



---

**Universidad de Valladolid**



INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA

TESIS DOCTORAL:

**CAMBIOS EN LA FISIOLOGÍA Y MORFOLOGÍA CORNEAL  
INDUCIDOS POR EL PORTE DE LENTES DE CONTACTO**

---

PHYSIOLOGYCAL AND MORPHOLOGYCAL CHANGES IN THE  
CORNEA INDUCED BY CONTACT LENS WEAR

Presentada por **ANA MARÍA DEL RÍO SAN CRISTÓBAL** para  
optar al grado de doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Raúl Martín Herranz

Dr. Miguel José Maldonado López





**Universidad de Valladolid**

Impreso 2T

### **AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

*(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)*

**D. RAÚL MARTÍN HERRANZ**, con D.N.I. nº 50447910-D, investigador del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid (IOBA) y profesor contratado doctor del Departamento de Física Teórica, Atómica y Óptica, y **D. MIGUEL JOSÉ MALDONADO LÓPEZ**, con D.N.I. no 25149971-T, investigador del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid (IOBA) y profesor titular del Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, como Directores de la Tesis Doctoral titulada “**Cambios en la fisiología y morfología corneal inducidos por el porte de lentes de contacto**”, presentada por Dña. **Ana María del Río San Cristóbal**, alumna del programa de Doctorado en Ciencias de la Visión impartido por el IOBA,

Autorizan la presentación de la misma, considerando que es APTA para su defensa.

Valladolid, 10 de junio de 2014

Los Directores de la Tesis,

Fdo.: Dr. Raúl Martín Herranz

Fdo.: Dr. Miguel José Maldonado López

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



**CERTIFICADO DE ESTANCIA EN UNA INSTITUCIÓN EXTRANJERA**  
**CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION**

<b>1. Becario/ Applicant:</b>
Nombre y apellidos/ Name: Ana del Rio San Cristobel
D.N.I./ National identity Card: 71156036-Q
Centro de aplicación de la beca/ Home Institución: IOBA - Universidad de Valladolid
<b>2. Centro en el que se ha realizado la estancia/ Host institution:</b>
Nombre/ Name: Department of Vision Sciences - Glasgow Caledonian University
Dirección/ Adress: Cowcaddens Road, Glasgow G4 0BA
Localidad/ Country: Scotland, UK
<b>3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Responsable person in the Host</b>
Institución/ Institution: Department of Vision Sciences - Glasgow Caledonian University
Nombre/ Name: Niall Strang
Cargo/ Post: Subject Lead
<b>CERTIFICO:</b> que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas: desde ____ / ____ / ____ hasta ____ / ____ / ____
<b>THIS IS TO CERTIFY:</b> that the above mentioned person has performed a stay in this Institution in the following dates: From: <u>16</u> / <u>09</u> / <u>2013</u> To: <u>15</u> / <u>12</u> / <u>2013</u>
Lugar y fecha: Glasgow December 15, 2013 City and date:
Firma y Sello/ Signature & Stamp

 School of Health & Life Sciences



*A mi familia.*



*“Un viaje de mil leguas empieza con un sólo paso”*

Confucio

*“Si tienes un problema que no tiene solución, ¿por qué te preocupas? Y si tiene solución, ¿por qué te preocupas?”*

Proverbio

*“Pues aunque el resplandor que en otro tiempo fue tan brillante hoy esté por siempre oculto a mis miradas, aunque nada pueda hacer volver la hora del esplendor en la hierba, de la gloria en las flores, no debemos afligirnos, pues encontraremos fuerza en el recuerdo, en aquella primera simpatía que, habiendo sido una vez, habrá de ser por siempre....”*

William Wordsworth



# AGRADECIMIENTOS

La idea llevaba unas semanas rondándome la cabeza....“¿hacer la tesis?” Nunca me lo había planteado...entonces Ángela dejó una pregunta en el aire: “¿Y por qué no?”

Aquella tarde, Damián me ayudó a despejar la incertidumbre inicial: “Hija, tu ya sabes que puedes contar con nuestro apoyo. Decidas lo que decidas estará bien decidido, siempre que tires para adelante”. Sagrario me bombardeaba con sus preguntas, muchas de las cuales yo no supe responder entonces: “¿Pero eso de la tesis es para ser Doctora? ¿Cómo los médicos? ¿Y después qué vas a hacer? ¿Para qué te sirve? ¡Fíjate qué bien estaría tener una hija Doctora! Lo que iba a presumir yo”

Poco después, el entusiasmo de Raquel y Carlos terminó por convencerme de que merecería la pena.....“¡¡¡Ahora, que está bueno!!!”

Para colofón final, la acogida de Raúl me maravilló y asustó por partes iguales: “¡Bienvenida a las trincheras!”

Hoy, cuando vuelvo atrás la mirada, no puedo sino sentir orgullo y gratitud hacia vosotros. Orgullo, por lo mucho y muy bueno que entre todos vamos consiguiendo. Y gratitud, por el apoyo y el amor que no cesa, y mucho más. Gracias, a los seis.



# FINANCIACIÓN

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al apoyo económico recibido de diferentes organismos públicos y privados que han financiado los siguientes proyectos de investigación en los que he participado como personal investigador:

## **FINANCIACIÓN PÚBLICA:**

- Evolución de un nuevo método de diagnóstico no invasivo de la córnea a través de la medición de la bioimpedancia utilizando micro-nano-tecnologías. Parte II. (SAF2009-14724-C02-02). Enero de 2013 a Diciembre de 2015. Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Desarrollo de un nuevo método de diagnóstico no invasivo de la córnea por bioimpedancia utilizando micronanotecnologías (CORBI). (SAF2009-14724-C02-01). Enero de 2010 a Diciembre de 2012. Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Comparative study of the corneal thickness profile in Northern and Southern European eyes. 2012 - 2013. Santander Universities Network UK.

## **FINANCIACIÓN PRIVADA:**

- Estudio clínico: Evaluación de la sensibilidad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal (dispositivo CORBI). Septiembre de 2012 a Marzo de 2014. Laboratorios Salvat, S.A.

- Peripheral corneal thickness in first year vision sciences students. 2013. Vision Sciences unit, Department of Life Sciences, Glasgow Caledonian University.

Además, he disfrutado la siguiente financiación personal para el desarrollo de esta Tesis Doctoral y para realizar la estancia de investigación en el extranjero:

- Beca de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Universidad de Valladolid. Agosto de 2010 a Julio de 2014.
- Ayuda para Estancias Breves durante el desarrollo de Tesis Doctorales, para becarios FPI de la UVa, para la realización de una estancia de tres meses en la Vision Sciences unit del Department of Life Sciences, Glasgow Caledonian University (Glasgow, Escocia); bajo la supervisión del Dr. Niall Strang.

# DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Durante el desarrollo de esta tesis, el trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- **Ana Rio-Cristobal;** Raul Martin. Corneal assessment technologies: current status. Survey of Ophthalmology. Article in press. Published online 26 May 2014.
- **Ana Rio-Cristobal;** Anton Guimera; Maria Plata-Cordero; Estefanía Traver; Carmen Herrero; Carmen Lagunas; Rosa Villa; Miguel Jose Maldonado; Raul Martin. Corneal epithelium permeability changes as a response to contact lens-induced hypoxia in rabbits. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2014. En primera revisión.
- **Ana Rio-Cristobal;** Anton Guimera; Angela Morejon; Estefanía Traver; Carmen Herrero; Carmen Lagunas; Rosa Villa; Miguel Jose Maldonado; Raul Martin. Safety and efficacy of a new non-invasive method for in vivo quantification of corneal epithelium and endothelium permeability in contact lens wearers. Proof of concept. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2014. En primera revisión.
- Raul Martin; Sven Jonuscheit; **Ana Rio-Cristobal;** Michael Doughty. Repeatability of Pentacam peripheral corneal thickness measurements. Optometry & Vision Science. 2014. En segunda revisión.

- Sven Jonascheit; Michael Doughty; Raul Martin; **Ana Rio-Cristobal**; Victoria Cruikshank; Sue Lang. Peripheral corneal thickness in presbyopic Caucasian subjects in relation to nasal-temporal asymmetry by Scheimpflug imaging. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2014. En primera revisión.
- Raul Martin; **Ana Rio-Cristobal**; Laura Mena; Sara Ortiz. Relationships between central and peripheral corneal thickness in different degrees of myopia. *Journal of Optometry*. 2014; 7-1, pp. 44 - 50.
- Raul Martin; Sara Ortiz; **Ana Rio-Cristobal**. White-to-white corneal diameter differences in moderate and high myopic eyes: Partial coherence interferometry versus scanning-slit topography. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*. 2013; 39-4, pp. 585 - 589.
- Sara Ortiz; **Ana Rio-Cristobal**; Raul Martin; Victoria de Juan; Guadalupe Rodriguez. Relación de los parámetros biométricos en el ojo miope. *Gaceta de Optometría*. 2012; 474, pp. 12 - 22.

Además, se han presentado las siguientes comunicaciones en Congresos:

- **Ana Rio-Cristobal**; Anton Guimera; Estefania Traver; Angela Morejon; Carmen Herrero; Carmen Lagunas; Rosa Villa; Miguel Jose Maldonado; Raul Martin. Evaluación de la seguridad clínica de la medida de la impedancia corneal. Aplicación en lentes de contacto. XXIII Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica - OPTOM 2014 . Comunicación oral. Abril de 2014.
- **Ana Rio-Cristobal**; Maria Plata-Cordero; Anton Guimera; Estefania Traver; Carmen Herrero; Carmen Lagunas; Rosa Villa;

Miguel Jose Maldonado; Raul Martin. Respuesta del epitelio corneal a la hipoxia inducida por el porte de lentes de contacto en conejos. Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica - OPTOM 2014 . Comunicación en póster. Abril de 2014.

- Sven Jonuscheit; Raul Martin; **Ana Rio-Cristobal**; Michael Doughty; Lisa Mackintosh; David MacTaggart; Michael Hiscock. Relación entre el espesor corneal periférico y el índice de masa corporal en adultos europeos jóvenes. Estudio piloto . Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica - OPTOM 2014 . Comunicación en póster. Abril de 2014.
- Raul Martin; Sven Jonuscheit; **Ana Rio-Cristobal**; Michael Doughty; Lisa Mackintosh; David MacTaggart; Michael Hiscock. Repetibilidad de la paquimetría periférica (próxima al limbo) de la topografía corneal de Scheimpflug (Pentacam). Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica - OPTOM 2014 . Comunicación en póster. Abril de 2014.
- Sven Jonuscheit; Raul Martin; **Ana Rio-Cristobal**; Michael Doughty; Lisa Mackintosh; David MacTaggart; Michael Hiscock. Body mass index, peripheral corneal thickness and anterior chamber depth in young European adults – A pilot study . Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO). Comunicación en póster. Mayo de 2013.
- Raul Martin; Sven Jonuscheit; **Ana Rio-Cristobal**; Michael Doughty; Lisa Mackintosh; David MacTaggart; Michael Hiscock. Repeatability of peripheral (near-limbal) corneal thickness measurements of Pentacam Scheimpflug corneal topography . Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting (ARVO). Comunicación en póster. Mayo de 2013.
- **Ana Rio-Cristobal**; Maria Plata-Cordero; Anton Guimera; Estefania Traver; Raul Martin; Rosa Villa; Carmen Herrero;

Carmen Lagunas; Miguel Jose Maldonado. A new non-invasive method to assess corneal integrity based on bioimpedance measurements. European Academy of Optometry and Optics . Comunicación en póster. Abril de 2013.

- Victoria de Juan; Sara Ortiz; Laura Mena; **Ana Rio-Cristobal**; Raul Martin. Relación entre el espesor central y periférico de la córnea y el grado de miopía . 88 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología . Comunicación en póster. Septiembre de 2012.
- **Ana Rio-Cristobal**; Angela Morejon; Raul Martin. Respuesta corneal inmediata al porte de lentes de contacto . XXII Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica - OPTOM 2012 . Comunicación en póster. Febrero de 2012.
- Laura Mena; Sara Ortiz; **Ana Rio-Cristobal**; Raul Martin. Relación entre espesor corneal central y periférico y el grado de miopía . XXII Congreso Internacional de Optometría, Contactología y Óptica Oftálmica - OPTOM 2012 . Comunicación oral. Febrero de 2012.

