emmetropes Using a Shape-Changing Corneal Inlay: One-Year Clinical Outcomes. *Ophthalmology*. 2016; 123:466-475.
178. World Health Organization. Prevention of blindness and visual impairment: priority eye diseases. <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index9.html>.
179. Liu C, Paul B, Tandon R, Lee E, Fong K, Mavrikakis I, Herold J, Thorp S, Brittain P, Francis I, Ferrett C, Hull C, Lloyd A, Green D, Franklin V, Tighe B, Fukuda M, Hamada S. The osteo-odonto-keratoprosthesis (OOKP). *Semin Ophthalmol* 2005; 20:113-128.
180. Lee WB, Shtein RM, Kaufman SC, Deng SX, Rosenblatt MI. Boston Keratoprosthesis: Outcomes and Complications: A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2015; 122:1504-1511.
181. Hicks CR, Crawford GJ, Dart JKG, Grabner G, Holland EJ, Stulting RD, Tan DT, Bulsara M. AlphaCor clinical outcomes. *Cornea* 2006; 25:1034-1042.
182. Falcinelli G, Falsini B, Taloni M, Colliardo P, Falcinelli G. Modified osteo-odonto-keratoprosthesis for treatment of corneal blindness: long-term anatomical and functional outcomes in 181 cases. *Arch Ophthalmol* 2005; 123:1319-1329.
183. Hicks CR, Crawford GJ, Dart JK, Grabner G, Holland EJ, Stulting RD, Tan DT, Bulsara M. AlphaCor: Clinical outcomes. *Cornea* 2006; 25:1034-1342.
184. Dudenhofer EJ, Nouri M, Gipson IK, Baratz KH, Tisdale AS, Dryja TP, Abad JC, Dohlman CH. Histopathology of explanted collar button keratoprostheses: a clinicopathologic correlation. *Cornea* 2003; 22:424-428.
185. De La Paz MF, De Toledo JÁ, Charoenrook V, Sel S, Temprano J, Barraquer RI, Michael R. Impact of clinical factors on the long-term functional and anatomic outcomes of osteo-odonto-keratoprosthesis and tibial bone keratoprosthesis. *Am J Ophthalmol* 2011; 151:829-839.
186. Chan CC, LoVerde L, Qiang J, Nordlund ML, Holland EJ. Incidence, Risk Factors, and Surgical Management of Boston Type 1 Keratoprosthesis Corneal Melts, Leaks, and Extrusions. *Cornea* 2016; 35:1049-1056.
187. Liu C, Hille K, Tan D, Hicks C, Herold J. Keratoprosthesis surgery. *Dev Ophthalmol* 2008; 41:171-186.
188. Myung D, Duhamel P-E, Cochran JR, Noolandi J, Ta CN, Frank CW. Development of hydrogel-based keratoprostheses: a materials perspective. *Biotechnol Prog* 2008; 24:735-741.
189. Carlsson DJ, Li F, Shimmura S, Griffith M. Bioengineered corneas: how close are we? *Curr Opin Ophthalmol* 2003; 14:192-197.
190. Griffith M, Harkin DG. Recent advances in design of artificial corneas. *Curr Opin Ophthalmol* 2014; 25:240-247
191. Griffith M, Poliseti N, Kuffova L, Gallar J, Forrester J, Vemuganti GK, Fuchsluger TA. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. *Ocul Surf* 2012; 10:170-183.
192. Mellot MB, Searcy K, Pishko VM. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization. *Biomaterials* 2001; 22:929-941.
193. Riley S, Dutt S, De la Torre R, Ctlen AC, Sah RL, Ratcliffe A. Formulation of PEG-based hydrogels affects tissue-engineering cartilage construct characteristics. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12:983-990.
194. Myung D, Derr K, Huie P, Noolandi J, Ta KP, Ta CN. Glucose permeability of human, bovine, and porcine corneas in vitro. *Ophthalmic Res* 2006; 38:158-163.
195. Maa YF, Hsu CC. Effect of primary emulsions on microsphere size and protein-loading in the double emulsion process. *J Microencapsul* 1997; 14:225-241.
196. Hickey T, Kreutzer D, Burgess DJ, Moussy F. Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices.

- Biomaterials 2002; 23:1649-1656.
