

Características *in vivo* del epitelio corneal *versus* magnitud del defecto refractivo, posterior a tratamiento con láser de excímeros

In vivo characteristics of the corneal epithelium vs size of the refractive error after Excimer laser treatment

Dr. Eduardo Rojas Álvarez,^I Dra. Janet González Sotero,^I Dra. Iramis Miranda Hernández,^{II} Dra. Ariadna Pérez Ruiz^I

^I Centro Oftalmológico de Pinar del Río. Cuba.

^{II} Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: describir las características *in vivo* del epitelio corneal y su relación con la magnitud del defecto refractivo tratado posterior al tratamiento quirúrgico de LASIK.

Método: estudio descriptivo, prospectivo-longitudinal con 24 pacientes (48 ojos) con astigmatismo miópico intervenidos con el ESIRIS (Schwind-Alemania) por la técnica quirúrgica LASIK con microquerátomo pendular. Se analizaron los resultados a partir de técnicas de estadística descriptiva. Se utilizó el microscopio confocal ConfoScan 4 de NIDEK para la obtención y estudio de las imágenes *in vivo* de tejido corneal.

Resultados: el grosor epitelial central medio en el preoperatorio fue 34,7 μm , a los 7 días del posoperatorio hubo un incremento del 36 % en pacientes con defectos refractivos inferiores a 4D y un incremento del 44 % en pacientes con defectos refractivos de 4 D o más. El promedio de densidad de células del epitelio basal a los 7 días fue de 5 098,3 \pm 1 654 células/mm², tuvo variaciones mínimas inferiores a la unidad porcentual durante la etapa de estudio.

Conclusiones: existió incremento del grosor epitelial posterior a LASIK que fue superior en defectos refractivos mayores de 4 dioptrías. La densidad celular del epitelio basal no tuvo variaciones significativas y fue independiente a la magnitud del defecto refractivo tratado.

Palabras clave: epitelio corneal, LASIK, microscopía confocal, defecto refractivo.

ABSTRACT

Objective: to describe the *in vivo* characteristics of the corneal epithelium and their association with the size of the treated refractive defect after LASIK.

Methods: a prospective, longitudinal and descriptive study of 24 patients (48 eyes) with myopic astigmatism, who were operated on by using ESIRIS (Schwind-Germany) and LASIK technique with pendular microkeratome. Summary statistic techniques served to analyze results. NIDEK 's ConfoScan 4 microscope was used to obtain and to study *in vivo* corneal tissue images.

Results: mean central epithelial thickness measured in the preoperative stage was 34.7 μm , but increased by 36% seven days after surgery in patients with refractive defects fewer than 4D and by 44% in patients with refractive defects equal to or over 4D. The average cell density of the basal epithelium 7 days postoperatively was 5 098.3 \pm 1 654 cell/mm² and showed minimal changes below 1% during the study period.

Conclusions: the central corneal epithelium thickness increased after LASIK surgery and it was higher in refractive defects over 4D. Cell density of the basal epithelium did not show significant changes and was not associated to the size of the treated refractive defect.

Keywords: corneal epithelium, LASIK, confocal microscopy, refractive defect.

INTRODUCCIÓN

Es innegable el éxito actual del LASIK en cuanto a resultados visuales, rapidez de recuperación y mínimas posibilidades de complicaciones trans y postquirúrgicas, sin embargo, al formar mediante corte automatizado una lamela corneal de espesor determinado modifica la estructura morfológica de la córnea y crea una nueva arquitectura corneal, que aunque logre altos estándares de visión en los pacientes, debe ser tenida en cuenta la respuesta cicatrizal a este proceder: las modificaciones que se producen a nivel microscópico en córneas que han recibido este tratamiento, factor de extrema importancia pues representa una variable determinante para valorar la seguridad, efectividad y predictibilidad de esta tecnología.

