

Láser excimer y microscopia confocal: plataformas tecnológicas de la visión del futuro

Excimer laser and confocal microscopy: technological platforms of the future vision

Dr. Eduardo Rojas Alvarez y Dra. Janet González Sotero

Hospital General Docente "Abel Santamaría Cuadrado", Pinar del Río, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la Cirugía Refractiva es una subespecialidad de la Oftalmología, encargada de los procedimientos quirúrgicos dirigidos al tratamiento de los defectos refractivos.

Objetivos: explicar los principios generales de funcionamiento de la microscopia confocal de la córnea, describir las características microscópicas de la córnea normal por microscopia confocal y enunciar los aspectos teóricos generales relacionados con la tecnología láser excimer.

Desarrollo: la microscopia confocal es un método no invasivo para el estudio de imágenes microscópicas en tejidos vivos, donde la iluminación y la detección se encuentran en el mismo plano focal; además, la luz se refleja y pasa a través de un segundo lente objetivo. El láser excimer utiliza pulsos controlados de energía de luz ultravioleta de 193 nm de longitud de onda para aplicar ablación sobre el tejido estromal, lo cual produce un patrón de excisión refractivo y genera nuevos radios de curvatura. Asimismo, el término excimer es una forma química diatómica singular que solo existe en estado excitado y durante un tiempo minúsculo.

Conclusiones: el estudio de la córnea por microscopia confocal permite la diferenciación de las subcapas del epitelio, el plexo nervioso subbasal, los queratocitos y nervios del estroma, así como las células del endotelio corneal. El láser excimer, posibilita el moldeamiento de la curvatura corneal, con vistas a lograr un resultado refractivo con mínimas alteraciones al tejido circundante; por tanto, a escala internacional, se ha convertido en la técnica quirúrgica prevaleciente para el tratamiento de las ametropías.

Palabras clave: córnea, microscopia confocal, láser excimer.

ABSTRACT

Introduction: Refractive surgery is a subspecialty of the ophthalmology, responsible for the surgical procedures aimed at treating refractive defects.

Objectives: To explain the general principles of functioning of the corneal confocal microscopy, to describe the microscopic features of normal cornea by confocal microscopy and to enunciate general theoretical aspects related to the excimer laser technology.

General principles: Confocal microscopy is a non-invasive method for studying microscopic images in living tissues, where the lighting and detection are in the same focal plane; moreover, the light is reflected and passes through a second objective lens. The excimer laser uses controlled ultraviolet light power pulses of 193 nm wavelength to apply ablation on the stromal tissue, which produces a refractive

excision pattern and generates new curvature radii. Also, the term excimer is a single diatomic chemical form that only exists in excited state for a short time.

Conclusions: The study of the cornea by confocal microscopy allows the differentiation of the epithelial sublayers, subbasal nervous plexus, keratocytes and stromal nerves, as well as corneal endothelial cells. The excimer laser facilitates the shaping of the corneal curvature to achieve a refractive outcome with minimal disruption to the surrounding tissue, so internationally it has become the prevailing surgical technique for the treatment of ametropies

Key words: cornea, confocal microscopy, excimer laser.

INTRODUCCIÓN

La Cirugía Refractiva es una novedosa subespecialidad de la Oftalmología, encargada de los procedimientos quirúrgicos dirigidos al tratamiento de los defectos refractivos, lo cual posibilita mejorar la agudeza visual sin corrección y, por tanto, prescindir del uso de espejuelos, así como de lentes de contacto; lo anterior genera anualmente, un número creciente de operaciones de este tipo.¹⁻³

Como consecuencia del gran desarrollo científico-tecnológico de la Oftalmología y en especial de la Cirugía Refractiva, la existencia en el mercado internacional de nuevos equipos láser de alto impacto con respecto a resultados visuales, conjuntamente con los adelantos en la microscopía óptica, han permitido el redimensionamiento de los conceptos morfofisiológicos del tejido corneal y estudiar fenómenos que hasta hace pocos años eran desconocidos para la especialidad.⁴⁻⁶ Asimismo, el estudio microscópico de la córnea, con posterioridad a la cirugía refractiva corneal realizada con láser excimer, se ha convertido, en los últimos años, en tema de investigación recurrente a escala internacional, con vistas a obtener resultados *in vivo* del tejido corneal y evaluar estas novedosas tecnologías.^{7,8}