Repercusión en medios de comunicación (consultado el 3 de junio de 2014):

- Radio Televisión Española (RTVE): <http://www.rtve.es/noticias/20140319/crean-sensor-capaz-diagnosticar-in-vivo-alteraciones-cornea/900280.shtml>
- Agencia Iberoamericana para la Difusión de la Ciencia y la Tecnología (DICYT): <http://www.dicyt.com/noticias/investigacion-como-afecta-a-la-cornea-el-uso-de-lentes-de-contacto>

# ÍNDICE

## PREFACIO

Agradecimientos .....	I
Financiación .....	III
Divulgación Científica .....	V

## CAPÍTULO 0

Índice .....	1
Estructura de la Tesis Doctoral .....	9
Lista de tablas .....	13
Lista de figuras .....	17
Abreviaturas .....	19
English Summary .....	21

## CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación .....	75
1.2. Hipótesis .....	79
1.3. Objetivos .....	81

## CAPÍTULO 2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2.1. Anatomía de la córnea. Estructura corneal .....	85
2.1.1. Epitelio .....	86

2.1.2. Lámina de Bowman .....	87
2.1.3. Estroma .....	87
2.1.4. Membrana de Descemet .....	88
2.1.5. Endotelio.....	88
<b>2.2. Fisiología de la córnea. Función barrera de epitelio y endotelio .....</b>	<b>91</b>
2.2.1. Tight junctions .....	92
2.2.2. Función barrera del epitelio .....	93
2.2.3. Función barrera del endotelio .....	94
<b>2.3. Evaluación de la fisiología corneal. Técnicas indirectas .....</b>	<b>97</b>
2.3.1. Microscopía especular.....	98
2.3.2. Paquimetría ultrasónica.....	98
2.3.3. Microscopía confocal.....	99
2.3.4. Tomografía de coherencia óptica .....	99
2.3.5. Topografía de elevación .....	101
2.3.6. Topografía de Scheimpflug .....	102
2.3.7. Uso de la fluoresceína en la evaluación ocular .....	103
<b>2.4. Evaluación de la fisiología corneal. Técnicas directas .....</b>	<b>105</b>
2.4.1. Fluorofotometría .....	106
2.4.2. Resistencia eléctrica transepitelial .....	108
<b>2.5. Córnea y lentes de contacto. Edema corneal con LC hidrofílicas .....</b>	<b>111</b>
2.5.1. Propiedades de las LC .....	112
2.5.2. Edema corneal inducido por el porte de LCH.....	113

## **CAPÍTULO 3. BIOIMPEDANCIA CORNEAL**

<b>3.1. Introducción. Descripción de la técnica .....</b>	<b>117</b>
3.1.1. Bases electrofisiológicas .....	118
3.1.2. Equipo y proceso de medida .....	122
3.1.3. Validación de la técnica. Resultados previos en modelo animal.....	124

<b>3.2. Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal.....</b>	<b>125</b>
3.2.1. Introducción .....	126
3.2.2. Hipótesis y objetivos.....	126
3.2.2.1. Hipótesis.....	126
3.2.2.2. Objetivos.....	126
3.2.3. Material y métodos .....	127
3.2.3.1. Animales.....	127
3.2.3.2. Lentes de contacto .....	127
3.2.3.3. Instrumentación .....	128
3.2.3.4. Procedimiento.....	128
3.2.3.5. Criterio de edema .....	131
3.2.3.6. Análisis histopatológico .....	132
3.2.3.7. Análisis estadístico .....	132
3.2.3.8. Instalaciones.....	134
3.2.4. Resultados.....	134
3.2.4.1. Detección de diferencias en la paquimetría y en el edema inducido .....	134
3.2.4.2. Detección de diferencias en la permeabilidad epitelial.....	136
3.2.4.3. Tinción epitelial y evaluación histopatológica .....	138
3.2.5. Discusión .....	140
3.2.5.1. Cambios inducidos por el porte de LC.....	141
3.2.5.2. Puntos fuertes y limitaciones.....	143
3.2.5.3. Conclusiones .....	145
<b>3.3. Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial. Prueba de concepto en humanos.....</b>	<b>147</b>
3.3.1. Introducción .....	148
3.3.2. Hipótesis y objetivos.....	149
3.3.2.1. Hipótesis.....	149
3.3.2.2. Objetivos.....	149
3.3.3. Material y métodos .....	150

3.3.3.1. Sujetos .....	150
3.3.3.2. Lentes de contacto .....	152
3.3.3.3. Instrumentación .....	152
3.3.3.4. Procedimiento.....	153
3.3.3.5. Criterio de edema .....	157
3.3.3.6. Análisis estadístico .....	157
3.3.3.7. Instalaciones.....	158
3.3.4. Resultados.....	159
3.3.4.1. Muestra.....	159
3.3.4.2. Valoración de la seguridad del dispositivo.....	160
3.3.4.3. Detección de diferencias en la paquimetría corneal.....	162
3.3.4.4. Detección de diferencias en la paquimetría epitelial .....	164
3.3.4.5. Detección de diferencias en la permeabilidad epitelial.....	166
3.3.4.6. Detección de diferencias en la permeabilidad endotelial....	166
3.3.4.7. Correlaciones.....	168
3.3.5. Discusión .....	171
3.3.5.1. Seguridad de la técnica de medida de bioimpedancia corneal .....	173
3.3.5.2. Permeabilidad epitelial.....	174
3.3.5.3. Permeabilidad endotelial .....	176
3.3.5.4. Puntos fuertes y limitaciones .....	176
3.3.5.5. Conclusiones .....	178

## **CAPÍTULO 4. ASIMETRÍA DEL ESPESOR CORNEAL**

<b>4.1. Introducción. Diferencias anatómicas. Centro Vs periferia.....</b>	<b>183</b>
4.1.1. Definición de la zona central y periférica de la córnea .....	184
4.1.2. Diferencias en el espesor corneal .....	185
4.1.3. Relevancia clínica del espesor corneal periférico .....	185
4.1.4. Otras diferencias entre el centro y la periferia de la córnea .....	186

4.1.5. Espesor corneal periférico y edema inducido por el uso de LC .....	187
<b>4.2. Estudio III. Asimetría del espesor corneal: porte de LC a corto plazo.....</b>	<b>189</b>
4.2.1. Introducción .....	190
4.2.2. Hipótesis y objetivos .....	190
4.2.2.1. Hipótesis .....	190
4.2.2.2. Objetivos.....	191
4.2.3. Material y métodos .....	191
4.2.3.1. Sujetos.....	191
4.2.3.2. Lentes de contacto .....	192
4.2.3.3. Instrumentación .....	192
4.2.3.4. Procedimiento.....	194
4.2.3.5. Criterios de edema y asimetría.....	196
4.2.3.6. Análisis estadístico .....	198
4.2.3.7. Instalaciones.....	199
4.2.4. Resultados.....	199
4.2.4.1. Muestra.....	199
4.2.4.2. Medida basal del espesor corneal central y periférico y asimetrías corneales.....	200
4.2.4.3. Diferencias en la paquimetría y edema del espesor corneal central y periférico .....	202
4.2.4.4. Diferencias en la asimetría centro - periferia y en la asimetría nasal - temporal .....	204
4.2.5. Discusión .....	208
4.2.5.1. Puntos fuertes y limitaciones .....	211
4.2.5.2. Conclusiones .....	213
<b>4.3. Estudio IV. Asimetría del espesor corneal: porte de LC a medio plazo.....</b>	<b>215</b>
4.3.1. Introducción .....	216
4.3.2. Hipótesis y objetivos .....	217
4.3.2.1. Hipótesis .....	217
4.3.2.2. Objetivos.....	217
4.3.3. Material y métodos .....	217

4.3.3.1. Sujetos.....	218
4.3.3.2. Lentes de contacto .....	218
4.3.3.3. Instrumentación .....	218
4.3.3.4. Procedimiento.....	219
4.3.3.5. Criterios de edema y asimetría.....	221
4.3.3.6. Análisis estadístico .....	221
4.3.3.7. Instalaciones.....	222
4.3.4. Resultados.....	223
4.3.4.1. Muestra.....	223
4.3.4.2. Medida basal del espesor corneal central y periférico y asimetrías corneales.....	223
4.3.4.3. Diferencias en la paquimetría y edema del espesor corneal central y periférico .....	225
4.3.4.4. Diferencias en la asimetría centro - periferia y en la asimetría nasal - temporal .....	227
4.3.4.5. Comparación Pentacam Vs Galilei.....	230
4.3.5. Discusión .....	232
4.3.5.1. Comparación Pentacam Vs Galilei.....	234
4.3.5.2. Puntos fuertes y limitaciones.....	237
4.3.5.3. Conclusiones .....	239

## **CAPÍTULO 5. SÍNTESIS FINAL**

5.1. Resumen global.....	243
5.2. Relevancia clínica y perspectivas futuras.....	247
5.3. Conclusiones .....	251

## **BIBLIOGRAFÍA**

<b>Referencias .....</b>	<b>253</b>
--------------------------	------------

## ANEXOS

<b>Anexo I.</b> Patente internacional número WO 2011/107645 PCT/ES2011/070131: “Sensor no invasivo para determinar características funcionales de la córnea, dispositivo que incluye dicho sensor y su uso” .....	265
<b>Anexo II.</b> Manual de usuario CORBI.....	287
<b>Anexo III.</b> Inocuidad del sensor flexible R5868-O2 en experimentales realizados en conejos de experimentación.....	293
<b>Anexo IV.</b> Hoja de información para el sujeto para el estudio “Evaluación de la sensibilidad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal (dispositivo CORBI)” .....	299
<b>Anexo V.</b> Consentimiento informado para el estudio “Evaluación de la sensibilidad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal (dispositivo CORBI)” .....	303
<b>Anexo VI.</b> Hoja de información para el sujeto para el estudio “Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo” .....	307
<b>Anexo VII.</b> Consentimiento informado para el estudio “Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo” .....	311



# ESTRUCTURA DE LA TESIS DOCTORAL

Este trabajo de tesis opta a la Mención Internacional en el Título de Doctor. Su organización se ajusta a lo requerido por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Valladolid, por lo que la memoria incluye un resumen del trabajo en inglés, además de aportar un certificado de la estancia de tres meses de duración realizada en la Vision Sciences unit del Department of Life Sciences de la Glasgow Caledonian University, en Glasgow, Reino Unido.

La tesis aborda los cambios producidos en la fisiología (cambios en la permeabilidad del epitelio y el endotelio corneal) y morfología (cambios en el espesor corneal) de la córnea inducidos por el porte de lentes de contacto hidrofílicas (LCH). El trabajo se ha estructurado en cinco capítulos (figura 1):

- **Capítulo 1: Introducción.** Se justifica la motivación del trabajo. Se presentan la hipótesis planteada y los objetivos perseguidos.
- **Capítulo 2: Estado actual del tema.** Se introducen los conceptos básicos necesarios para entender el planteamiento, desarrollo y resultados de los estudios presentados en esta tesis: anatomía y fisiología de la córnea, técnicas de evaluación corneal, interacción entre lentes de contacto y córnea (edema corneal).
- **Capítulo 3: Bioimpedancia corneal.** Se detallan los conceptos mínimos necesarios para entender las bases de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal, una técnica capaz

de proporcionar la medida de la permeabilidad de las distintas capas de la córnea de manera no invasiva e *in vivo*.

Se desarrolla el “*Estudio I: Permeabilidad epitelial en modelo animal*”, donde se midieron los cambios secundarios a la hipoxia inducida por el porte de LCH en la permeabilidad epitelial en conejos y el “*Estudio II: Permeabilidad epitelial y endotelial. Prueba de concepto en humanos*”, donde se midieron los cambios secundarios a la hipoxia inducida por el porte de LCH de distinto Dk/t en la permeabilidad epitelial y endotelial en humanos.

El principal objetivo de estos estudios fue la evaluación de la seguridad y eficacia de esta técnica para su futura aplicación en la práctica clínica.

- **Capítulo 4: Asimetría del espesor corneal.** Se exponen las diferencias anatómicas entre el centro y la periferia de la córnea, poniendo especial atención en el espesor corneal.