A nivel internacional varios investigadores han publicado los cambios microscópicos posteriores a tratamiento con LASIK, específicamente las modificaciones del grosor corneal, nervios corneales, células del estroma y endotelio corneal, entre otros. Sin embargo, el epitelio corneal no ha sido ampliamente estudiado. La actual investigación se realizó con el objetivo de describir las características *in vivo* del epitelio corneal y su relación con la magnitud del defecto refractivo tratado posterior a LASIK.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo-longitudinal con 24 pacientes (48 ojos) con astigmatismo miópico intervenidos con el ESIRIS (Schwind-Alemania) por la técnica quirúrgica LASIK con microquerátomo pendular, programación por ORK-CAM

para tratamientos esféricos con grosor del flap de 160 μm , lecho estromal residual mayor de 300 μm y zona óptica de 6,50 mm.

Se utilizó el microscopio confocal ConfoScan 4 de NIDEK para la obtención y estudio de las imágenes *in vivo* de tejido corneal. Se acopló el anillo Z para la fijación del globo ocular con el lente 40 x. Se programó en modo auto, con fijación central, velocidad de adquisición de la imagen a 25 fps, magnificación de 500 X, resolución lateral de 0,6 $\mu\text{m}/\text{pix}$, con 350 imágenes por *scan*, distancia de trabajo de 1,98 mm. Cada imagen obtenida se encontraba separada de la imagen adyacente por 4 micras, una profundidad de campo de 25 μm , nivel de intensidad de 0 a 255, presión del anillo Z de 20 %.

Se realizó microscopia confocal de la córnea en el preoperatorio, a los 7 días, 1 mes, 3 meses y 6 meses de la cirugía. Se utilizó la microscopia confocal cuantitativa de enfoque completo (curva CMTF) seleccionando el *scan* y las imágenes de mayor estabilidad en cuanto a posición y presión aplicada por el anillo Z. Se realizaron los exámenes necesarios en cada paciente hasta obtener escaneos e imágenes de máxima estabilidad en cuanto a presión aplicada por el anillo Z con variaciones inferiores al 10 %, representado por la curva amarilla (Fig. 1). Todas las tomas pertenecieron a los 4 mm centrales de la córnea. Ninguno de los sujetos experimentó síntomas visuales o complicaciones corneales durante o con posterioridad al examen. Las imágenes seleccionadas no fueron modificadas en brillo y contraste, fueron codificadas para realizar el análisis sin conocer el momento posoperatorio y la magnitud de la ametropía tratada. El análisis fue realizado con el *software* NAVIS.

Se analizaron los resultados a partir de técnicas de estadística descriptiva (proporción, porcentaje), se respetaron los aspectos éticos correspondientes cumpliendo con la Declaración de Helsinki y quedaron definidas las variables siguientes:

- Grosor epitelial central: Medido desde la primera imagen de epitelio corneal apical hasta la imagen de plexo nervioso subbasal, expresado en micras.
- Imagen de epitelio corneal apical: Definida como capa de células poligonales con núcleo brillante, citoplasma homogéneo, bordes definidos.
- Imagen del plexo nervioso subbasal: Definida con presencia de fibras nerviosas que contrastan sobre el fondo oscuro, finas, brillantes, distribuidas de forma paralela u oblicua con diversas bifurcaciones que se conectan entre sí (Fig. 2A).
- Densidad de células del epitelio basal: Determinada por método manual, expresada en células/ mm^2 . Se seleccionó la imagen de epitelio corneal basal. En un área rectangular (A) de 0,0500 mm^2 fue marcada cada célula para prevenir doble conteo. Las células interceptadas por los límites del área fueron contadas solo en el sector superior y nasal. Se definió N como el número de células contadas en un área (A). La densidad fue expresada en células por milímetros cuadrados, obteniendo el cociente entre N y A, expresada en células/ $\text{mm}^2 \pm$ desviación estándar (DE).
- Imagen de epitelio corneal basal: Definida como capa de células con citoplasma homogéneo más oscuro que carecen de núcleo y bordes definidos. (Fig. 2 B y C).