En Cuba, la cirugía refractiva corneal con láser excimer se introdujo en el año 2002. Con el desarrollo tecnológico impulsado por la Misión Milagro, de forma paulatina y como parte de las grandes inversiones realizadas en este campo, en el 2006 se instaló en todas las provincias del país y en varios centros de la capital, la nueva tecnología Esiris de la firma alemana Schwind, lo cual propició en pacientes con defectos refractivos, un incremento constante de este tipo de procedimiento, con estándares de visión nunca antes alcanzados en cuanto a exactitud y predictibilidad.^{9,10}

Resulta oportuno señalar, que tanto en el Centro Oftalmológico de Pinar del Río como en otros, existe la microscopía confocal de la córnea, única tecnología en este país que, entre otras aplicaciones, posibilita el estudio *in vivo* del tejido corneal ablacionado con láser excimer; durante poco tiempo (menos de 5 minutos), con anestesia tópica (colirio), mínimas molestias a los afectados y sin reacciones adversas o efectos colaterales. La obtención secuencial de 350 imágenes con elevada resolución de las subcapas corneales permite, en estos pacientes, la profundización del estudio cualicuantitativo de la estructura morfológica corneal *in vivo*.

Motivados por los aspectos señalados anteriormente, los autores realizaron esta investigación, a fin de explicar los principios generales de funcionamiento de la microscopía confocal de la córnea, describir las características microscópicas de la córnea normal por microscopía confocal y enunciar los aspectos teóricos generales relacionados con la tecnología láser excimer.

PRINCIPIOS GENERALES DE FUNCIONAMIENTO DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA CÓRNEA

Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico de enfermedades de la córnea y la superficie ocular se ha basado en la tradicional biomicroscopía anterior. La evolución exponencial de la tecnología ocurrida en las últimas 2 décadas ha estado liderada por la introducción de nuevos instrumentos para el análisis del segmento anterior ocular, entre los cuales figuran: topografía corneal, biomicroscopía ultrasónica y tomografía de coherencia óptica.¹⁰⁻¹²

Estas técnicas ofrecen detalles de la curvatura corneal o secciones macroscópicas para el examen de estructuras. En cambio, la morfología microscópica de la superficie ocular solo se realizaba por histología *ex vivo*, la cual presenta limitaciones, tales como: degeneración del tejido, presencia de artefactos e imposibilidad de evaluar, a través del tiempo, los procesos de enfermedad.

La microscopía confocal es un método no invasivo para el estudio de imágenes microscópicas en tejidos vivos que, desde principio de la década de 1990, se ha empleado para la investigación de la microestructura corneal.¹³⁻¹⁵ Este estudio de las imágenes ha evolucionado desde niveles experimentales en indagaciones de laboratorio, hasta las aplicaciones en pacientes saludables y enfermos.^{16,17}

El microscopio confocal utilizado para estudiar células del sistema nervioso *in vivo*, originado en 1955, fue desarrollado por Minsky en 1988. Esto permitió que la teoría óptica fuera más formalmente desarrollada y extendida en los años de ese decenio (Wilson y Sheppard, 1984) y en el siguiente (Hill, Masters y Thaer, 1994).^{18,19} Por otro lado, el principio básico de la microscopía confocal consiste en que un punto aislado del tejido puede ser iluminado por un haz de luz y simultáneamente ser captado por una cámara en el mismo plano, lo cual genera una imagen con elevada resolución.^{16,19-22}

Actualmente, existen varios tipos de microscopios confocales, por ejemplo: el Confoscan P4 (Tomey, Estados Unidos), el Confoscan 4 (Nidek, Japón) y el laser corneal confocal microscope (Heidelberg Retina Tomograph II, Rostock Cornea Module: HRTII) (Heidelberg, Alemania), entre otros.^{12,23,24} Todos ellos tienen los mismos principios básicos de funcionamiento.^{17,19} La luz pasa a través de una abertura y es enfocada en un lente objetivo en un área pequeña; es reflejada desde esta área y pasa a través de un segundo lente objetivo. Esta luz se enfoca en una segunda abertura, pero la que está fuera de foco se elimina (figura 1). La iluminación y la detección se encuentran en el mismo plano focal, por ello se emplea el término confocal.^{19,25-28}