Se desarrolla el “*Estudio III: Asimetría del espesor corneal y porte de LC a corto plazo*”, donde se evaluó el edema inducido por el porte durante 40 minutos de LCH de distinto Dk/t y su distribución en el centro corneal y a lo largo de su meridiano horizontal. También se desarrolla el “*Estudio IV: Asimetría del espesor corneal y porte de LC a medio plazo*”, donde se evaluó el edema inducido por el porte durante una semana de LCH de distinto Dk/t y su distribución en el centro y el meridiano horizontal corneal.

El principal objetivo de estos estudios fue el de estudiar si el edema se distribuye de manera uniforme entre el centro y la periferia corneal o se acentúa más en una u otra zona.

- **Capítulo 5: Síntesis final.** Se presenta una recapitulación de los resultados alcanzados en esta tesis y su relevancia clínica, futuras direcciones y conclusiones.

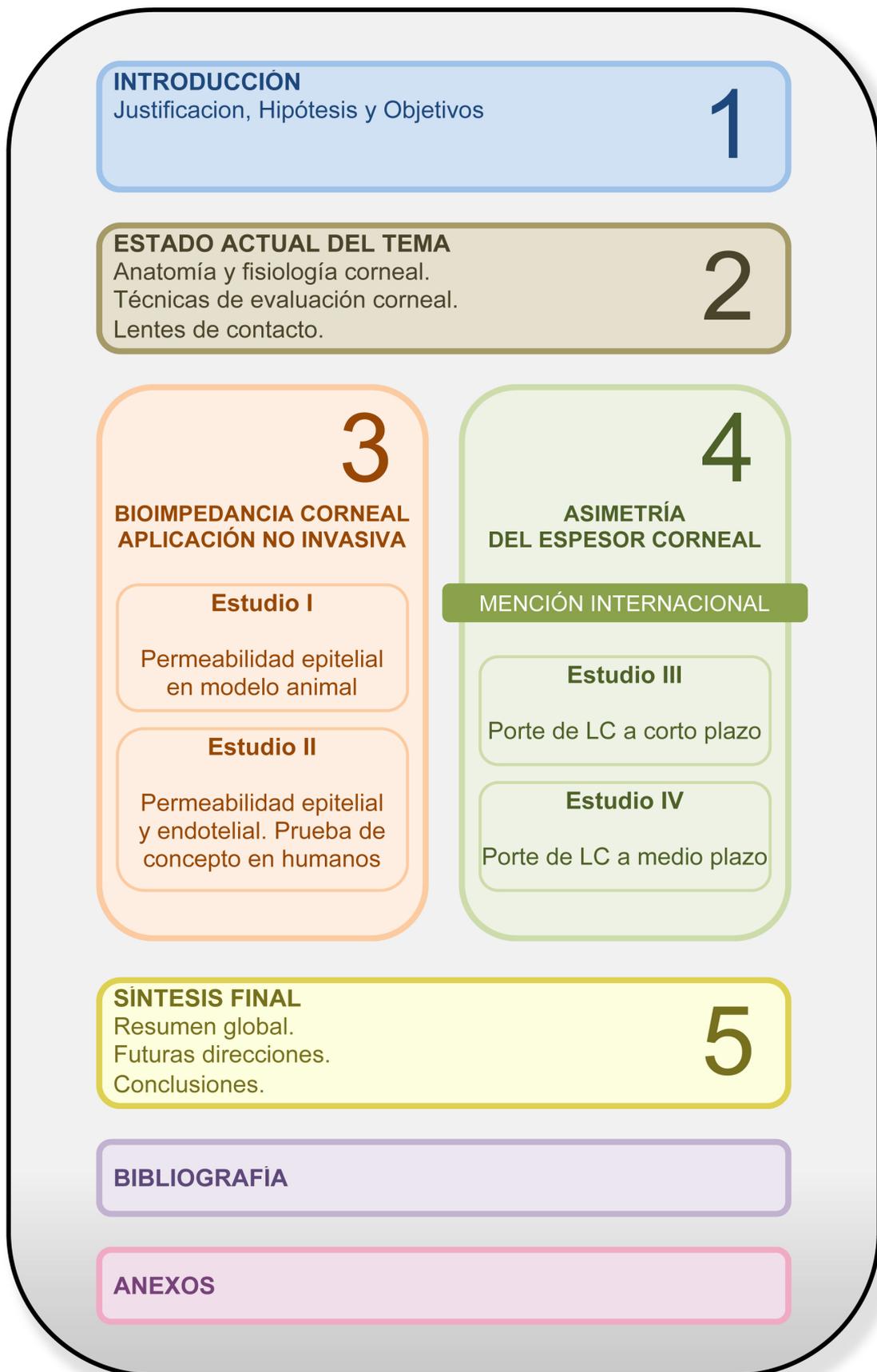


Figura 1. Esquema de la organización de la memoria de tesis.



# LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Fórmula empleada para calcular el porcentaje de edema .....	97
<b>Tabla 3.1.</b> Parámetros de las LC utilizadas en el estudio “Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal” .....	127
<b>Tabla 3.2.</b> Visitas del “Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal” .....	129
<b>Tabla 3.3.</b> Grupos del “Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal”. Uso prolongado de LC = sin retirarlas durante el sueño .....	129
<b>Tabla 3.4.</b> Fórmula empleada para calcular el porcentaje de edema inducido.....	132
<b>Tabla 3.5.</b> Resumen de las medidas del espesor corneal central (media $\pm$ DS), obtenidas con el paquímetro Sonogage para las tres visitas del estudio.....	135
<b>Tabla 3.6.</b> Edema corneal inducido (media $\pm$ DS) después de 1 día y 7 días de uso prolongado con las LC.....	136
<b>Tabla 3.7.</b> Resumen de las medidas de bioimpedancia corneal (media $\pm$ DS), obtenidas con el equipo de medida de bioimpedancia corneal CORBI, para las tres visitas del estudio .....	137
<b>Tabla 3.8.</b> Criterios de inclusión, exclusión y para abandonar el estudio del “Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en humanos” .....	151
<b>Tabla 3.9.</b> Parámetros de las LC utilizadas en el estudio “Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en humanos” .....	152
<b>Tabla 3.10.</b> Grupos del “Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en humanos” .....	154
<b>Tabla 3.11.</b> Resumen de las medidas del espesor corneal central (media $\pm$ DS), obtenidas con el tomógrafo de coherencia óptica 3D OCT-2000, para las tres visitas del estudio .....	163
<b>Tabla 3.12.</b> Edema corneal inducido (media $\pm$ DS) después de 3 días y 7 días de uso prolongado con las LC.....	163
<b>Tabla 3.13.</b> Resumen de las medidas del espesor epitelial (media $\pm$ DS), obtenidas con el tomógrafo 3D OCT-2000, para las tres visitas del estudio. ....	165
<b>Tabla 3.14.</b> Edema epitelial inducido (media $\pm$ DS) después de 3 días y 7 días de uso prolongado con las LC.....	165
<b>Tabla 3.15.</b> Resumen de las medidas de bioimpedancia epitelial (media $\pm$ DS), obtenidas con el equipo de medida de bioimpedancia corneal CORBI, para las tres visitas del estudio .....	167

<b>Tabla 3.16.</b> Resumen de las medidas de bioimpedancia endotelial (media $\pm$ DS), obtenidas con el equipo de medida de bioimpedancia corneal CORBI, para las tres visitas del estudio .....	167
<b>Tabla 4.1.</b> Grupos del "Estudio III. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a corto plazo" .....	195
<b>Tabla 4.2.</b> Fórmulas empleadas para calcular la diferencia absoluta y el índice relativo de progresión entre el centro y la periferia de la córnea .....	196
<b>Tabla 4.3.</b> Fórmulas empleadas para calcular la diferencia absoluta y el índice relativo de progresión entre la periferia nasal y la periferia temporal de la córnea.....	197
<b>Tabla 4.4.</b> Nomenclatura para la diferencia absoluta e índice relativo de progresión (IRP) en función de las localizaciones.....	197
<b>Tabla 4.5.</b> Espesor corneal basal en las cinco localizaciones estudiadas.....	200
<b>Tabla 4.6.</b> Diferencias absolutas ( $\mu\text{m}$ ) e IRP (%) entre el espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5).....	201
<b>Tabla 4.7.</b> Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que no portó LC (grupo control) .....	202
<b>Tabla 4.8.</b> Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de alto Dk .....	203
<b>Tabla 4.9.</b> Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de bajo Dk .....	203
<b>Tabla 4.10.</b> Edema corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) de los tres grupos de ojos (grupo control, grupo alto-Dk y grupo bajo-Dk) después de 40 minutos de porte de las LC .....	204
<b>Tabla 4.11.</b> IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que no portó LC (grupo control).....	205
<b>Tabla 4.12.</b> IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de alto Dk (grupo alto-Dk) .....	205
<b>Tabla 4.13.</b> IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de bajo Dk (grupo bajo-Dk) .....	206
<b>Tabla 4.14.</b> IRP de las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) de los tres grupos de ojos (control, alto-Dk y bajo-Dk) después de 40 minutos de porte.....	207
<b>Tabla 4.15.</b> Grupos del "Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo" .....	220
<b>Tabla 4.16.</b> Espesor corneal basal en las cinco localizaciones estudiadas para la muestra total del estudio .....	224
<b>Tabla 4.17.</b> Diferencias absolutas ( $\mu\text{m}$ ) e IRP (%) entre el espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5).....	225

**Tabla 4.18.** Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de bajo Dk (grupo bajo-Dk) .....226

**Tabla 4.19.** Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de alto Dk (grupo alto-Dk) .....226

**Tabla 4.20.** Edema corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) de los dos grupos de ojos (grupo alto-Dk y grupo bajo-Dk) después de 7 días de porte prolongado de las LC .....227

**Tabla 4.21.** IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de alto Dk (grupo alto-Dk) .....228

**Tabla 4.22.** IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de bajo Dk (grupo bajo-Dk) .....228

**Tabla 4.23.** IRP de las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) de los dos grupos de ojos (grupo alto-Dk y grupo bajo-Dk) después de 7 días de porte prolongado de las LC .....229

**Tabla 4.24.** Diferencias de las medidas basales obtenidas con el topógrafo Pentacam (Estudio III) y con el topógrafo Galilei (Estudio IV), en todas las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) .....230

**Tabla 4.25.** Diferencias de las medidas basales obtenidas con el topógrafo Pentacam (Estudio III) y con el topógrafo Galilei (Estudio IV), en todas las relaciones estudiadas entre el centro y la periferia (N5/CCT, N4/CCT, T5/CCT, T4/CCT) y la periferia nasal y temporal (N5/T5, N4/T4) .....231



# LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la organización de la memoria de tesis .....	11
<b>Figura 2.1.</b> Estructura de la córnea .....	85
<b>Figura 2.2.</b> Imagen del epitelio corneal humano obtenida mediante microscopía óptica (40x). (Cortesía del laboratorio de Anatomía Patológica Ocular, IOBA) .....	86
<b>Figura 2.3.</b> Imagen del endotelio corneal humano obtenida mediante microscopía especular .....	89
<b>Figura 2.4.</b> Representación de la función barrera del epitelio corneal. Las tight junctions regulan el paso de moléculas a través de los espacios paracelulares .....	93
<b>Figura 2.5.</b> Representación de la función barrera y bomba metabólica del endotelio corneal. Ambas funciones colaboran para mantener en equilibrio la relativa deshidratación de la córnea. ....	95
<b>Figura 2.6.</b> Representación de la regulación de la fisiología corneal en una córnea normal (izquierda) y en una córnea edematizada (derecha). Cuando la función barrera del endotelio corneal falla, permite una mayor filtración desde la cámara anterior hacia el estroma. La función de la bomba $Na^+-K^+$ no es capaz de contrarrestar esta alteración, y el equilibrio entre ambas funciones se pierde, lo que provoca edema corneal. (Srinivas, S. 2010) .....	96
<b>Figura 2.7.</b> Representación de la colocación de los electrodos necesarios para llevar a cabo la medida del TER en modelo animal in vivo. (Uematsu, M. 2007).....	109
<b>Figura 3.1.</b> Esquema del comportamiento de la corriente eléctrica a diferentes frecuencias al atravesar una capa celular. Línea discontinua: bajas frecuencias (<1 KHz), la corriente circula por el medio extracelular. Línea continua: altas frecuencias (>100 KHz), la corriente atraviesa la pared celular y el medio intracelular. Frec = frecuencia. (Adaptación de Ivorra, A. 2002) .....	119
<b>Figura 3.2.</b> Equipo de medida de la bioimpedancia corneal CORBI. Este dispositivo permite tomar y almacenar datos de forma automática, que posteriormente serán transferidos mediante conexión tipo bluetooth a un ordenador para su análisis. Su funcionamiento se detalla en el Manual de Usuario CORBI (ANEXO II) .....	122
<b>Figura 3.3.A.</b> Imagen del sensor de medida de la bioimpedancia corneal listo para su aplicación sobre la córnea. Consta de un cabezal para su correcta manipulación y conexión al equipo de medida CORBI .....	123
<b>Figura 3.3.B.</b> Esquema del apoyo del sensor flexible sobre la superficie corneal (Adaptación de Guimerà, A. 2013).....	123
<b>Figura 3.4.</b> Imagen de la medida de bioimpedancia epitelial. Se observa la aplicación del sensor sobre la superficie corneal del conejo.....	130