- 197.Zhang XZ, Lewis PJ, Chu CC. Fabrication and characterization of a smart drug delivery system: microsphere in hydrogel. *Biomaterials* 2005; 26:3299-3309.
- 198.ARVO. The Association of Research in Vision and Ophthalmology. Statement for the use of animals in biomedical research. Animals in research committee. Second edition. Bethesda, 1993. www.arvo.org
- 199.Itziar Martínez Soroa. Viabilidad de lentículo intracorneal de hidrogel copolimerizado con β -lactama en ojo de conejo. Tesis doctoral 2011. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco (UPV/EHU).
- 200.Martínez-Soroa I, Mendicute J, Asensio AB, Madarieta I, Alava JI, Garagorri N, Aldazabal P. Comparacion de dos técnicas de implantación de lentes intracorneales en ojos de conejo. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2005; 80:581-588.
- 201.McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Standarization of corneal haze measurement in confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:5610-5616.
- 202.Ku JYF, Niederer RL, Patel DV, Sherwin T, McGhee CNJ. Laser scanning in vivo confocal analysis of keratocyte density in keratoconus. *Ophthalmology* 2008; 115:845-850.
- 203.Schiano-Lomoriello D, Colabelli-Gisoldi RA, Nubile M, Oddone F, Ducolli G, Villani CM, Mastropaqsqua L, Pocobelli A. Descemetic and Predescemetic DALK in keratoconus patients: a clinical and confocal perspective study. *Biomed Res Int* 2014; 2014:123156.
- 204.Yuan X, Mitchell BM, Wilhelmus KR. Gene profiling and signaling pathways of *Candida albicans* keratitis. *Mol Vis* 2008; 14:1792-1798.
- 205.Chirila TV. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials* 2001; 22:3311-3317.
- 206-A.Iratxe Madarieta Pardo. Desarrollo de un nuevo material terapéutico para el tratamiento de desórdenes corneales. Tesis doctoral 2012. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad del País Vasco (UPV-EHU).
- 206-B.Garagorri N, Fermanian S, Thibault R, Ambrose WM, Schein OD, Chakravarti S, Elisseeff J. Keratocyte behavior in three-dimensional photopolymerizable poly (ethylene glycol) hydrogels. *Acta Biomater* 2008; 4:1139-4117.
- 207.Cruise GM, Scharp DS, Hubell JA. Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *Biomaterials* 1998; 19:1287-1294.
- 208.Peppas NA, Keys KB, Torres-Lugo M, Lowman AM. Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *J Control Release* 1999; 62:81-87.
- 209.Jose Antonio Muñoz Avila. Utilidad de la ingeniería tisular en el tratamiento de enfermedades corneales. Tesis doctoral 2006. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. ISBN: 978-84-3384012-7.
- 210.Bergmanson JG. Corneal damage in photokeratitis: why is it so painful? *Optom Vis Sci* 1990; 67:407-413.
- 211.Zingman S. Ocular light damage. *Photochem Photobiol* 1993; 57:1060-1068.
- 212.Kolozsvári L, Nográdi A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240-to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2165-2168.
- 213.Fatt I, Harris MG. The refractive index of the cornea as a function of thickness. *Am J Optom Physiol Opt* 1973; 50:383-368.
- 214.Fisher BT, Masiello KA, Goldstein MH, Hahn DW. Assesment of transient changes in corneal hydration using confocal Raman spectroscopy. *Cornea* 2003; 22:363-370.
- 215.Steinert RF, Storie B, Smith P, McDonald MB, van Rij G, Bores LD, Colin JP, Durrie DS, Kelley C, Price F Jr, Rostron C, Waring GO 3rd, Nordan LT. Hydrogel intracorneal lenses in aphakic eyes. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:135-141
- 216.Maurice DM. Nutritional aspects of corneal grafts and prosthesis. In *Corneo-Plastic Surgery Proceedings of the Second International Corneo-Plastic surgery Conference*. (London, 1967), Pergamon Press, New York 1969; 197-207.
- 217.Binder PS, Deg JK, Zavala EY, Grossman KR. Hydrogel keratophakia in non-human

- primates. *Curr Eye Res* 1981-1982; 1:535-542.