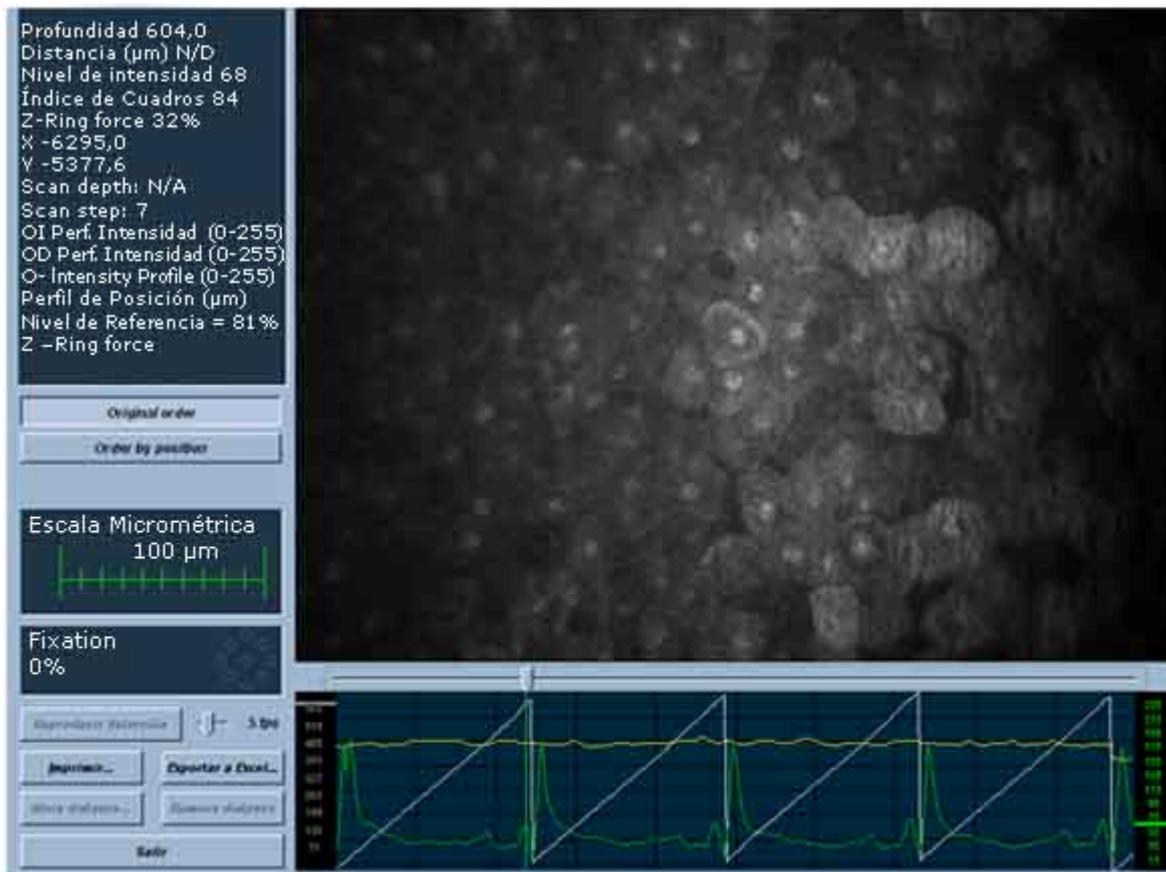


Fig. 1. Imagen de epitelio corneal apical en microscopia confocal de enfoque completo (CMTF) para estudio de grosor epitelial a los 7 días de LASIK. Nótese la forma poligonal, con citoplasma homogéneo y núcleo brillante distinguible, además la calidad del scan en cuanto a presión y posición del anillo Z (curva amarilla, curva blanca).