- Figura 3.5.** Representación de los valores de impedancia para los ojos control y los ojos que llevaron LC para las tres visitas del estudio: medida basal, medida después de un día con la LC, y medida después de 7 días con la LC. Los valores se representan como la media de cada grupo.....138
- Figura 3.6.** Imágenes de la evaluación de la superficie corneal mediante tinción con fluoresceína en la observación con lámpara de hendidura y luz azul cobalto (A y C), e imágenes de microscopía óptica de la evaluación histopatológica (B y D). Imágenes A y B = ojo control. A nivel macroscópico (A) no se aprecia tinción por fluoresceína en la superficie ocular. A nivel histopatológico (B) no se observan alteraciones. Imágenes C y D = ojo tras 7 días de porte de LC. A nivel macroscópico (C) se aprecia un parche de tinción por fluoresceína (úlceras). A nivel histopatológico (D) se observa una bulla intraepitelial (separación de las células del epitelio) secundaria a edema.....139
- Figura 3.7.** Imagen de la medida de la bioimpedancia corneal, donde se puede observar la aplicación del sensor de medida sobre la superficie corneal del sujeto. Arriba: imagen frontal. Abajo: imagen de perfil.. .....155
- Figura 3.8.** Imágenes de la evaluación de la superficie corneal mediante tinción con fluoresceína y observación con lámpara de hendidura y luz azul cobalto del ojo que presentó queratopatía punteada superficial tras 3 días (B) y 7 días (C) de porte de una LC de bajo Dk (Etafilcon A) respecto del momento inicial del estudio (A, imagen basal). Las imágenes fueron siempre tomadas inmediatamente después de realizar la medida de bioimpedancia .....161
- Figura 3.9.** Correlación entre permeabilidad epitelial y edema epitelial .....169
- Figura 3.10.** Correlación entre permeabilidad epitelial y edema corneal total.....169
- Figura 3.11.** Correlación entre permeabilidad endotelial y edema corneal total.....170
- Figura 3.12.** Correlación entre edema epitelial y edema corneal total .....170
- Figura 4.1.** Distribución de las tres zonas en que se divide la córnea.....184
- Figura 4.2.** Representación de las cinco localizaciones donde se recogieron los valores de paquimetría corneal .....193
- Figura 4.3.** Representación esquemática de los momentos de medida del "Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo". Las medidas se obtuvieron en dos momentos diferentes: antes de adaptar las LC (medida basal) y después de 7 días de porte prolongado de las LC (medida final), coincidiendo con las visitas 2 y 4 del "Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en modelo humano" .....220

# ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de la Varianza
BAC	Cloruro de benzalconio
CCT	Central corneal thickness / Espesor corneal central
CL	Contact lens
CORBI	Corneal - Bioimpedance (equipo de medida)
D	Dioptría
Dk	Permeabilidad al oxígeno
Dk/t	Transmisibilidad al oxígeno
DS	Desviación estándar
F	Faradio
FDA	U.S. Food and drug administration
HEMA	Hidroxietil metacrilato
IC	Intervalo de confianza
IRP	Índice relativo de progresión
KHz	Kilohercio
LoA	Límite de acuerdo
LC	Lente de contacto
LCH	Lente de contacto hidrofílica
LCHC	Lente de contacto de hidrogel convencional (HEMA)
LCHSi	Lente de contacto de hidrogel de silicona
LCPMMA	Lente de contacto de polimetil metacrilato
LCRPG	Lente de contacto rígida permeable a los gases
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
NA+ - K+	Bomba metabólica sodio - potasio
N4	Periferia nasal, a 4 mm del centro de la córnea
N4 / CCT	Ratio entre el centro y la periferia nasal a 4 mm del centro
N4 / T4	Ratio entre la periferia nasal y temporal a 4 mm del centro
N5	Periferia nasal, a 5 mm del centro de la córnea

N5 / CCT	Ratio entre el centro y la periferia nasal a 5 mm del centro
N5 / T5	Ratio entre la periferia nasal y temporal a 5 mm del centro
OCT	Tomografía de coherencia óptica (siglas en inglés)
P	Pachymetry / Paquimetría
PMMA	Polimetil metacrilato
SPSS	Statistical Package for Social Science
TER	Translayer electrical resistance
TJ	Tight Junctions o uniones estrechas
T4	Periferia temporal, a 4 mm del centro de la córnea
T4 / CCT	Ratio entre centro y periferia temporal a 4 mm del centro
T5	Periferia temporal, a 5 mm del centro de la córnea
T5 / CCT	Ratio entre centro y periferia temporal a 5 mm del centro
µm	Micrómetro

# ENGLISH SUMMARY

## 1. MOTIVATION AND ORGANIZATION

### 1.1. MOTIVATION

It is well known that corneal morphology and physiology are altered by the use of contact lenses (CL). The impact of CL wear on the ocular surface is a subject that has been studied intensively by clinicians and researchers.

At a morphological level, one of the most studied changes induced by CL wear is the increase in the thickness of the cornea, known as corneal oedema. The degree of oedema is classically determined by calculating the percentage of change in corneal thickness after using CL, and is accepted as a parameter to assess its impact on the cornea and determine the safety of CL use.

In the clinical practice, the measurement of the corneal oedema is usually obtained from the central location of the cornea, which means that the effect of the CL wear on the peripheral thickness is less understood. It has recently been postulated that any corneal oedema induced by hydrophilic CL (HCL) wear is evenly distributed between the centre and the periphery of the cornea.<sup>1</sup> However, this is a controversial point since different studies have presented various hypotheses relating to the regional distribution of oedema (e.g. across different corneal regions), as will be described below.

Furthermore, the progression of corneal thickening from the centre to the periphery and the pachymetric differences (asymmetry) between the nasal and the temporal periphery have rarely been taken into account in previous studies that aimed to evaluate the corneal oedema after CL use. One of the objectives of this thesis is to assess and quantify the impact of HCL wear on corneal thickness not only in terms of the percentage of change (oedema), but also by studying the behavior of the asymmetry at different points of the corneal

topography. This study would provide new knowledge that could help elucidate the mechanisms of corneal oedema induced by the use of CL.

At a physiological level, it is accepted that the cornea swells when the mechanisms that maintains the level of corneal dehydration fails, resulting in an increase in corneal thickness and consequently loss of transparency.<sup>2</sup> The responsibility for maintaining this level of dehydration falls on the corneal endothelium, which has an active (metabolic) as well as a passive (barrier) function. The primary aim of these functions is to maintain the balance between the fluids on both sides of the cornea – anterior chamber boundary. Disruptions of the endothelial function may lead to an imbalance in fluid exchange and a consequent thickening of the cornea occurs.

There is only one technique currently available for the direct assessment of the barrier function of the corneal endothelium in humans *in vivo*, namely fluorophotometry. It basically consists on the instillation of fluorescein anteriorly and posterior measurement of the amount of fluorescein in cornea and anterior chamber by non-invasive optical methods. This technique has a number of disadvantages that will be detailed below, which make it an unreliable and not popular technique. Nevertheless, it remains being the only available tool to evaluate not only the barrier function of the corneal endothelium but also the barrier function of the corneal epithelium in humans *in vivo*.

It seems reasonable to look for new technologies to quantitatively determine the status of the barrier function of the corneal endothelium and epithelium, which can be applied not only to the evaluation of CL users but also to study different endothelial abnormalities such as dystrophies, evaluate the suitability of donated corneas for transplantation or monitoring of patients undergoing any type of surgery likely to cause corneal oedema.

A different approach for the quantification of the barrier function of these layers is by the study of the passive electrical properties of the cornea.<sup>4</sup> Unfortunately, the investigations conducted to date in this area cannot be transferred to the clinical practice in humans due to the invasive nature of the method. However, a new technique, corneal bioimpedance, has recently been proposed. This method, which is based on the passive electrical properties of the cornea, can be used to determine the permeability of the corneal epithelium and endothelium non-invasively *in vivo* in animal models. One objective of this thesis was to evaluate the ability of this method to detect changes induced by the use of HCL in an animal model *in vivo*, and the safety and efficacy of the technique in a human model *in vivo*. The application of this new tool to the

study of the epithelial and endothelial barrier function in humans *in vivo* would enhance the understanding of the physiological mechanisms that produce corneal oedema as a response to hypoxia induced by the use of HCL.

In summary, in this thesis HCL-induced corneal oedema will be studied using two different approaches: (1) the classic approach with a focus on morphological changes of the cornea (analyzing regional differences in corneal oedema, with the aim to clarify the controversy relating to the distribution of the oedema between centre and periphery); and (2) a novel and innovative approach with a focus on the physiology of the cornea (using the corneal bioimpedance technique to evaluate changes in corneal permeability after HCL wear and determining its safety in humans).

## 1.2. ORGANIZATION

This Doctoral thesis applies for the International-awarded Doctorate Degree. It has been organized under the regulations of the International Doctorate Committee of the University of Valladolid, including a general summary in English and providing a certificate of stay of three months length at the Vision Sciences unit of the Department of Life Sciences at Glasgow Caledonian University in Glasgow, UK.

This summary is structured as follows:

- Chapter 1: Organization. The structure of the English summary is presented.
- Chapter 2: Background. Overview of the relevant characteristics of the corneal morphology and physiology, corneal evaluation techniques and corneal oedema induced by CL wear.
- Chapter 3: Corneal bioimpedance. Basic concepts to understand the workings of this technique, which is able to measure the permeability of the corneal layers in a non-invasive way and *in vivo*, are presented. Two different studies are summarized regarding the use of corneal bioimpedance (1) “*Study of the corneal epithelial permeability in a contact lens animal model*” and (2) “*Study of the corneal epithelial and endothelial permeability in a contact lens human model*”. The main purpose

of these studies was to evaluate the safety and efficacy of this tool for its future application in the clinical practice.

- Chapter 4: Corneal asymmetry. The anatomical differences between the centre and the periphery of the cornea, with special attention to the corneal thickness differences, are presented. Two different studies are presented: (1) "*Study of the corneal thickness asymmetry in a short-period of time contact lens wear model*" and (2) "*Study of the corneal thickness asymmetry in a medium-period of time contact lens wear model*". The main purpose of these studies was to evaluate the topographical (regional) distribution of corneal oedema induced after HCL wear, and to study if it is evenly distributed between the centre and the periphery or if there is a zone with a greater oedema.
- Chapter 5: Synthesis. A summary of the results achieved in this thesis is presented, as well as the clinical relevance, future directions and conclusions.