- 218.Sher JH, Dixon WS. Interlamellar refractive keratoplasty in rabbits. *Can J Ophthalmol* 1982; 17:116-120.
- 219.Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000; 21:2475-2490.
- 220.Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang LH, Langer R. Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm Res* 1991; 8:713-720.
- 221.Barca E, Herrero-Vanrell R, Díez A, Alvarez-Santiago C, López I, Calonge M. Downregulation of endotoxin-induced uveitis by intravitreal injection of polylactic-glycolic acid (PLGA) microspheres loaded with dexamethasone. *Exp Eye Res* 2009; 89:238-245.
- 222.Pan Q, Xu Q, Boylan NJ, Lamb NW, Emmert DG, Yang JC, Tang L, Heflin T, Alwadani S, Eberhart CG, Stark WJ, Hanes J. Corticosteroid-loaded biodegradable nanoparticles for prevention of corneal allograft rejection in rats. *J Control Release* 2015; 201:32-40.
- 223.Shell JW. Ophthalmic drug delivery systems. *Surv Ophthalmol* 1984; 29:117-128.
- 224.Haller JA, Kuppermann BD, Blumenkranz MS, Williams GA, Weinberg DV, Chou C, Whitcup SM; Dexamethasone DDS Phase II Study Group. Randomized controlled trial of an intravitreal dexamethasone drug delivery system in patients with diabetic macular edema. *Arch Ophthalmol* 2010; 128:289-296.
- 225.Haller JA, Bandello F, Belfort R Jr, Blumenkranz MS, Gillies M, Heier J, Loewenstein A, Yoon YH, Jacques ML, Jiao J, Li XY, Whitcup SM, OZURDEX GENEVA Study Group. Randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema due to retinal vein occlusion. *Ophthalmology* 2010; 117:1134-1146.
- 226.Allergan, Inc. Allergan receives FDA approval for Ozurdex as treatment option for noninfectious uveitis affecting the posterior segment of the eye 2010. Available online: <http://agn.client.shareholder.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=511060>
- 227.Lu Y, Fukuda K, Liu Y, Kumagai N, Nishida T. Dexamethasone inhibition of IL-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts in three-dimensional culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2998-3004.
- 228.Jue B, Maurice DM. The mechanical properties of the rabbit and human cornea. *J Biomech* 1986; 19:847-853.
- 229.Bitto LZ. Species differences in the responses of the eye to irritation and trauma: a hypothesis of divergence in ocular defense mechanisms and the choice of experimental animals for the eye research. *Exp Eye Res* 1984; 39:807-829.
- 230.Salamatrada A, Jabbarvand M, Hashemian H, Khodaparast M, Askarizadeh F. Histological and confocal changes in rabbit cornea produced by an intrastromal inlay made of hexafocon A. *Cornea* 2015; 34:78-81.
- 231.Alió JL, Mulet ME, Zapata LF, Vidal MT, De Rojas V, Javaloy J. Intracorneal inlay complicated by intrastromal epithelial opacification. *Arch Ophthalmol* 2004; 122:1441-1446.
- 232.McCarey BE, Storie BR, van Rij G, Knight PM. Refractive predictability of myopic hydrogel intracorneal lenses in nonhuman primate eyes. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:1310-1315.
- 233.Lindsey SS, McCulley JP, Cavanagh HD, Verity SM, Bowman RW, Petroll WM. Prospective evaluation of PermaVision intracorneal implants using in vivo confocal microscopy. *J Refract Surg* 2007; 23:410-413.
- 234.Salz JJ, Azen SP, Berstein J, Caroline P, Villasenor RA, Schanzlin DJ. Evaluation and comparison of sources of variability in the measurement of corneal thickness with ultrasonic and optical pachymeters. *Ophthalmic Surg* 1983; 14:750-754.
- 235.Reader 3rd AL, Salz JJ. Differences among ultrasonic pachymeters in measuring corneal thickness. *J Refract Surg* 1987; 3:7-11.