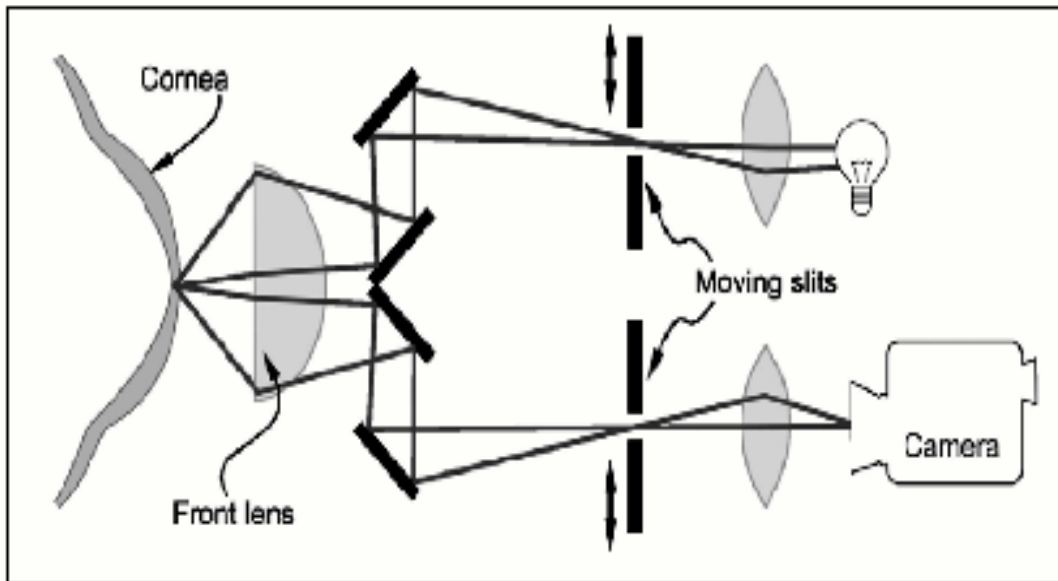


Fig 1. Principios ópticos de la microscopía confocal (Mastropsascua y Nubile, 2002) (Tomado del Atlas de Baudouin C, Bourcier T. Aportes de la microscopía confocal corneal in vivo a la exploración de la superficie ocular. Francia. 2006.)

El sistema, comparado con microscopios de luz, puede discriminar imágenes de alta resolución lateral y axial de la luz que no está en el plano focal, pero como sistema está limitado por una pequeña visión de campo. La calidad de la imagen depende generalmente de 2 factores: contraste y resolución; pero también de la apertura numérica del lente objetivo, los niveles de iluminación, la reflectividad de las estructuras estudiadas y la longitud de onda de la fuente de iluminación.^{17,23}

LA CÓRNEA NORMAL POR MICROSCOPIA CONFOCAL (figura 2)

El epitelio superficial de la córnea se observa en forma de células hexagonales de bordes brillantes con núcleo definido y citoplasma homogéneo.²⁹⁻³¹ Las células tienen forma poligonal característica, casi hexagonal, las cuales se determinan por un citoplasma de alta reflectividad, puesto que se encuentran en un alto proceso de descamación continua, con un núcleo brillante y espacio perinuclear oscuro claramente visible. El epitelio superficial ocupa 5 micras de grosor.^{20,31-35}

Las células del estrato intermedio se caracterizan por el brillo de los bordes y el citoplasma oscuro. El núcleo puede ser distinguido con gran dificultad.³⁶⁻³⁸ El promedio de densidad es aproximadamente 5000 células/mm² en la córnea central y 5 500 células/mm² en la periferia. Las células del estrato medio son las de reflectividad más baja en todo el epitelio corneal.^{21,31,39,40}

Por otra parte, las células basales están localizadas encima de la membrana de Bowman; presentan bordes celulares brillantes en los cuales el núcleo no es visible.^{16,21,23,41-43} La comparación entre ellas revela reflectividad no homogénea del citoplasma. Al igual que las células del estrato intermedio, las basales muestran solo mínima variación en su forma y tamaño. En términos de densidad celular en sujetos normales, la relación entre células superficiales, intermedias y basales es 1:5:10. Las basales tienen 10-15 µm de diámetro y forman un mosaico regular con cuerpos celulares oscuros y brillo en los bordes celulares.^{23,44}

Las células de Langerhans se presentan como partículas corpusculares brillantes con morfología celular dendrítica y diámetro de 15 mm. Se distribuyen en forma de gradiente desde bajos números en el centro, a altas densidades celulares en la periferia de la córnea.^{39,45,46}