## 2. BACKGROUND

### 2.1. CORNEAL MORPHOLOGY

The cornea is the major refractive element of the eye, contributing approximately 43 of the 60 diopters (D) of the eye optical system and accounting for approximately 70% of the total refraction.<sup>6</sup> The cornea measures approximately 11 mm vertically and 12 mm horizontally in adult humans,<sup>7</sup> and its anterior radius of curvature averages 7.8 mm.<sup>6</sup> The cornea is approximately 535  $\mu\text{m}$  thick<sup>8</sup> and it is composed of five different layers: the epithelium, Bowman's membrane, the stroma, Descemet's membrane and the endothelium. The outermost layer is the corneal epithelium, which is approximately 50-60  $\mu\text{m}$  thick.<sup>7</sup> This layer is responsible for both protecting the eye from foreign material and absorbing oxygen and other nutrients. The next layer is Bowman's membrane, which is approximately 8-12  $\mu\text{m}$  thick.<sup>7</sup> Although its role is not entirely clear, this layer may maintain the integrity of the corneal structure or act as a barrier against infections. The next layer is the stroma, which comprises 90% of the total thickness of the cornea.<sup>19</sup> It is made up of

keratocytes that lie between a distribution of collagen fibrils that are regularly packed within lamellae, comprising a denser organization in the anterior stroma than in the deeper tissue.<sup>7</sup> This structure produces minimal light scattering (less than 1%),<sup>20</sup> providing a transparent cornea. If any dysfunction appears in any of these components, a loss of transparency and/or function can occur. Descemet's membrane adheres to the stroma. This tissue progressively thickens with age<sup>7</sup> and is predominantly comprised of collagen type IV. Finally, the innermost corneal layer is the endothelium. It is a mono-cellular layer approximately 4-6  $\mu\text{m}$  thick,<sup>7</sup> and its main role is to control swelling and the stromal hydration level in order to maintain corneal transparency. The endothelial cells do not regenerate in adult humans.<sup>19,20</sup>

## 2.2. CORNEAL PHYSIOLOGY

The barrier function of the corneal epithelium and endothelium plays a vital role for protecting the eye of the external contamination<sup>12</sup> (as microbial infections) and maintaining the level of stromal hydration<sup>28</sup> (around 78%), respectively. For the epithelium and endothelium to work efficiently as a barrier, paracellular spaces must be sealed by intercellular junctions known as tight junctions (TJ).<sup>29</sup>

A leaky epithelial barrier function would permit the penetration of environmental pathogens through it and a sight-threatening bacterial infection may occur. *Pseudomonas aureoginosa* has been consistently identified as the most common infectious pathogen, commonly associated with CL use.<sup>32</sup> The epithelial barrier function can be disrupted as a result of several factors, such as inflammation processes, dry eye, allergic diseases, trauma, surgery or CL wear.<sup>32-34</sup>

In the case of the endothelium, it is responsible for the maintenance of the normal hydration of the stroma and the corneal transparency.<sup>21</sup> However, these functions do not fall solely on the barrier function (TJ form a barrier to the fluid movement from the aqueous humor to the stroma), but also on an active pump (that draws water from the stroma to the aqueous humor)<sup>35</sup> (figure I). A leaky endothelium barrier function would increase the rate of fluid penetration into the stroma, exceeding the rate of the endothelial active fluid transport, and therefore unbalancing the equilibrium between both mechanisms and inducing corneal oedema that could lead to the loss of transparency and hence visual loss.<sup>28</sup> The endothelial barrier function can be disrupted as a consequence of

CL wear, surgery, or several endothelial diseases such as Fuchs' dystrophy, polymorphous dystrophy, etc.

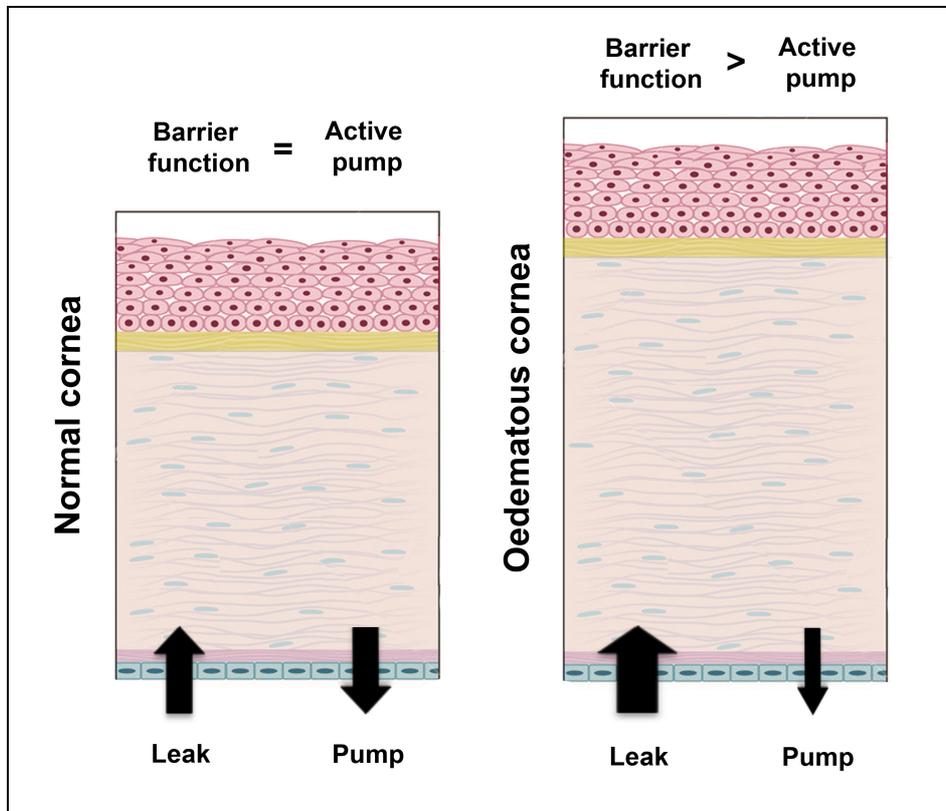


Figure I. Representation of the hydration regulation in a normal corneal physiology (left) and in an oedematous cornea (right). When the corneal endothelial barrier function fails, a greater filtration from the anterior chamber into the stroma occurs. The active pump function is not able to counteract this condition, and the balance between the two functions is lost, causing corneal oedema. (Adapted from Srinivas, SP. 2010)<sup>28</sup>

### 2.3. PHYSIOLOGICAL EVALUATION – INDIRECT TECHNIQUES

The techniques used in the daily clinical practice to assess the epithelial and endothelial barrier function or permeability are based on indirect measurements methods.

To evaluate the epithelium, a fluorescein test can be performed, consisting on the topical instillation of fluorescein dye over the corneal surface and observe any macroscopic sign of epithelial damage in form of bright green

dots, that would mean that the epithelium is injured at a stage to elucidate.<sup>71,72</sup> However, this cannot be directly related to the epithelial barrier function, as the fluorescein staining seems to dye apoptotic cells. If the fluorescein does not dye the intercellular spaces (responsible for the epithelial barrier function) there is no more than an indirect evaluation of the epithelial health, but no information about the epithelial permeability will be obtained.

To evaluate the endothelium permeability the degree of corneal oedema (as the endothelium is responsible for the maintenance of the stromal hydration) is determined by calculating the difference in corneal pachymetry before and after a given exposure (such as CL wear, corneal surgery, etc). Traditionally, corneal oedema is represented as a percentage of change on the corneal pachymetry<sup>38</sup> (table I).

$$\% \text{ oedema} = [(P_{\text{final}} - P_{\text{basal}}) / P_{\text{basal}}] \times 100$$

Table I. Formula used to calculate the corneal oedema.

$P_{\text{final}}$  = final pachymetry.  $P_{\text{basal}}$  = basal pachymetry.

There are a number o techniques and devices available in clinical practice to obtain corneal pachymetry, not only at the centre of the cornea but also on the periphery. Some of the most popular technologies used are those based on ultrasound pachymetry, specular microscopy, confocal microscopy, optical coherence tomography, slit-scanning elevation topography or Scheimpflug topography.<sup>39-67</sup>

## 2.4. PHYSIOLOGICAL EVALUATION – DIRECT TECHNIQUES

To date, the only way to assess the function of the human epithelial and endothelial barriers *in vivo* is by fluorophotometric methods that calculate the rate of penetration of fluorescein dye into these layers.<sup>72</sup> Unfortunately, this technique is not sufficiently accurate to monitor patient's changes.<sup>80</sup> Furthermore, it has been recently questioned what exactly fluorescein stains,<sup>118</sup> making this method a relatively unreliable tool. The inconsistencies between the published studies on the epithelial<sup>84,85</sup> and endothelial<sup>78,86,87</sup> permeability using fluorophotometric measurements indicate that its use and interpretation require some caution.

It is also possible to evaluate the function of the epithelial and endothelial barriers *in vivo* by studying the passive electrical properties of these tissues in an animal model.<sup>73</sup> However, the techniques used nowadays are relatively invasive and cannot be applied to clinical practice in humans. Experimentation in animal model consists on the placement of one electrode on the epithelial surface of the cornea and another one into the anterior chamber by making an incision on the peripheral cornea (figure II).<sup>94-97</sup>

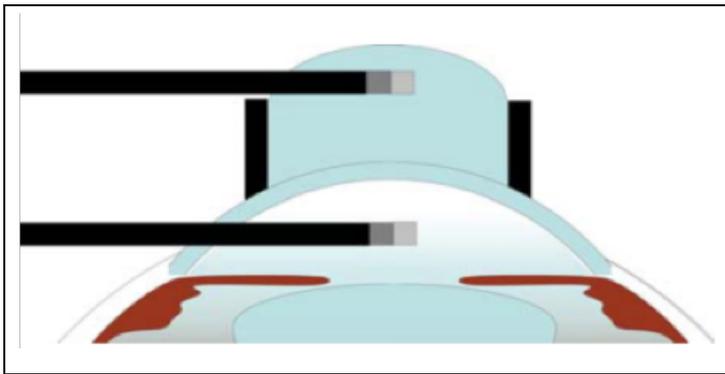


Figure II. Representation of the placement of electrodes necessary to carry out the TER measurement in an *in vivo* animal model. (Adapted from Uematsu, M. 2007)<sup>94</sup>

## 2.5. CORNEAL OEDEMA INDUCED BY CONTACT LENS WEAR

In general terms, CL are classified into two main types of lenses depending on the material they are made of: rigid gas-permeable CL (RGPCL) or soft HCL.<sup>101</sup> Interaction between CL and cornea will depend on the CL characteristics, its material and design. The ability of a given CL to maintain the normal corneal homeostasis is determined by the quantity of oxygen that the lens is able to transmit from the environment to the corneal tissue across the epithelium.<sup>102</sup> There are two parameters to evaluate the quantity of oxygen transmitted to the cornea:<sup>103</sup>

- Oxygen permeability (Dk): is the intrinsic ability of a given material to transport oxygen.<sup>104</sup>
- Oxygen transmissibility (Dk/t): is the quantity of oxygen transmitted to the cornea, which is not only dependent on the CL material (Dk), but also on the CL design (including refractive power and CL thickness).<sup>105</sup>

## 3. CORNEAL BIOIMPEDANCE

### 3.1. PRINCIPLES AND DESCRIPTION

Electrical bioimpedance is a diagnostic tool based on the study of the electrical properties of a given biological tissue. It can be said that it consists on the evaluation of the response of the tissue when an electrical current is applied through it. In other words, it is the study of the opposition/resistance that the biological sample offers for the current to flow through. The bigger the resistance of the tissue, the smaller is its electrical conductivity or permeability of the biological sample, and vice versa.

If this principle were transferred to the ophthalmological field, it would be possible to obtain information about the corneal epithelial and endothelial permeability by applying an electrical current to the corneal tissue. The resistance that these layers offer to the current could then be studied.

As noted previously (2.4. Physiological evaluation – Direct techniques), it is possible to measure the electrical passive properties (bioimpedance) of the epithelial and endothelial corneal layers, although the technique used is so invasive that it is not currently implemented in humans.

However, recent technological advancements have provided researchers with a new tool based on corneal bioimpedance measurements that consist of an electrical sensor (figure III) which can be applied to the corneal surface, and which then obtains data of the corneal response non-invasively. It has been shown that its application does not cause any damage to the corneal surface in rabbits, and also that the technique is capable to detect corneal barrier function alterations.<sup>109,110</sup>



Figure III. Sensor for measuring the corneal bioimpedance ready for its application to the cornea.

## **3.2. STUDY OF THE CORNEAL EPITHELIAL PERMEABILITY IN A CONTACT LENS ANIMAL MODEL**

The purpose of the present study was to present a proof of concept of the application of this novel technique based on the bioimpedance measurement for the non-invasive *in vivo* assessment and quantification of CL-induced changes in the rabbit corneal epithelium barrier function.