La muestra fue dividida en 2 grupos: pacientes con equivalente esferocilíndrico (EEC) menor de 4 dioptrías (14 pacientes) y pacientes con EEC de 4 o más dioptrías (10 pacientes).

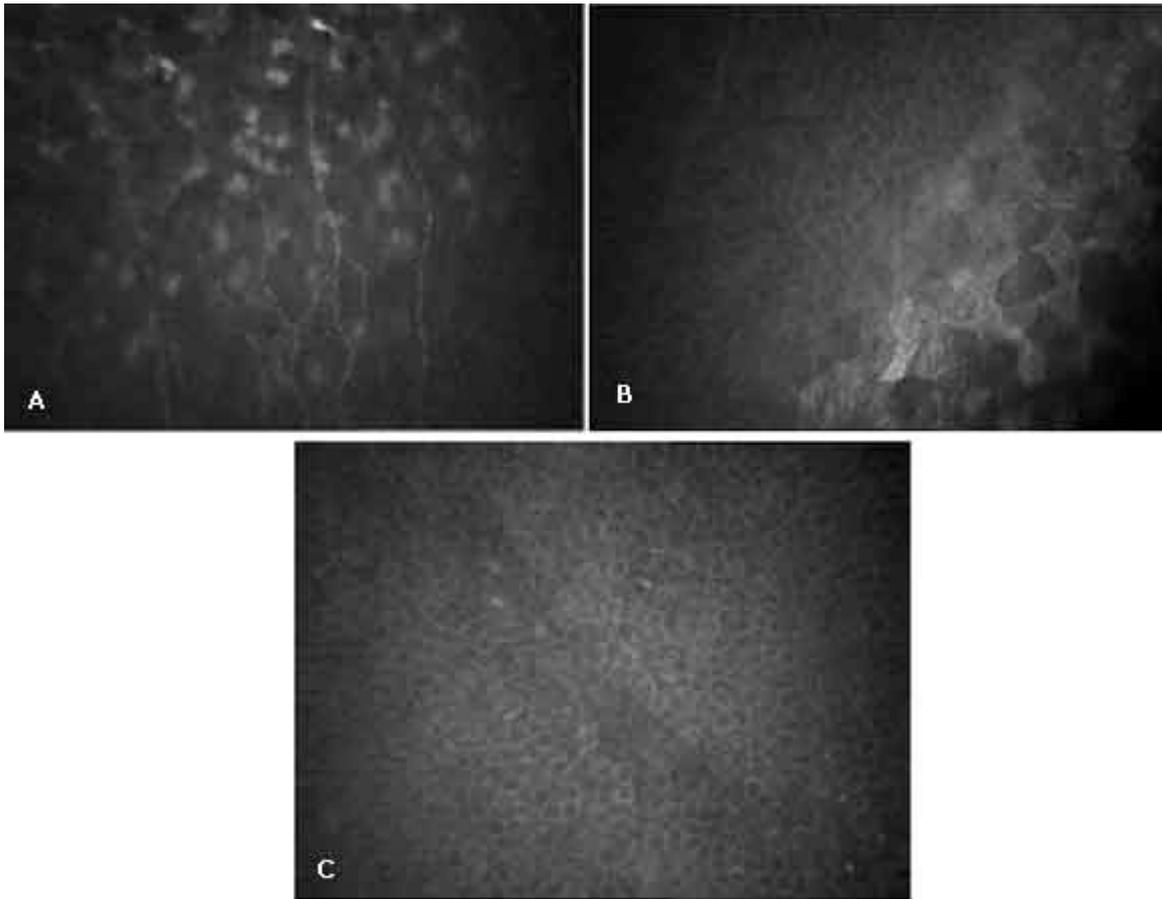


Fig. 2. A: Imagen del plexo nervioso subbasal a los 6 meses de LASIK. Nótese las fibras nerviosas que contrastan sobre el fondo oscuro, finas, brillantes, distribuidas de forma paralela u oblicua con diversas bifurcaciones que se conectan entre sí. B: Imagen al mes de LASIK que muestra transición entre el epitelio basal y el epitelio intermedio, nótese que el epitelio intermedio mantiene la forma celular del epitelio apical pero ya existe ausencia de núcleo celular. C: Imagen del epitelio basal con células anucleadas a 3 meses de LASIK, bordes muy bien definidos y citoplasma homogéneo.