De hecho, los nervios subbasales se localizan entre la membrana de Bowman y el epitelio basal.⁴⁷⁻⁴⁹ Aparecen como estructuras lineales con reflectividad homogénea, aspecto dicotómico en forma de Y y fibras de interconexión finas en forma de H.^{16,49,50} La membrana de Bowman no es visible por microscopía confocal. El plexo subepitelial se ubica entre esta membrana y el estroma anterior. Este plexo tiene una distribución en parche y difuso, limitado aparentemente a la córnea medioperiférica y probablemente ausente en la córnea central.⁴⁹

El estroma se observa con imágenes de núcleos de queratocitos. El cuerpo celular, los procesos queratocitarios y el colágeno estromal no son usualmente visibles en la córnea normal. Los queratocitos en el estroma anterior son imágenes bien definidas con brillo, ovals, con variada orientación que contrastan con un fondo oscuro; en el estroma medio tienen una forma oval más regular y en el estroma posterior aparecen más elongados que los de capas anteriores.³¹

Los nervios estromales se ubican en los estromas anterior y medio, pero no pueden ser visualizados en el posterior, pues aparecen como estructuras lineales, delgadas, reflectivas, con varias orientaciones, patrón dicotómico y no se observan detalles internos de los nervios.

Ahora bien, la membrana de Descemet no es visible. Las células endoteliales aparecen como una línea regular de cavidades hexagonales que exhiben cuerpos celulares brillantes con bordes más oscuros.^{3,17,22}

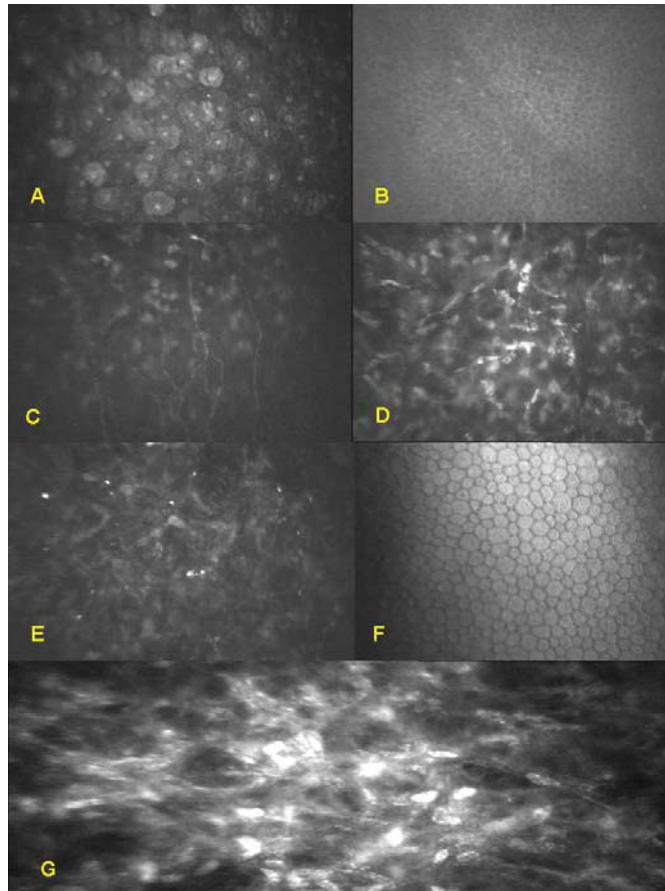


Fig 2. Subcapas corneales por microscopía confocal

- a) Epitelio corneal apical: capa de células poligonales de bordes definidos, con núcleo brillante que resalta sobre el citoplasma homogéneo. Corresponde a paciente a los 6 meses de LASEK.
- b) Epitelio corneal basal: capa de células con citoplasma homogéneo más oscuro que carecen de núcleo y bordes definidos. Corresponde a paciente al año de LASEK.
- c) Plexo nervioso subbasal: fibras nerviosas que contrastan sobre el fondo oscuro; son finas, brillantes, distribuidas de forma paralela u oblicua con diversas bifurcaciones que se conectan entre sí. Corresponde a paciente al año de LASIK.
- d) Estroma corneal: definida por la presencia de cuerpos ovales brillantes (queratocitos) que contrastan sobre el fondo oscuro. Corresponde a paciente a los 3 meses de LASIK.
- e) Interfase quirúrgica: presencia de cuerpos brillantes puntiformes que resaltan sobre el fondo oscuro. Corresponde a paciente 1 mes posterior a LASIK.
- f) Imagen de endotelio corneal: células hexagonales de bordes definidos, anucleadas, con citoplasma homogéneo. Corresponde a paciente al año de LASEK.
- g) Imagen de haze corneal, no pueden ser definidos los límites de los queratocitos, con mayor brillo que el resto de las imágenes estromales. Corresponde a paciente 3 meses posterior a LASEK.