### **3.2.1. Methods**

#### 3.2.1.1. Animals

A total of 20 New Zealand White rabbits were included in the experiment. All of the animals were treated according to the guidelines produced by the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) when using animals in Ophthalmic and Visual Research and under the supervision of the University of Valladolid Institutional Committee for Animal Care and Use.

#### 3.2.1.2. Procedure

A prospective study involving two study groups (n=10 each) was defined to analyse CL-induced changes in rabbit corneal epithelium permeability after one day (Group 1) and seven days (Group 2) of extended CL wear.

In the baseline visit, all animals were anaesthetized with an intramuscular injection of 50 mg/kg of ketamine (Imalgene 1000®, Merial) and 7 mg/kg of Xylazine (Rompun®, Bayer), prior to any measurement or CL fit. Baseline measurements of the epithelial impedance were collected previous to any other procedure. To accomplish this, a prototype was used following the described procedure in previous works.<sup>109,110</sup> Then, baseline measurements of the central corneal thickness were collected with an ultrasound pachymeter (Sonogage Corneo-Gage Plus, Cleveland, OH, USA).

After baseline impedance and pachymetry measurements were collected, a single CL was randomly fitted in each animal (see below). At the end of the visit, ten rabbits were randomly assigned to Group 1 (one day of CL wear) and the other ten animals to Group 2 (seven days of CL wear).

After one day of CL wear (Group 1) and seven days of CL wear (Group 2) a second epithelial impedance and central corneal pachymetry readings were taken immediately after CL removal (and under the same intramuscular anaesthesia). The corneal epithelium was also examined with a slit-lamp biomicroscope under blue cobalt light after the instillation of topical fluorescein on both eyes in search for detectable corneal epithelial alterations.

Animals were then euthanized by an intravenous injection of 200 mg/kg of pentobarbital (Dolethal Vetoquinol)<sup>®</sup> and their eyes were immediately enucleated and the corneas removed for histopathological analysis.

### 3.2.1.3. Lenses

A low Dk CL (Vasurfilcon A, +10.00 D, Dk=38, Precision UV, Ciba Vision, Duluth, GA, USA) was randomly fitted to one eye of each animal and the fellow eye served as a control. Low Dk ensures corneal hypoxia and hence possible changes in the epithelium permeability. After CL fitting, a complete closure of the palpebral aperture by sutures (6-0, Mersilk<sup>®</sup>; Ethicon, France) was used to enhance the hypoxic effect and improve CL retention.

### 3.2.1.4. Histopathological analysis

All corneas were examined histologically by conventional optical microscopy by a masked pathology specialist. Corneas were fixed in 10% neutral-buffered formalin (Panreac, Spain), routinely processed and then embedded in paraffin. Multiple serial sections (3 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and examined in an automated upright microscope (LEICA DM 4000 B, Leica, Germany). A normal distribution and composition of the epithelium was evaluated and compared with corneal staining results.

### 3.2.1.5. Data analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical package for Windows.

The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of the data distribution. Appropriate parametric tests were used to assess differences. Descriptive statistics were generated. A student paired t-test was used to detect differences between control eyes and CL-wearing eyes. Analyses of variance with post hoc comparisons (ANOVA with Bonferroni correction) were used to detect differences between the baseline visit, after one day of CL wear and after

seven days of CL wear for both the control eyes and the CL-wearing eyes in pachymetry and corneal epithelial permeability. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

### 3.2.2. Results

#### 3.2.2.1. Corneal swelling

Corneal pachymetry is summarized in table II. No statistical significant differences were found between control eyes and CL-wearing eyes in baseline visit for pachymetry ( $p=0.208$  Student paired t-test). However, after one day (Group 1) and seven days (Group 2) of CL wear, corneal pachymetry and corneal swelling significantly increased for the CL-wearing eyes ( $p<0.001$  ANOVA with Bonferroni correction), showing also significant differences respect to the Control eyes in both groups ( $p<0.001$  Student paired t-test).

	Baseline	Group 1 (1 day of CL wear)	Group 2 (7 days of CL wear)	P†
<b>Control eyes</b>				
Pachymetry ( $\mu\text{m}$ )	375 $\pm$ 0.15	373 $\pm$ 0.14	375 $\pm$ 0.17	0.348
% corneal swelling	-	-1.53 $\pm$ 4.09%	-0.71 $\pm$ 4.47%	0.140
<b>CL-wearing eyes</b>				
Pachymetry ( $\mu\text{m}$ )	374 $\pm$ 0.11	462 $\pm$ 0.30	535 $\pm$ 1.36	<0.001
% corneal swelling	-	26.58 $\pm$ 9.56%	42.46 $\pm$ 36.96%	<0.001
<b>P*</b>				
Pachymetry ( $\mu\text{m}$ )	0.208	<0.001	<0.001	
% corneal swelling	-	<0.001	<0.001	

Table II. Pachymetric results for the Control eyes and the CL-wearing eyes for the baseline visit and after one day (Group 1) and seven days (Group 2) of CL wear. P\*: Student's paired t-test. P†: ANOVA with Bonferroni correction.

### 3.2.2.2. Epithelial staining and histopathology evaluation

Corneas of the control eyes showed no sign of corneal staining (figure IV.A), with little evidence of epithelial damage using optical microscopy in histopathological evaluation (figure IV.B). However, corneas of the CL-wearing eyes showed clinical signs of epithelial staining (figure IV.C), with clear alteration of the epithelium layer using histopathological evaluation (figure IV.D).

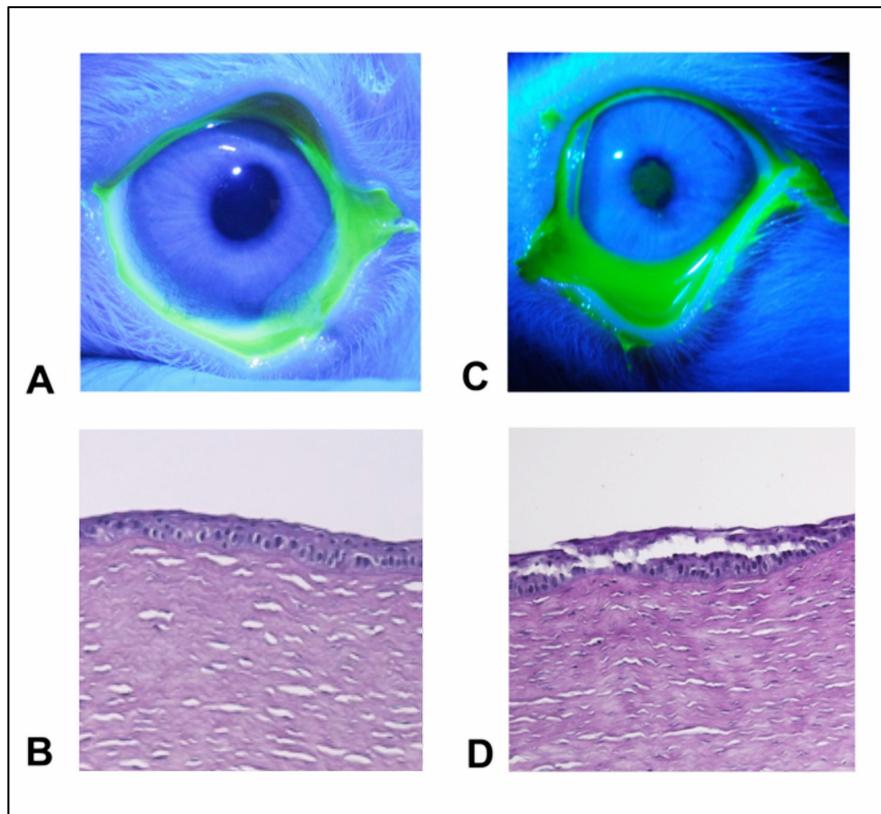


Figure IV. Images from the fluorescein staining test (figures A and C) and its correspondent optical microscopy from histopathological evaluation (figures B and D). A and B: images of a control eye; C and D: images of a CL-wearing eye after seven days of CL use.

### 3.2.2.3. Corneal epithelial permeability

Epithelial impedance values are summarized in table III. Control eyes showed no statistically significant differences along the study (between baseline, Group 1 and Group 2) in epithelial permeability ( $p=0.884$  ANOVA with Bonferroni correction). However, CL-wearing eyes showed a initial decrease in the epithelial permeability after one day of CL wear (Group 1), to steeply

increase after seven days of CL wear (Group 2) ( $p < 0.001$  ANOVA Bonferroni correction).

Basal values of impedance measurements (epithelial permeability) showed no statistical significant differences between control eyes and CL-wearing eyes ( $p = 0.222$  Student paired t-test). After one day (Group 1) and seven days (Group 2) of CL wear, statistical significant differences were found for the epithelial permeability between both the control eyes and the CL-wearing eyes ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$  respectively. Student paired t-test).

	<b>Baseline</b>	<b>Group 1 (1 day of CL wear)</b>	<b>Group 2 (7 days of CL wear)</b>	<b>P†</b>
<b>Control eyes</b>				
Impedance ( $\Omega$ )	-1451.99 $\pm$ 396.72	-1472.81 $\pm$ 405.60	-1464.29 $\pm$ 355.36	0.884
<b>CL-wearing eyes</b>				
Impedance ( $\Omega$ )	-1495.24 $\pm$ 377.20	-1833.77 $\pm$ 377.88	-1265.18 $\pm$ 929.33	<0.001
<b>P*</b>	0.222	<0.001	<0.05	

Table III. Epithelial impedance results for the Control eyes and the CL-wearing eyes for the baseline visit and after one day (Group 1) and seven days (Group 2) of CL wear. P\*: Student's paired t-test. P†: ANOVA with Bonferroni correction.

### 3.2.3. Discussion

Corneal swelling after CL wear is widely reported in the literature.<sup>49,113</sup> It has been also been shown that epithelial permeability increases when it is subjected to hypoxic conditions, both when examined by TER measurements *in vitro*<sup>114,115</sup> or by fluorophotometric methods *in vivo*.<sup>77,116</sup>

The only method currently available to assess the human epithelial permeability *in vivo* is by measuring the penetration rate of fluorescein dye into the cornea. Duench<sup>77</sup> has recently shown that daily wear of high-Dk CL (Betafilcon A) increases the epithelial permeability to fluorescein. An increase of the epithelial permeability represents a threat to the maintenance of the corneal health and homeostasis, as it is susceptible to microbial infections that could lead to a loss of corneal transparency and hence visual impairment. Accordingly, knowing the state of the epithelial barrier function is a major issue for the eye-care community.

Unfortunately, there is a lack of techniques that are capable of detecting and quantifying changes in the physiology of the corneal epithelium *in vivo* as a result of CL wear. A new tool to evaluate corneal epithelial permeability changes after the application of different concentrations of benzalkonium chloride *in vivo* in a rabbit model has recently been validated.<sup>110</sup> In the present study this novel tool has been used for the first time to detect and quantify the corneal epithelium permeability alterations secondary to HCL induced hypoxia.

### Control eyes

The control eyes showed no statistically significant differences throughout the experiment with respect to any of the anatomical or physiological indicators measured. Therefore, it can be assumed that any differences observed in the CL-wearing eyes along the experiment time can be attributed to the effects of CL wear.

### Changes observed in CL-wearing eyes

As expected, corneal thickness increased moderately after one day of CL and drastically after seven days of CL wear. Epithelial staining and histopathologic evaluation also showed the epithelium affected. However, an ongoing debate exists about what is actually stain by fluorescein, and therefore what corneal staining represents,<sup>102,118</sup> raising concerns about the reliability of the technique in epithelial examination.

Epithelial conductivity decreased after one day of CL wear, which means that the epithelial permeability decreases. As the permeability of the epithelial layer is directly related to extracellular space,<sup>119,120</sup> the latter may decrease as a consequence of cell swelling, which has been described after

soft CL-induced hypoxia.<sup>121</sup> There is some controversy in this respect, as some authors have reported corneal epithelial thinning after soft CL wear,<sup>121</sup> corneal epithelial thickening,<sup>123</sup> or even no changes at all in the epithelial thickness after soft CL wear.<sup>124</sup>

After seven days of CL wear epithelial conductivity showed an increase with respect to values after one day of CL wear, also exceeding the basal values. This increase in permeability of the epithelial layer suggests that the damage induced to the corneal epithelium due to CL wear over seven days is sufficient to break the tight junctions between the epithelial cells. This is indicated by the fact that the current can pass more easily through the extracellular gaps induced, and therefore induce corneal swelling. The latter may be explained by an additive effect of direct breakdown of the epithelial barrier and ensuing fluid penetration from the ocular surface to the early dysfunction of the corneal endothelium and consequent stromal hydration from the aqueous humour.