RESULTADOS

El grosor epitelial central medio en el preoperatorio fue 34,7 μ m existiendo a los siete días del posoperatorio un incremento del 36 % en pacientes con defectos refractivos inferiores a 4 D y un incremento de 44 % en pacientes con defectos refractivos de 4 D o más, siendo mayor el aumento en este grupo. Hasta los tres meses de posoperatorio existió una disminución paulatina del grosor epitelial central para mantener valores estables entre los tres y seis meses de la cirugía donde se obtuvieron grosores muy similares al preoperatorio en ambos grupos. (tabla 1).

Tabla 1. Grosor corneal central (μm) posterior a LASIK

EE	Preop.	7 días	1 mes	3 meses	6 meses
Menor 4 D	34,3	46,7	42,3	35,2	34,8
Variación porcentual*		+36,1	+23,2	+2,6	+1,4
4 D o más	35,1	50,7	44,7	37,7	36,6
Variación porcentual*		+44,4	+27,4	+7,4	+4,3

*Respecto al valor preoperatorio. Preop: preoperatorio.

El promedio de densidad de células del epitelio basal a los siete días fue de $5\,098,3 \pm 1\,654$ células/ mm^2 , tuvo variaciones mínimas inferiores a la unidad porcentual durante la etapa de estudio, comportándose de forma similar en ambos grupos. (tabla 2).

Tabla 2. Densidad células del epitelio basal (cél/ mm^2)

EE	Preop.	7 días	1 mes	3 meses	6 meses
Menor 4 D	5 932,6 $\pm 1\,024$	5 894,7 $\pm 1\,834$	5 905,1 $\pm 1\,342$	5 926,9 $\pm 1\,987$	5 896,3 $\pm 2\,023$
Variación porcentual*		-0,64	-0,46	-0,09	-0,61
4 D o más	5 921,5 $\pm 2\,336$	5 902,9 $\pm 1\,894$	5 899,3 $\pm 2\,331$	5 928,4 $\pm 1\,876$	5 964,1 $\pm 1\,896$
Variación porcentual*		-0,33	-0,37	+0,12	+0,72

*Respecto al valor preoperatorio. Preop: preoperatorio.

DISCUSIÓN

El epitelio corneal no recibe la ablación del láser de excímeros con el consiguiente efecto fotoablativo, sin embargo, no está exento del *stress* morfológico que sufren las estructuras adyacentes al estroma corneal. Durante el LASIK con microquerátomo pendular se produce el corte del epitelio corneal casi en la totalidad del perímetro circular excepto a nivel de la bisagra, dicho corte afecta de alguna forma la homeostasis del tejido epitelial e incluye las subcapas del mismo, la membrana basal y el plexo nervioso subbasal.

Varios estudios atribuyen el incremento del grosor epitelial en la primera semana a edema del epitelio.¹⁻³ El proceso de succión y la elevación transitoria de la presión intraocular produce edema corneal transoperatorio subclínico donde la subcapa epitelial es la más afectada. A nivel microscópico se producen cambios inflamatorios epiteliales que persisten en el posoperatorio inmediato.⁴⁻⁶

Uno de los pasos decisivos en esta técnica quirúrgica es la succión. El anillo de succión realiza tres funciones: fijación del globo, elevación de la presión intraocular para hacer posible una queratectomía de espesor uniforme y un riel para guiar el desplazamiento de la cabeza del microquerátomo. Para la realización de un corte altamente satisfactorio, la presión intraocular debe alcanzar los 65 mmHg o valores superiores.