TECNOLOGÍA LÁSER EXCIMER

Actualmente se ha demostrado la existencia de un grado adecuado de eficacia y seguridad en varios tipos de intervenciones refractivas, en las cuales se destaca el uso del láser excimer como herramienta de alta precisión y seguridad para dicho esculpido (aplanamiento) introducido en 1983, por Stephen Trokel y Srinivasan del Centro Médico de la Universidad de Columbia (EEUU).^{12,28}

Este instrumento utiliza pulsos controlados de energía de luz ultravioleta de 193 nm de longitud de onda para aplicar ablación sobre el tejido estromal y produce un patrón de excisión refractivo que genera nuevos radios de curvatura (figura 3). El término excimer deriva de "dímero excitado", forma química diatómica singular que solo existe en estado excitado y por un tiempo mínimo. Durante la operación, los pulsos de emisión láser se limitan a decenas de nanosegundos. Uno de los átomos del excímero corresponde siempre a un gas noble (argón, kriptón o xenón), mientras que el otro debe ser un halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo).²⁸

Ambos elementos están en concentraciones muy pequeñas en una mezcla de helio y se combinan para formar un compuesto inestable que rápidamente se disocia y libera la energía en forma de luz ultravioleta. La fotoablación se produce, pues cada fotón de luz ultravioleta de 193 nm posee 6,4 electrón volt (eV) que es suficiente para separar las uniones carbono-carbono de 3,5 eV, o sea, la fotoablación se basa en la ruptura de uniones moleculares.¹

Debido a que la energía de los fotones se concentra en un punto focal de una fina capa de tejido corneal, se produce una intensa liberación de energía y presión que eyecta en forma perpendicular a la superficie; los fragmentos moleculares se dirigen a una velocidad de aproximadamente 1500 m/s y al mismo tiempo se generan ondas de choque que se propagan a través del ojo con un sonido característico.¹

El pulso del láser dura 15 ns. Los tejidos son removidos casi sin dejar residuos, con un mínimo daño térmico (daño colateral del tejido circundante) y se obtienen superficies de ablación muy uniformes. La emisión de pulsos de altísima potencia inferiores al microsegundo lo convierten en un bisturí perfecto que deja los límites de corte intactos.²⁸ El rayo láser ultravioleta, aplicado en el estroma corneal, rompe los enlaces covalentes de las proteínas solo en el tejido atravesado por el rayo, con ajuste micrométrico de la profundidad deseada. El corte responde a una fotoablación con eliminación de tejido corneal que penetra 14 μm por cada dioptría a corregir y provoca cambios anatómicos que modifican las dioptrías necesarias para conseguir la visión emétrope.

Los avances en la tecnología del láser excimer marcan básicamente 3 grupos: la primera generación son los láseres de haz ancho, en los cuales no se toma en cuenta la asimetría del astigmatismo irregular, se tratan todas las córneas por igual y su fluencia se controla por medio de un diafragma.

Posteriormente aparecieron los láseres de barrido que barren la superficie en forma de hendidura. Dentro de ellos hay otra generación que es la llamada *flying spot* (puntos volantes), cuyo principio incluye un pequeño punto circular o elíptico de diámetro variable que se mueve sobre la superficie de la córnea y crea el diseño de ablación deseado, lo cual evidencia las ventajas de este último sobre los láseres de haz ancho, pues se logra una mejor cantidad y calidad de visión, al producirse una superficie

corneal más lisa y uniforme que induce menor respuesta cicatrizal.^{1,6}

Existen 3 variantes de operación con láser excimer: la queratectomía fotorrefractiva (QFR), láser epithelial in situ queratomileusis (LASEK) y el queratomileusis in situ asistido con láser (LASIK). La limitación principal de la QFR es la respuesta lenta en la cicatrización, el dolor extremo posoperatorio, el hazo corneal, la regresión del defecto refractivo y una escasa predictibilidad. El LASEK logra conservar el epitelio, lo que redundará en un menor grado de molestias y de reacción que con la QFR, así como una recuperación visual relativamente rápida. Además, con esta variante es posible intervenir pacientes que por tener un espesor corneal menor no están aptos para la técnica intraestromal.^{6,28}