This study has several strengths. It has shown for the first time that epithelial permeability can decrease in the early stages of the process that comprise the epithelial response to hypoxic conditions (when wearing CL). The study has also shown that at any subsequent time points (still to be determined) the epithelial tight junctions cannot longer resist and hence the epithelial permeability increases. Our results confirm previous findings<sup>77,114-116</sup> by performing an *in vivo* evaluation of the corneal epithelium based on bioimpedance measurements.

However, this new impedance technique also has limitations. Further studies and the confirmation of a robust correlation between the results of *in vivo* evaluation of the corneal epithelium based on impedance measurements and those based on other technologies would support the transfer of this technology into the clinical practice. Additionally, the absence of normative data limits the results of the current investigation to the finding of statistically significant differences between only the specific groups and times evaluated. Efforts should be directed toward elucidating the mechanical basis of the corneal response and alterations in epithelial barrier function secondary to CL wear, any corneal surgery or the effects of eye drops medications.

In conclusion, our results suggest that *in vivo* evaluation of the corneal epithelium based on impedance measurements allows non-invasive and quantitative assessment of the epithelium barrier function. Data of healthy and oedematous corneas obtained with this method in the present study are in concordance with results obtained by pachymetry evaluation, fluorescein

staining and histopathology (optical microscopy). Further studies are needed to analyse the relationship between the epithelial permeability changes to the extracellular spaces in the tissue and to the tight junctions function.

Developing new tools to help researchers and eye-care practitioners in acquiring quantitative information to have direct access to an *in vivo* study of the changes in corneal physiology would permit an innovation in the diagnosis and management of some corneal pathologies, improvement in early diagnosis, prevention of corneal disease, a change in the current method of corneal assessing and an opportunity for the eye-care community to obtain a deeper understanding of the physiology of the cornea.

Future applications of this new technique in clinical practice include the assessment and follow up of the epithelial barrier function changes secondary to CL wear, postoperative assessments after ocular surgery; and the evaluation of the impact of CL care solutions including ophthalmic preservatives on the corneal surface.

### **3.3. STUDY OF THE CORNEAL EPITHELIAL AND ENDOTHELIAL PERMEABILITY IN A CONTACT LENS HUMAN MODEL**

In this work, the same novel non-invasive method based on the study of the passive electrical properties of the cornea (in terms of corneal bioimpedance) was used to measure quantitatively the state of the human corneal barrier function *in vivo*. The results of previous studies<sup>109,110</sup> and those obtained in the study 3.2. of this thesis concluded that this method is able to detect minimal alterations in the permeability of the rabbit corneal barriers in a safe way.

In the present study, the safety and efficacy of this bioimpedance prototype was assessed for the first time in human corneas under *in vivo* conditions.

#### **3.3.1. Methods**

The safety and efficacy of the proposed sensor to assess the human corneal epithelium and endothelium permeability were evaluated in this work.

Approval was granted by the Human Sciences Ethics Committee of the University of Valladolid and the Spanish Agency for Medicines and Medical Devices (AEMPS) of the Ministry of Health, Social Services and Equality of Spain.

#### 3.3.1.1. Subjects

Ten right eyes from ten volunteers were included in this pilot study. Healthy subjects with no history of anterior segment disease and with no history of ocular surgery were included. No CL use was allowed seven days before the beginning of the study. The full nature of the study was explained to participants and informed consent was obtained from each subject. All of the subjects were treated in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

#### 3.3.1.2 Lenses

A low-Dk CL (Etafilcon A, Dk= 28, Acuvue 2, Johnson & Johnson, Jacksonville, FL) or a high-Dk CL (Lotrafilcon B, Dk= 110, Air Optix Aqua, Ciba Vision, Duluth, GA) was randomly fitted in the right eye of each subject. The differences in the Dk of these CL ensure different levels of hypoxia to develop and thus different degrees of corneal swelling and permeability changes.

#### 3.3.1.3. Instrumentation

Evaluation of corneal health was carried out with the slit-lamp biomicroscope SL-8z (Topcon Medical Systems Inc., Paramus, NJ, USA) and fluorescein dye under blue cobalt light. Images were captured for each subject at every visit.

Central corneal thickness (CCT) and epithelial corneal thickness (EPC) were monitored with the 3D OCT-2000 (Topcon Medical Systems Inc., Paramus, NJ, USA).

Epithelial and endothelial bioimpedance measurements were monitored throughout the study: previous to CL wear and after three days and one week of extended (overnight) CL wear; with a prototype of the bioimpedance analysis system. The instrument consists on the placement of a sensor on the corneal surface to perform the measurements (figure V). One drop of double anaesthetic Colircusí® (tetracaína 0.1% and oxybuprocaine

0.4%) was instilled in each eye before placing the sensor onto the ocular surface. The sensor electrodes have to be in contact with the corneal surface to perform the non-invasive bioimpedance measurements. It takes ten seconds approximately to perform every measurement.

The same experimented operator (ADR) took all SL-8z images, the 3D OCT-2000 measurements and the bioimpedance measurements throughout the study.



Figure V. Image captured during a measurement of corneal bioimpedance, where it can be seen the application of the sensor on the corneal surface of the subject. Above: front view. Bottom: side view.

#### 3.3.1.4 Procedures

This prospective, randomized, double-masked, clinical study was conducted over three study visits.

At the first visit (baseline, visit 1), the full nature of the study was explained to participants and informed consent was obtained from each subject prior to any procedure. Then, evaluation and imaging of the corneal surface and basal measurements for CCT, EPC and epithelial and endothelial bioimpedance were taken. Corneal health evaluation and imaging of the corneal surface were carried out by assessing the ocular surface for signs of damage attributable to the sensor application. A low-Dk or high-Dk CL was then randomly selected and fitted to the right eye of each subject. Clinically adequate CL fit was checked, and subjects were asked to attend for their first review appointment (three days after the baseline visit).

The second visit (visit 2) was scheduled after three days of HCL extended wear. Corneal health evaluation of the corneal surface were carried out at first stage. CL was then removed and the bioimpedance measurement was obtained immediately. CCT and EPC were measured. Corneal health evaluation and imaging of the corneal surface were carried out as described for visit 1. At the end of visit 2, the same CL was fitted to the same eye and the correct CL fit was ascertained. Subjects were asked to attend the final visit (four days after visit 2).

The third visit (visit 3) was scheduled after seven days of HCL extended wear. Corneal health evaluation of the corneal surface were carried out. The CL was then removed and the bioimpedance measurement was taken immediately. CCT and EPC were measured. Corneal health evaluation and imaging of the corneal surface were carried out looking for any sign of damage attributable to the sensor application.

#### 3.3.1.5 Data analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical package for Windows.

The Saphiro-Wilk test was used to test the normality of the data distribution. Appropriate parametric tests were used to assess differences. Descriptive statistics were generated.

Analyses of variance (ANOVA) were used to detect differences between low-Dk CL eyes and high-Dk CL eyes; and between the percentage of oedema of visit 2 and visit 3. Analyses of variance with post hoc comparisons (ANOVA with Bonferroni correction) were used to detect differences between visit 1, visit 2, and visit 3 for both the low-Dk CL eyes and high-Dk CL eyes in CCT and ECT pachymetry and corneal epithelial and endothelial permeability. A p value <0.05 was considered statistically significant.

The relationship among CL-induced corneal and epithelial swelling and epithelial and endothelial permeability were evaluated using the Pearson correlation coefficient. Preliminary analyses were performed to ensure no violation of the assumptions of normality, linearity and homoscedasticity. P<0.05 was considered statistically significant.

### **3.3.2. Results**

Ten eyes from ten volunteers were included in this study (six women; four men). The mean age was  $25 \pm 2.7$  years (range: 20 to 28 years). The mean spherical equivalent refraction was  $-2.40 \pm 2.67$  D (range: +0.50 to -7.25 D). Four participants were regular users of CL (three of them were using HCL, the other one was using RGPCL). All of them discontinued CL use at least seven days before the beginning of the study.

#### 3.3.2.1. Corneal health evaluation

The examination of the corneal surface occasionally revealed slight, superficial punctate keratopathy in the low-Dk CL eyes, (figure VI) attributable to the wear of the CL.

Subjects did not report discomfort while performing the measurement of the corneal impedance.

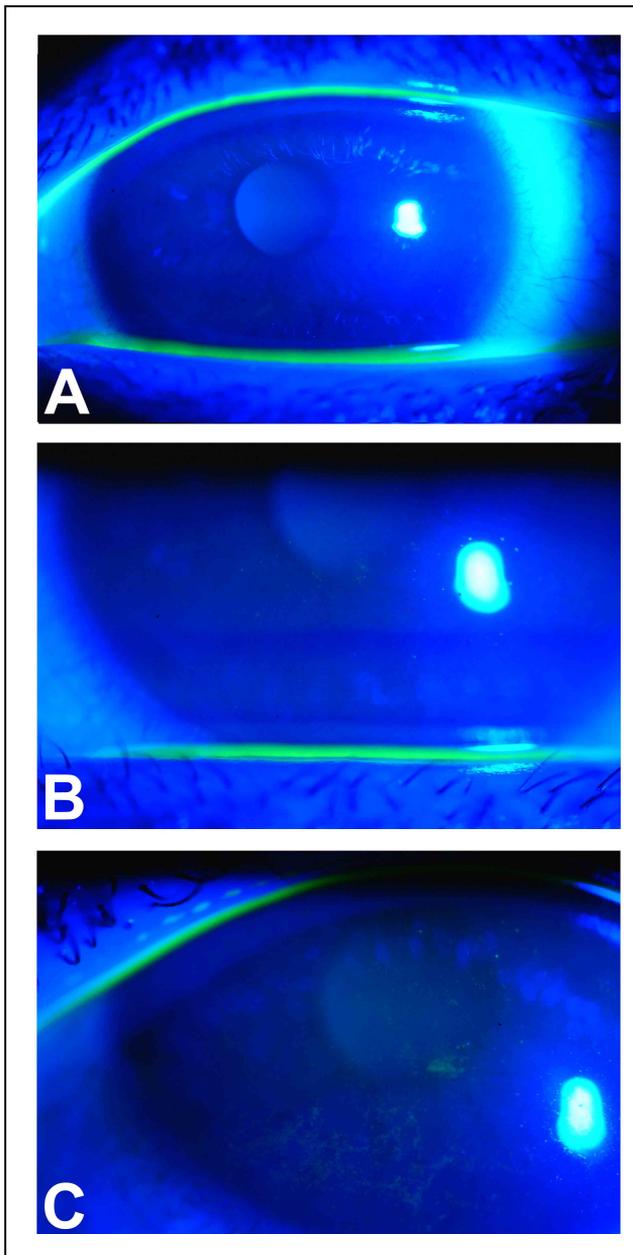


Figure VI. Images of the corneal surface evaluation by slit-lamp observation under cobalt-blue light and fluorescein test in the eye that showed superficial punctate keratopathy after three days (B) and seven days (C) of wear of a low-Dk CL (etafilcon A) with respect to the basal image (A). The images were taken after performing the bioimpedance measurements.

### 3.3.2.2. Central and epithelial corneal thickness

Pachymetric results are summarized in table IV. No statistically significant difference ( $p > 0.05$  ANOVA with Bonferroni correction) over time (between visits 1, 2 and 3) was found for CCT, ECT and epithelial swelling for both high-Dk and low-Dk CL eyes. However eyes fitted with low-Dk CL showed a statistically significant difference ( $p = 0.002$  ANOVA with Bonferroni correction) in corneal swelling, while high-Dk CL eyes showed no statistically difference ( $p > 0.05$  ANOVA with Bonferroni correction).