La hidratación de la córnea es el resultado de la presión de hidratación estromal, la función de barrera del epitelio y endotelio, la bomba endotelial, la evaporación del

film lagrimal y la presión intraocular. La tendencia a edematizarse de una córnea se debe a la resultante entre la presión de edema, es decir, la tendencia a retener agua por el estroma debido a las cargas negativas de glucosaminos, fenómeno que se ve contrarrestado por el aumento de la presión intraocular.³⁻⁵ El aumento transitorio de este parámetro durante el LASIK, hace que se exceda la presión de edema y se produzca imbibición de agua desde el humor acuoso. El factor presión favorece la aparición de edema epitelial transquirúrgico subclínico que se mantiene en la primera etapa del posoperatorio y coadyuva al aumento de grosor epitelial.

Posterior al proceso de succión, al formarse el flap, se produce el corte del epitelio corneal casi en la totalidad del perímetro circular, excepto a nivel de la bisagra. Este corte produce una herida epitelial regular y curvilínea; posteriormente, al recolocar el flap a su posición original, los bordes epiteliales afrontan entre sí. Como ocurre con otros epitelios planos estratificados, las células se encuentran conectadas por prolongaciones interdigitadas unidas por desmosomas. Como es una lesión menor las células epiteliales vecinas por deslizamiento llenan el defecto.^{4, 5}

Durante la técnica quirúrgica se realiza el secado de este borde durante dos minutos, lo que garantiza el inicio del proceso de reparación. El epitelio es un denso entramado intercelular que le permite resistir a esta noxa sin cicatrizar con una elevada capacidad de regeneración. A las 24 horas del proceder, en el primer examen clínico y biomicroscópico posoperatorio, a pesar de que el epitelio fue seccionado, el paciente no presenta signos o síntomas de causa epitelial, lo que justifica que no existen áreas con ausencia del mismo.

El proceso de corte de cualquier tejido, en este caso con una cuchilla insertada en el microquerátomo pendular, desencadena respuesta celular local con el consiguiente edema de origen inflamatorio. A las 24 horas posteriores a LASIK, se ha documentado adhesión y extravasación de leucocitos en los vasos conjuntivales, lo que corresponde con las recientes observaciones en humanos. Cerca del limbo, estas células inflamatorias se organizan en largas hileras indicando migración direccional a lo largo de la incisión con el microquerátomo. La dirección migracional y la acumulación de leucocitos próximos al corte del flap, sugieren que citoquinas proinflamatorias están presentes en esta región.¹⁻⁴

La localización del corte es periférica; sin embargo, el epitelio corneal se comporta como unidad anatómica y funcional. La respuesta a esta noxa se refleja en el tejido en su totalidad, por lo que considero que el factor corte epitelial es otro de los factores transoperatorios que influyen en el aumento de grosor corneal posterior a LASIK.

Desde el punto de vista farmacológico los colirios instilados antes, durante y después de la cirugía llegan al *film* lagrimal pre-epitelial penetrando absolutamente a través del epitelio corneal por difusión simple, más aún si el fármaco utilizado es liposoluble, como la mayoría de los que se utilizan en este tipo de proceder. El epitelio corneal bajo medicación tópica posee características diferentes a las habituales en cuanto a actividad metabólica formando parte del proceso farmacocinético del medicamento instilado.⁶⁻⁸

El epitelio corneal constituye una capa continua de membranas plasmáticas debido a la unión de sus células por zónulas ocludens. Las drogas lipofílicas traspasan el epitelio con facilidad, ya que sus membranas plasmáticas están compuestas por fosfolípidos. Debido a que el epitelio corneal posee más de las dos terceras partes de las membranas plasmáticas de la córnea, este es el lugar de mayor depósito para drogas lipofílicas. Además, influye en el grosor epitelial la elevada frecuencia de aplicación de colirios en el primer mes de posoperatorio que refuerza el factor

farmacológico, presente en la técnica LASIK, donde el epitelio está íntegro a las 24 horas del proceder.⁷⁻¹⁰