- 236.Petroll WM, Goldberg D, Lindsey SS, Kelley PS, Cavanagh HD, Bowman RW, Parmar DN, Verity SM, McCulley JP. Confocal assessment of the corneal response to intracorneal

- lens insertion and laser in situ keratomileusis with flap creation using IntraLase. *J Cataract Refract Surg* 2006; 32:1119-1128.
237. McLaren JW, Patel SV, Nau CB, Bourne WM. Automated assessment of keratocyte density in clinical confocal microscopy of the corneal stroma. *J Microsc* 2008; 229:21-31.
238. Twa MD, Giese MJ. Assessment of corneal thickness and keratocyte density in a rabbit model of laser in situ keratomileusis using scanning laser confocal microscopy. *Am J Ophthalmol* 2011; 152:941-953.
239. Ku JY, Niederer RL, Patel DV, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal analysis of keratocyte density in keratoconus. *Ophthalmology* 2008; 115:845-850.
240. McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Automated assessment of keratocyte density in stromal images from the ConfoScan 4 confocal microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51:1918-1926.
241. Ferrer M, Henriot S, Chamontin C, Lainé S, Mougél M. From Cells to Virus Particles: Quantitative Methods to Monitor RNA Packaging. *Viruses* 2016; 8.
242. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
243. Carlson EC, Liu CY, Chikama T, Hayashi Y, Kao CW, Birk DE, Funderburgh JL, Jester JV, Kao WW. Keratocan, a cornea-specific keratan sulfate proteoglycan, is regulated by lumican. *J Biol Chem* 2005; 280:25541-25547.
244. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 2010; 91:326-335.
245. Güell JL, Velasco F, Guerrero E, Gris O, Pujol J. Confocal microscopy of corneas with an intracorneal lens for hyperopia. *J Refract Surg* 2004; 20:778-782.
246. Parks RA, McCarey BE, Knight PM, Storie BR. Intrastromal crystalline deposits following hydrogel keratophakia in monkeys. *Cornea* 1993; 12:29-34.
247. Beekhuis WH, McCarey BE, van Rij G, Waring GO 3rd. Complications of hydrogel intracorneal lenses in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1987; 105:116-122.
248. McDonald MB, McCarey BE, Storie B, Beuerman RW, Salmeron B, van Rij G, Knight PM. Assessment of the long-term corneal response to hydrogel intrastromal lenses implanted in monkey eyes for up to five years. *J Cataract Refract Surg* 1993; 19:213-222.
249. BenEzra D. Neovascuogenic ability of prostaglandins, growth factors, and synthetic chemoattractants. *Am J Ophthalmol* 1978; 86:455-461.
250. Robin JB, Regis-Pacheco LF, Kash RL, Schanzlin DJ. The histopathology of corneal neovascularization. Inhibitor effects. *Arch Ophthalmol* 1985; 103:284-287.
251. Phillips K, Arffa R, Cintron C, Rose J, Miller D, Kublin CL, Kenyon KR. Effects of prednisolone and medroxyprogesterone on corneal wound healing, ulceration, and neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1983; 101:640-643.
252. Gatinel D, El Danasoury A, Rajchles S, Saad A. Recentration of a small aperture corneal inlay. *J Cataract Refract Surg* 2012; 38:2186-2191.
253. Yılmaz OF, Alagöz N, Pekel G, Azman E, Aksoy EF, Cakır H, Bozkurt E, Demirok A. Intracorneal inlay to correct presbyopia: Long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2011; 37:1275-81.
254. Shoukri MM, Measures of Interobserver Agreement. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton, FL, USA. 2004
255. Kramer MS, Feinstein AR, Clinical Bioestatistics LIV. The biostatistic of Concordance. *Clin Pharmacol Ther*; 1981:11-123.
256. Bland J, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1:307-310.
257. Williams R, Fink BA, King-Smith PE, Mitchell GL. Central corneal thickness measurements: using an ultrasonic instrument and 4 optical instruments. *Cornea* 2011; 30:1238-1243.
258. 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.
259. Pisella PJ, Auzeur O, Bokobza Y, Debbasch C, Baudouin C. Evaluation of corneal stromal changes in vivo after laser in situ keratomileusis with confocal microscopy. *Ophthalmology* 2001; 108:1744-1750.