Con el LASIK se crea un flap corneal promedio de 160 micras de profundidad, se expone el lecho estromal subyacente, para luego provocar una ablación del tejido estromal mediante el láser excimer y lograr la corrección deseada; el flap al ser reubicado y fijarse exactamente en su lugar original sin suturas, no conlleva ningún astigmatismo operativo (cicatrización o sutura).⁴⁵ La rehabilitación visual es más rápida, hay menos dolor posoperatorio, menos susceptibilidad a las infecciones y virtualmente ningún riesgo de opacidad corneal, razón por la cual se ha convertido en una técnica quirúrgica prevaeciente.

Por este motivo las previsiones de futuro indican que podrá cambiar el tipo de técnica, pero no, de momento, el tipo de láser. Los fabricantes ya hablan de una cuarta generación de láseres de excimeros, cuyas innovaciones se han sucedido en el software y en una mejor adaptación a la práctica quirúrgica.

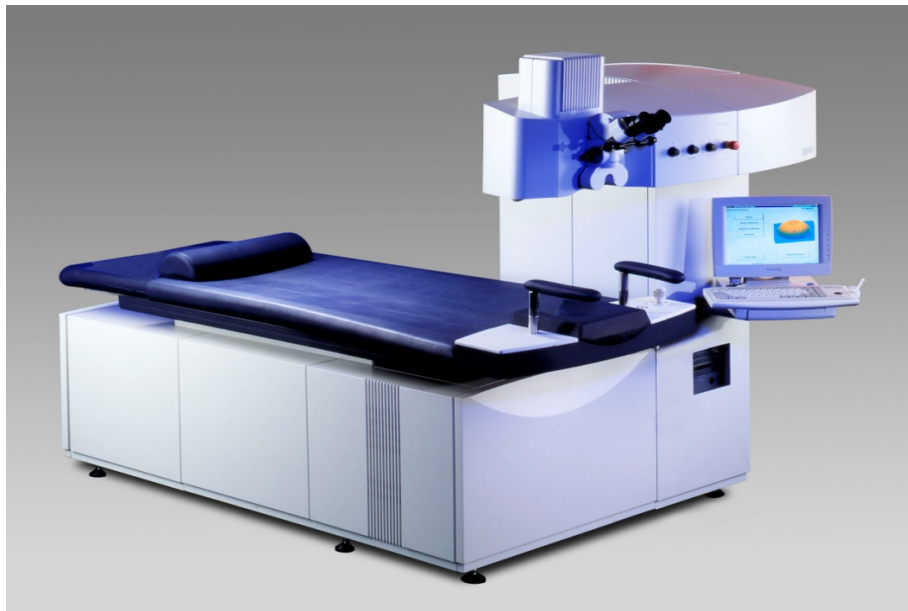


Fig 3. ESIRIS
(Tomado de Manual de uso del láser excimer ESIRIS (Schwind. Alemania) 2001.)

CONCLUSIONES

La microscopía confocal es un método no invasivo para el estudio de imágenes microscópicas en tejidos vivos, donde la luz es reflejada y pasa a través de un segundo lente objetivo. La iluminación y la detección se encuentran en el mismo plano focal, por ello el término confocal es utilizado.

El estudio de la córnea por microscopía confocal permite la diferenciación de las subcapas del epitelio, el plexo nervioso subbasal, los queratocitos, nervios del estroma, y las células del endotelio corneal.