Los cambios de grosor epitelial que se mantienen posteriormente se deben a hiperplasia del tejido y han sido documentados hasta 7 años posteriores al LASIK. Además dichos cambios se han relacionado con el tipo y magnitud de defecto refractivo. La magnitud del grosor epitelial se incrementa con el aumento de la profundidad de la ablación. El modelo teórico-matemático desarrollado por Huang simula la migración epitelial posterior a cirugía refractiva corneal con láser, el mismo predice el grosor epitelial central después de la ablación miópica.¹¹

En la hipermetropía Reinstein obtiene una diferencia de 10 µm de grosor entre epitelio temporal y nasal, el epitelio central fue fino y el epitelio paracentral grueso para correcciones hipermetrópicas elevadas, plantea que esto compensa el tejido estromal removido por la ablación hipermetrópica y que el adelgazamiento central es compensado por el incremento de la curvatura corneal central.¹²

Por otra parte varios estudios han señalado la influencia de esta hiperplasia epitelial en los cambios refractivos posteriores a LASIK. El cambio de grosor epitelial entre el pre y posoperatorio afecta el poder refractivo del epitelio, el incremento del grosor epitelial central en el vértice corneal pudiera explicar la miopía descrita en periodos tempranos posteriores a LASIK.^{13, 14}

Un incremento de 10 µm de grosor epitelial resulta en una dioptría de regresión, factores mecánicos y terapéuticos controlan la hiperplasia epitelial. Las modificaciones del epitelio corneal juegan un rol en el resultado refractivo final, sin embargo se han producido cambios refractivos entre el mes y el año, cuando ya el grosor epitelial se encuentra estabilizado, por lo que pudiera pensarse que en la regresión miópica posterior a LASIK no solo influyen los cambios epiteliales.^{15,16}

En el actual estudio no existió regresión refractiva manifiesta debido a que la magnitud de la ametropía tratada no excedió las ocho dioptrías de ablación, y por tanto, el efecto del Láser Excímer, en el grosor epitelial, es menor y menos duradero que en estudios foráneos donde se han realizado ablaciones de hasta 12 dioptrías, que indudablemente, tienen mayor efecto en el tejido corneal.

El epitelio basal que funcionalmente se caracteriza por la actividad mitótica y la consecuente renovación de estratos más superficiales requiere de estudios que lo relacionen con la hiperplasia epitelial descrita, hasta el momento no existe relación entre la densidad celular a este nivel y la magnitud del defecto refractivo tratado.^{17, 18}

Las diferencias existentes entre los autores se deben fundamentalmente al modelo de microscopio confocal utilizado, sus lentes objetivos, resoluciones axiales y laterales, distancias de trabajo, entre otros aspectos, los cuales influyen notablemente en el contraste de las imágenes, su resolución y posterior análisis. De forma general coincidimos con los resultados obtenidos por Erie y Patel (tabla 3).