260. Abdelkader A, Elewah el-SM, Kaufman HE. Confocal microscopy of corneal wound healing after deep lamellar keratoplasty in rabbits. *Arch Ophthalmol* 2010; 128:75-80.
261. Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, Meyer-Lindenberg A, Nolte I, Junghans C, Guthoff R, Stachs O. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Curr Eye Res* 2010; 35:1072-1080.
262. Petroll WM, Boettcher K, Barry P, Cavanagh HD, Jester JV. Quantitative assessment of anteroposterior keratocyte density in the normal rabbit cornea. *Cornea* 1995; 14:3-9.
263. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Corneal keratocyte deficits after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2006; 141:799-809.
264. Ali Javadi M, Kanavi MR, Mahdavi M, Yaseri M, Rabiei HM, Javadi A, Sajjadi SH. 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.
265. Vesaluoma M, Pérez-Santonja J, Petroll WM, Linna T, Alió J, Tervo T. Corneal stromal changes induced by myopic LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:369-376.
266. Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996; 62:325-327.
267. Kobayashi A, Mawatari Y, Yokogawa H, Sugiyama K. In vivo laser confocal microscopy after descemet stripping with automated endothelial keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2008; 145:977-985.
268. Avunduk AM, Senft CJ, Emerah S, Varnell ED, Kaufman HE. Corneal healing after uncomplicated LASIK and its relationship to refractive changes: a six-month prospective confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:1334-1339.
269. Perez-Gomez I, Efron N. Confocal microscopic evaluation of particles at the corneal flap interface after myopic laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2003; 29:1373-1377.
270. Dawson DG, Holley GP, Geroski DH, Waring GO 3rd, Grossniklaus HE, Edelhauser HF. Ex vivo confocal microscopy of human LASIK corneas with histologic and ultrastructural correlation. *Ophthalmology* 2005; 112:634-644.
271. Crawford GJ, Chirila TV, Vijayasekaran S, Dalton PD, Constable J. Preliminary evaluation of a hydrogel core-and-skirt keratoprosthesis in the rabbit cornea. *J Refract Surg* 1996; 12:125-129.
272. Xie RZ, Evans MD, Bojarski B, Hughes TC, Chan GY, Nguyen X, Wilkie JS, McLean KM, Vannas A, Sweeney DF. Two-year preclinical testing of perfluoropolyether polymer as a corneal inlay. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:574-581.
273. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Ramirez M, Hodge DO, Maguire LJ, Bourne WM. Effect of myopic laser in situ keratomileusis on epithelial and stromal thickness: a confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2002; 109:1447-1452.
274. Kato T, Nakayasu K, Hosoda Y, Watanabe Y, Kanai A. Corneal wound healing following laser in situ keratomileusis (LASIK): a histopathological study in rabbits. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:1302-1305.
275. Samples JR, Binder PS, Zavala EY, Baumgartner SD, Deg JK. Morphology of hydrogel implants used for refractive keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 25:843-850.

-
276. McCarey BE, Andrews DM, Hatchell DL, Pederson H. Hydrogel implants for refractive keratoplasty: corneal morphology. *Curr Eye Res* 1982; 2:29-38.
277. Peiffer RL, Werblin TP, Fryczkowski AW. Pathology of corneal hydrogel alloplastic implants. *Ophthalmology* 1985; 92:1294-1304.
278. Maurice DM. The biology of wound healing in the corneal stroma. *Cornea* 1987; 6:162-168.
279. Assil KK, Quantock AJ. Wound healing in response to keratorefractive surgery. *Surv Ophthalmol* 1993; 38:289-302.
280. Yamaguchi T, Friedlander MH, Kimura T, Koenig SB, Kaufman HE. The ultrastructure of well-healed lenticules in keratomileusis. *Ophthalmology* 1983; 90:1495-1506.
281. Bornfeld N, Hoffmann F, Mellin KB, el Hifnawi ES, Waubke TN. Ultrastructure of the rabbit corneal stroma after experimental keratomileusis. *Arch Ophthalmol* 1986; 104:253-258.