El láser excimer se destaca entre los avances más sorprendentes de la cirugía moderna. Permite el moldeamiento de la curvatura corneal con vistas a lograr un resultado refractivo, con mínimas alteraciones al tejido circundante. Las técnicas quirúrgicas LASIK y LASEK posibilitan lograr este resultado con rápida recuperación visual y prevalecen a escala internacional en el tratamiento de las ametropías.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Palanker DV, Blumenkranz MS, Marmor MF. Fifty years of ophthalmic laser therapy. *Arch Ophthalmol*. 2011;129(12):1613-9.
2. Kato N, Toda I, Hori Komai Y, Sakai C, Tsubota K. Five year outcome of LASIK for myopia. *Ophthalmology*. 2008;115(5):839-44.
3. 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(3):225-30.
4. Zhang H, Xu L, Chen C, Jonas JB. Central corneal thickness in adult Chinese. Association with ocular and general parameters. The Beijing Eye Study. *Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246:587-92.
5. Ku JY, Niederer RL, Patel DV, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal analysis of keratocyte density in keratoconus. *Ophthalmology*. 2008;115(5):845-50.
6. Alió JL, Ortiz D, Muftuoglu O, García MJ. Ten years after photorefractive keratectomy (PRK) and laser in situ keratomileusis (LASIK) for moderate to high myopia (control-matched study). *Br J Ophthalmol*. 2009;93(10):1313-8.
7. 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):1397-1402.
8. Torres RJ, Jones E, Edmunds B, Becker T, Cioffi GA, Mansberger SL. Central corneal thickness in Northwestern American Indians/Alaskan Natives and comparison with white and African-American persons. *Am J Ophthalmol*. 2008;146(5):747-51.

9. Lantigua Maldonado IC, García Martín M, González Duque Y, Machado Fernández EJ, Torrico Delgadillo M, Padilla González CM. Resultados del LASIK miópico en el Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer". Rev Cubana Oftalmol. 2012 [citado 8 Jul 2012]; 25(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-21762012000100003&script=sci_arttext
10. Martínez Rodríguez R, Iviricu Tielves RJ, Correa Rojas O, Blanco Baños A, Acosta González LR. Frecuencia de ametropías diagnosticadas en consulta de cirugía refractiva. Pinar del Río 2007. CIGET Pinar del Río. 2008 [citado 8 Jul 2012]; 10(3). Disponible en: <http://www.ciget.pinar.cu/Revista/No.2008-3/art%EDculos/Dr.%20Rodolfo%20%28Cirug%EDa%20Refractiva%29.pdf>
11. Tomita M, Kanamori T, Waring GO, Yukawa S, Yamamoto T, Sekiya K, et al. Simultaneous corneal inlay implantation and laser in situ keratomileusis for presbyopia in patients with hyperopia, myopia, or emmetropia: Six-month results. Journal of Cataract & Refractive Surgery. 2012; 38(3): 495-506.
12. Christopoulos V, Kagemann L, Wollstein G, Ishikawa H, Gabriele ML, Wojtkowski M, et al. In vivo corneal high-speed, ultra-high-resolution optical coherence tomography. Arch Ophthalmol. 2007; 125(8): 1027-35.
13. Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Keratocyte networks visualized in the living cornea using vital dyes. J Cell Sci. 1993; 106(Pt2): 685-91.
14. Tomii S, Kinoshita S. Observations of human corneal epithelium by tandem scanning confocal microscope. Scanning. 1994; 16(5): 305-6.
15. Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995; 36(13): 2557-67.
16. Zhivov A, Guthoff RF, Stachs O. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside and back again. Br J Ophthalmol. 2010; 94: 1557-8.
17. Erie JC, MacLaren JW, Patel SV. Confocal microscopy in ophthalmology. Am J Ophthalmol. 2009; 148(5): 639-46.
18. Frueh BE, Cadez R, Böhnke M. In vivo confocal microscopy after photorefractive keratectomy in humans. A prospective, long-term study. Arch Ophthalmol. 1998; 116(11): 1425-31.
19. Tavakoli M, Hossain P, Malik RA. Clinical applications of corneal confocal microscopy. Clinical Ophthalmology. 2008; 2(2): 435-45.
20. Zhivov A, Stachs O, Stave J, Guthoff RF. In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of corneal surface and epithelium. Br J Ophthalmol. 2009; 93(5): 667-72.
21. Villani E, Galimberti D, Viola F, Ratiglia R. In vivo confocal microscopy of the ocular surface. Am J Ophthalmol. 2010; 149(4): 689-90.