Se hacen necesarios estudios multicéntricos a largo plazo con mayor cantidad de pacientes, donde se profundicen y relacionen los cambios epiteliales con el tipo de defecto refractivo, meridiano tratado, diámetro de la zona óptica, cambios en limbo esclerocorneal y margen del flap, aberraciones corneales, así como la profundización en la regresión refractiva de causa epitelial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Ramirez M, Hodge DO, Maguire LJ, et al. Effect of myopic laser in situ keratomileusis on epithelial and stromal thickness: a confocal microscopy study. *Ophthalmology*. 2002;109(8):1447-52.
2. Morishige N, Takahashi N, Chikamoto N, Nishida T. Quantitative evaluation of corneal epithelial edema by confocal microscopy. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2009;37(3):249-53.
3. Hjortdal J, Moller-Pedersen T, Ivarsen A, Ehlers N. Corneal power, thickness, and stiffness: results of a prospective randomized controlled trial of PRK and LASIK for myopia. *J Cataract Refract Surg*. 2005;31(1):21-9.
4. LaGier AJ, Yoo SH, Alfonso EC, Meiners S, Fini ME. Inhibition of human corneal epithelial production of fibrotic mediator TGF- β_2 by basement membranelike extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(3):1061-71.
5. Fournie PR, Gordon GM, Dawson DG, Edelhauser HF, Fini ME. Correlations of long-term matrix metalloproteinase localization in human corneas after successful laser-assisted in situ keratomileusis with minor complications at the flap margin. *Arch Ophthalmol*. 2008;126(2):162-70.
6. Jung JC, Huh MI, Fini ME. Constitutive collagenase-1 synthesis through MAPK pathways is mediated, in part, by endogenous IL-1 during fibrotic repair in corneal stroma. *J Cell Biochem*. 2007;102(2):453-62.
7. Patel SV, Erie JC, McLaren JW, Bourne WM. Confocal microscopy changes in epithelial and stromal thickness up to 7 years after LASIK and photorefractive keratectomy for myopia. *J Refract Surg*. 2007;23(4):385-92.
8. Reinstein DZ, Silverman RH, Raevsky T, Simoni GJ, Lloyd HO, Najafi DJ et al. Arc-scanning very high-frequency digital ultrasound for 3D pachymetric mapping of the corneal epithelium and stroma in laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg*. 2000;16(4):414-30.
9. Reinstein DZ, Archer TJ, Gobbe M, Silverman RH, Coleman DJ. Epithelial thickness in topography of the normal cornea: threedimensional display with Artemis very high-frequency digital ultrasound. *J Refract Surg*. 2008;24(6):571-81.
10. Moilanen JA, Holopainen JM, Vesaluoma MH, Tervo TM. Corneal recovery after LASIK for high myopia: a 2-year prospective confocal microscopic study. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(10):397-402.
11. Huang D, Tang M, Shekhar R. Mathematical model of corneal surface smoothing after laser refractive surgery. *Am J Ophthalmol*. 2003;135(3):267-78.
12. Reinstein DZ, Archer TJ, Silverman RH, Coleman J. Epithelial Thickness After Hyperopic LASIK: Three-dimensional Display With Artemis Very High-frequency Digital Ultrasound. *J Refract Surg*. 2010;26(6):555-64.
13. Ivarsen A, Fledelius W, Hjortdal JO. Three year changes in epithelial and stromal thickness after PRK or LASIK for high miopía. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(5):2061-6.

14. Reinstein DZ, Srivannaboon S, Gobbe M, Archer TJ, Silverman RH, Sutton H, et al. Epithelial Thickness Profile Changes Induced by Myopic LASIK as Measured by Artemis very High-frequency Digital Ultrasound. J Refract Surg. 2009;25(5):444-50.
15. Spadea L, Fasciani R, Necozone S, Balestrazzi E. Role of the corneal epithelium in refractive changes following laser in situ keratomileusis for high myopia. J Refract Surg. 2000;16(2):133-9.
16. Reinstein DZ, Ameline B, Puech M, Montefi G, Laroche L. VHF digital ultrasound three-dimensional scanning in the diagnosis of myopic regression after corneal refractive surgery. J Refract Surg. 2005;21(5):480-4.
17. Tanioka H, Hieda O, Kawasaki S, Nakai 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 (7):1195-200.
18. Kaufman SC, Kaufman HE. How has confocal microscopy helped us in refractive surgery? Curr Opin Ophthalmol. 2006;17(4):380-8.

Recibido: 28 de mayo de 2012.
Aprobado: 1 de enero de 2013.

Dr. Eduardo Rojas Álvarez. Hospital Provincial "Abel Santamaría Cuadrado", km 3 ½ Carretera central. Pinar del Río, Cuba. Correo electrónico: dr_erojas@princesa.pri.sld.cu