282. Farooqui N, Myung D, Koh W, Masked M, Dalal R, Carrasco MR, Noolandi J, Frank CW, Ta CN. Histological Processing of pH-Sensitive Hydrogels Used in Corneal Implant Applications. *Journal of histotechnology* 2007; 30:157-163.
283. James R, Jenkins L, Ellis SE, Burg KJL. Histological processing of hydrogel scaffolds for tissue-engineering applications. *J Histotechnol* 2004; 27:133-139.
284. Webster SS, Jenkins L, Burg KJL. Histological techniques for porous, absorbable, polymeric scaffolds used in tissue engineering. *J Histotechnol* 2003; 26:57-65.
285. National Toxicology Program.
https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/special_senses/eye/crvac/index.htm
286. Yamaguchi T, Koenig SB, Hamano T, Kimura T, Santana E, McDonald MB, Kaufman HE. Electron microscopic study of intrastromal hydrogel implants in primates. *Ophthalmology* 1984; 91:1170-1175
287. Fromer CH, Klintworth GK. An evaluation of the role of leukocytes in the pathogenesis of experimentally induced corneal vascularization: III. Studies related to the vasoproliferative capability of polymorphonuclear leukocytes. *Am J Pathol* 1976; 82:157-170.
288. Berman M, Winthrop S, Auspring D, Rose J, Langer R, Gage J. Plasminogen activator (urokinase) causes vascularization of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 22:191-199.
289. Vijayasekaran S, Fitton JH, Hicks CR, Chirila TV, Crawford GJ, Constable IJ. Cell viability and inflammatory response in hydrogel sponges implanted in the rabbit cornea. *Biomaterials* 1998; 19: 2255-2267.
290. Robb RM, Kuwabara T. Corneal wound healing. *Arch Ophthalmol* 1962; 68:636-642.
291. Emonard H, Grimaud JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Cell Mol Biol* 1990; 36:131-153.
292. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE. Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1996; 6:391-411.
293. Fitton JH, Ziegelaar BW, Hicks CR, Clayton AB, Crawford GJ, Constable IJ, Chirila TV. Assessment of anticollagenase treatments after insertion of a keratoprosthesis material in the rabbit cornea. *Cornea* 1998; 17:108-114.
294. Lu Y, Fukuda K, Liu Y, Kumagai N, Nishida T. Dexamethasone inhibition of IL-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts in three-dimensional culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2998-3004.
295. Payne MS, Horbett TA. Complement activation by hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers. *J Biomed Mater Res* 1987; 21:843-859.
296. Hedblom EE. The role of polysaccharides in corneal swelling. *Exp Eye Res* 1961; 1:81-91.
297. Tasheva ES, Funderburgh JL, Funderburgh ML, Corpuz LM, Conrad GW. Structure and

-
- sequence of the gene encoding human keratocan. *DNA Seq* 1999; 10:67-74.
298. Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:276-283.
299. Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res* 2001; 72:33-39.
300. Hanna KD, Pouliquen Y, Waring GO 3rd, Savoldelli M, Cotter J, Morton K, Menasche M. Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol* 1989; 107:895-901.
301. Lance SE, Capone A Jr, SundarRaj N, Roat MI, Thoft RA. Diamond burring and surgical keratectomy. Morphologic comparison in the rabbit. *Arch Ophthalmol*. 1988; 106:830-834.
302. Lee RE, Davison PF, Cintron C. The healing of linear nonperforating wounds in rabbit corneas of different ages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 23:660-665.
303. Sundarraj N, Fite D, Belak R, Sundarraj S, Rada J, Okamoto S, Hassell J. Proteoglycan distribution during healing of corneal stromal wounds in chick. *Exp Eye Res* 1998; 67:433-442.
304. Ljubimov AV, Alba SA, Burgeson RE, Ninomiya Y, Sado Y, Sun TT, Nesburn AB, Kenney MC Maguen E. Extracellular matrix changes in human corneas after radial keratotomy. *Exp Eye Res* 1998; 67:265-272.
305. Dawson DG, Kramer TR, Grossniklaus HE, Waring GO 3rd, Edelhauser HF. Histologic, ultrastructural, and immunofluorescent evaluation of human laser-assisted in situ keratomileusis corneal wounds. *Arch Ophthalmol* 2005; 123:741-756.