22. 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(6):977-85.
23. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea-a major review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2009;37(1):100-17.
24. Petroll WM, Cavanagh HD. Remote-controlled scanning and automated confocal microscopy through focusing using a modified HRT rostock corneal module. *Eye Contact Lens.* 2009;35(6):302-8.
25. Javaloy J, Vidal MT, Ruiz Moreno JM, Alió JL. Microscopía confocal de la córnea en la cirugía fotorrefractiva. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2005;80(9):497-510.
26. Ramírez Fernández M, Martínez Menchaca Y, Naranjo Tackman R. Hallazgos mediante microscopía confocal en pacientes postoperados de LASIK tratados con antiinflamatorios no esteroideos (AINES). *Rev Mex Oftalmol.* 2008;82(6):349-51.
27. Nubile M, Mastropasqua L. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: where are we now?. *Br J Ophthalmol.* 2009;93(7):850-2.
28. Reynolds A, Moore JE, Naroo SA, Moore T, Shah S. Excimer laser surface ablation—a review. *Clinical & Experimental Ophthalmology.* 2010;38(2):168-82.
29. 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.
30. Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, Carpineto P, Ciancaglini M, Pannellini T, et al. Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol.* 2006;142(5):736-44.
31. Nishida T. The cornea: stasis and dynamics. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 2008;112(3):179-212.
32. Sherwin T, McGhee CN. Corneal epithelial homeostasis. *Ophthalmology.* 2010;117(1):190-1.
33. Reichard M, Hovakimyan M, Wree A, Meyer Lindenberg A, Nolte I, Junghans C, et al. Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals. *Curr Eye Res.* 2010;35(12):1072-80.
34. DeMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg.* 2011;37(3):588-98.
35. Mootha VV, Dawson D, Kumar A, Gleiser J, Qualls C, Albert DM. Slitlamp, specular, and light microscopic findings of human donor corneas after laser-assisted in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol.* 2004;122(5):686-92.
36. Ivarsen A, Fledelius W, Hjortdal JØ. Three-year changes in epithelial and stromal thickness after PRK or LASIK for high myopia. *Cornea.* 2008;27:70-6.

37. Dvorscak L, Marfurt CF. Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(3):910-6.
38. Pérez Gómez 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(10):690-7.
39. Esquenazi S, He J, Li N, Bazan NG, Esquenazi I, Bazan HE. Comparative in vivo high-resolution confocal microscopy of corneal epithelium, sub-basal nerves and stromal cells in mice with and without dry eye after photorefractive keratectomy. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007;35(6):545-9.
40. Deng SX, Sejpal KD, Tang Q, Aldave AJ, Lee OL, Yu F. Characterization of limbal stem cell deficiency by in vivo laser scanning confocal microscopy: a microstructural approach. *Arch Ophthalmol.* 2012;130(4):440-5.
41. Masters BR, Bohnke M. Three-dimensional confocal microscopy of the living human eye. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:69-91.
42. Patel DV, Sherwin T, McGhee CN. Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(7):2823-7.
43. Azar DT, Pluznik D, Jain S, Khoury JM. Gelatinase B and A expression after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol.* 1998;116(9):1206-8.
44. Ehlers N, Heegaard S, Hjortdal J, Ivarsen A, Nielsen K, Prause JU. Morphological evaluation of normal human corneal epithelium. *Acta Ophthalmol.* 2010;88(8):858-61.
45. Ivarsen A, Laurberg T, Møller Pedersen T. Characterisation of corneal fibrotic wound repair at the LASIK flap margin. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(10):1272-8.
46. Kobayashi A. In vivo laser confocal microscopic analysis of the interface between Bowman's layer and the stroma of the cornea. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 2008;112(11):947-52.
47. Scarpa F, Zheng X, Ohashi Y, Ruggeri A. Automatic evaluation of corneal nerve tortuosity in images from in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:6404-08.
48. Zhivov A, Blum M, Guthoff R, Stachs O. Real-time mapping of the subepithelial nerve plexus by in vivo confocal laser scanning microscopy. *Br J Ophthalmol.* 2010;94(9):1133-5.
49. Allgeier S, Zhivov A, Eberle F, Koehler B, Maier S, Bretthauer G, et al. Image reconstruction of the subbasal nerve plexus with in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(9):5022-8.

MEDISAN 2013; 17(2):

50. Patel SV, Patel SV, McLaren JW, Kittleson KM, Bourne WM. Subbasal nerve density and corneal sensitivity after laser in situ keratomileusis: femtosecond laser vs mechanical microkeratome. Arch Ophthalmol. 2010;128(11):1413-9.

Recibido: 18 de octubre de 2012.

Aprobado: 25 de octubre de 2012.

Eduardo Rojas Alvarez. Hospital General Docente "Abel Santamaría Cuadrado", Carretera Central Km 89, Pinar del Río, Cuba. Correo electrónico: dr_erojas@princesa.pri.sld.cu