No statistically significant differences ( $p > 0.05$  ANOVA) were found between high-Dk CL eyes and low-Dk CL eyes at visits 1, 2 and 3 for CCT, corneal swelling and ECT, however statistically significant differences ( $p = 0.014$  ANOVA) were found for the epithelial swelling between high-Dk CL eyes and low-Dk CL eyes at visit 3.

	Visit 1 (Baseline)	Visit 2 (3 days of CL wear)	Visit 3 (7 days of CL wear)	P†	P*
<b>High-Dk CL eyes</b>					
CCT ( $\mu\text{m}$ )	578.87 $\pm$ 28.10	586.66 $\pm$ 27.53	584.60 $\pm$ 29.52	0.904	-
% central oedema	-	1.36 $\pm$ 1.27 %	0.98 $\pm$ 1.10 %	-	0.115
Epithelial thickness ( $\mu\text{m}$ )	53.53 $\pm$ 3.58	52.40 $\pm$ 1.75	53.33 $\pm$ 2.21	0.772	-
% epithelial oedema	-	-1.82 $\pm$ 6.49 %	-0.23 $\pm$ 3.19 %	-	0.759
<b>Low-Dk CL eyes</b>					
CCT ( $\mu\text{m}$ )	541.13 $\pm$ 24.43	554.20 $\pm$ 26.31	554.33 $\pm$ 28.64	0.673	-
% central oedema	-	2.41 $\pm$ 1.07 %	2.42 $\pm$ 1.20 %	-	0.002
Epithelial thickness ( $\mu\text{m}$ )	52.47 $\pm$ 3.45	50.00 $\pm$ 2.37	48.00 $\pm$ 4.75	0.196	-
% epithelial oedema	-	-4.42 $\pm$ 6.97 %	-8.60 $\pm$ 5.09 %	-	0.055
<b>P*</b>					
CCT ( $\mu\text{m}$ )	0.053	0.093	0.139		
% central oedema	-	0.197	0.085		
Epithelial thickness ( $\mu\text{m}$ )	0.644	0.106	0.053		
% epithelial oedema	-	0.558	0.014		

Table IV. Pachymetric results for high-Dk CL eyes and low-Dk CL eyes at each visit.  $p^* < 0.05$  = statistically significant differences between visit 1 and visit 2, and visit 1 and visit 3.  $P^*$  = ANOVA.  $P^\dagger$  = ANOVA with Bonferroni correction.

### 3.3.2.3. Corneal epithelial and endothelial permeability

Table V shows the epithelial and endothelial impedance values for high-Dk CL eyes and low-Dk CL eyes at each visit. High-Dk CL eyes showed no statistical significant differences over the study time (between visits 1, 2 and 3) in the epithelial ( $p=0.904$  ANOVA with Bonferroni correction) and endothelial ( $p=0.581$  ANOVA with Bonferroni correction) permeability. Low-Dk CL eyes showed no statistically significant differences along the study time (between visits 1, 2 and 3) in epithelial ( $p=0.356$  ANOVA with Bonferroni correction) and endothelial ( $p=0.341$  ANOVA with Bonferroni correction) permeability.

No statistically significant differences between eyes fitted with high-Dk and low-Dk CL at visits 1, 2 and 3 were found for epithelial permeability ( $p=0.096$ ,  $p=0.253$  and  $p=0.187$  ANOVA respectively) and for endothelial permeability ( $p=0.526$ ,  $p=0.465$  and  $p=0.114$  ANOVA respectively).

	Visit 1 (Baseline)	Visit 2 (3 days of CL wear)	Visit 3 (7 days of CL wear)	P†
<b>High-Dk CL eyes</b>				
Epithelial permeability ( $\Omega$ )	$230.20 \times 10^4 \pm 13.58 \times 10^4$	$219.24 \times 10^4 \pm 19.30 \times 10^4$	$219.71 \times 10^4 \pm 21.35 \times 10^4$	0.904
Endothelial permeability (F)	$450.08 \times 10^{-5} \pm 111.78 \times 10^{-5}$	$586.02 \times 10^{-5} \pm 391.45 \times 10^{-5}$	$447.31 \times 10^{-5} \pm 244.07 \times 10^{-5}$	0.581
<b>Low-Dk CL eyes</b>				
Epithelial permeability ( $\Omega$ )	$204.48 \times 10^4 \pm 27.29 \times 10^4$	$206.24 \times 10^4 \pm 13.53 \times 10^4$	$160.75 \times 10^4 \pm 88.86 \times 10^4$	0.356
Endothelial permeability (F)	$623.62 \times 10^{-5} \pm 573.96 \times 10^{-5}$	$737.57 \times 10^{-5} \pm 204.04 \times 10^{-5}$	$1212.89 \times 10^{-5} \pm 934.85 \times 10^{-5}$	0.341
<b>P*</b>				
Epithelial permeability ( $\Omega$ )	0.096	0.253	0.187	
Endothelial permeability (F)	0.526	0.465	0.114	

Table V. Epithelial and endothelial permeability results for high-Dk and low-Dk eyes in each visit. P\*= ANOVA. P†= ANOVA with Bonferroni correction.  $\Omega$  = Ohms, F = Farad

#### 3.3.2.4. Correlations

The epithelial permeability showed a high correlation with the percentage of epithelial thinning ( $r^2= 0.817$ ;  $p= 0.004$ ) induced after seven days of CL wear (visit 3).

The epithelial permeability showed a high correlation with the percentage of corneal swelling ( $r^2= -0.643$ ;  $p= 0.045$ ) induced after seven days of CL wear (visit 3).

The endothelial permeability showed a high correlation with the percentage of corneal swelling ( $r^2= 0.646$ ;  $p= 0.044$ ) induced after seven days of CL wear (visit 3).

The percentage of epithelial thinning showed a high correlation with the percentage of corneal swelling ( $r^2= -0.755$ ;  $p= 0.012$ ) after seven days of CL wear (visit 3).

#### 3.3.3. Discussion

Alteration of the corneal physiology and homeostasis have been noted when wearing CL as a result of corneal hypoxia and mechanical trauma.<sup>86,130</sup> These changes may result in the cornea becoming less resistant, and may be associated with high risk for microbial invasion<sup>108</sup> when the epithelial barrier function is affected, and corneal swelling<sup>125</sup> if there is any impairment of the endothelial barrier function. Hence, CL practitioners and the research community have made efforts over the last decades to develop methods to assess the state of the epithelial and endothelial barrier function.

Human epithelial and endothelial barrier function can only be evaluated *in vivo* by using a technique based on fluorophotometry measurements. However, this technique has undergone little evolution since it emerged in the 1960's.<sup>3,75,76</sup> The same methodology described at that time is still used nowadays.<sup>77,78</sup> The principle of estimating corneal epithelial and endothelial permeability by fluorophotometry consists on the instillation of fluorescein dye onto the corneal surface and estimating the permeability of these layers. This is done by calculating concentration changes in cornea and anterior chamber over time.<sup>72</sup> However, despite this technique still being used for assessing the epithelial and endothelial barrier function, the reliability of

fluorophotometry is a concern. It has been reported to be a time-consuming,<sup>79</sup> with a low repeatability,<sup>80</sup> and in need of further refinement to make it a useful clinical tool.<sup>72,81</sup>

The inconsistencies between studies when using this method confirm these limitations. McNamara<sup>84</sup> reported an average increase of 41% in the epithelial permeability after one hour of HCL use with the eyes closed, while Lin<sup>85</sup> found no changes in the epithelial barrier function in their study in subjects that wore HCL for one hour with their eyes closed. Regarding the endothelium, Dutt<sup>86</sup> reported a significant increase of the endothelial permeability in a group of CL wearers (with an average of four years of wear) versus a control group. However, Bourne<sup>87</sup> found no changes on the endothelial barrier function in a group of CL wearers (with at least five years of wear) versus a control group. Finally, Chang<sup>78</sup> showed a decrease of the endothelial permeability when comparing two groups of CL wearers (regarding the years of CL wear) versus a control group.

From these findings it could be concluded that fluorophotometry, despite being the only tool available to assess the epithelial and endothelial barrier function *in vivo*, has a limited clinical value and hence the eye care community needs a more reliable technique capable to detect and monitor changes on the permeability of the corneal layers.

This investigation was conceived in order to establish the safety and efficacy of a new method based on the study of the passive electrical properties of the cornea (corneal impedance) to measure in a quantitative way the state of the human corneal barriers function *in vivo*.

#### 3.3.3.1. Safety

The first concern of this study was to establish if the placement of the sensor on the corneal surface (to perform the impedance measurement) would impair the integrity of the corneal epithelium. Results showed no signs of corneal epithelial injury secondary to the placement of the sensor on the corneal surface after slit-lamp evaluation. Slight superficial punctate keratopathy was found in some of the low-Dk CL eyes, attributable to the CL use. This confirms the safety of this tool to be used in the clinical practice as a non-invasive technique.

### 3.3.3.2. Efficacy

Epithelial permeability (as measured as the epithelial impedance) showed no statistically significant changes throughout the study for high-Dk or low-Dk CL. However, a modest decrease in epithelial permeability (which could be interpreted as an improvement on the epithelial barrier function) was noted for the eyes that wore a low-Dk CL. Accordingly, epithelial pachymetry showed no significant changes during the three visits of the study, although a trend toward the thinning of the epithelium was found for those low-Dk CL eyes. These findings are in accordance with the study of Lin<sup>85</sup> who found the same trend towards the decrease of the epithelial permeability (no statistically significant) in eyes that wore a soft high-Dk CL during one hour. They could not explain at that moment the reason why the epithelial barrier function seemed to improve, giving some kind of protective effect to the fact of wearing high-Dk CL. In this thesis it has also been monitored the epithelial thickness, showing a thinning trend for the epithelium. These results suggests that the extracellular space in the epithelium decreases due to cell swelling and therefore does the permeability of the epithelial layer, as the current finds more trouble to pass across the tissue.

Endothelial permeability showed no statistically significant differences between the baseline measurements and those obtained after three and seven days of CL use, independently of the CL used; neither between high-Dk or low-Dk CL. However, the correlation found between the increased endothelial permeability and the corneal oedema suggests that, although not significant for one week of CL wear, the use of CL affects the endothelial permeability deteriorating its function. This finding is explained by a loss of cohesion of the endothelial structure and a loss of tight junctions between the cells, induced by the hypoxia secondary to CL wear. These alterations directly affect the electrical properties of the corneal endothelium and increase its electrical conductivity, as the current can pass through the extracellular gaps that are induced.

### 3.3.3.3. Applicability

Further investigation is needed to determine the state of the corneal epithelial and endothelial barrier function in long-term CL wearers, as well as to determine the range of values for healthy, non CL-wearing subjects. Future applications of this technique include the evaluation of the function of these layers when planning corneal surgery, assessing the suitability of a donor

cornea for transplantation, or monitoring endothelial dysfunction or corneal disease. The bioimpedance prototype has to be more robust for its clinical implementation.

#### 3.3.3.4. Strengths and limitations

This work has several strengths, including proof that it is possible to measure and quantify the corneal epithelial and endothelial permeability of the human cornea *in vivo* in a non-invasive way using impedance measurements. Two different types of CL were used to induce different permeability changes in the cornea. Other strengths are extended wear of the CL during one week, and the parallel assessment of the central corneal thickness and epithelial thickness. The study is limited by the small sample of subjects participating in it (as a pilot study) and the lack of previous work with this method in humans to compare results and evaluate accuracy.

#### 3.3.3.5. Conclusion

In summary, this study provides for the first time a quantitative assessment of the permeability of the epithelial and endothelial layers of the human cornea *in vivo*. A novel non-invasive method was successfully used to assess electrical corneal properties, making the measurement of the corneal impedance a potential diagnostic and monitoring tool in the future. The method has been shown to be safe and effective in detecting changes in the corneal permeability after CL wear. The results presented may be refined by improving the repeatability and reliability of the impedance system, and establishing the range for normal values.

## 4. CORNEAL ASYMMETRY

### 4.1. ANATOMICAL DIFFERENCES BETWEEN CENTRAL AND PERIPHERAL CORNEA

Although at a macroscopic level the corneal structure seems to be similar in dimensions and organization along its entire surface, there are considerable differences between the central and the peripheral regions of the tissue. In this chapter, the most relevant anatomical differences between the two areas will be described, with special attention to differences in corneal thickness between the central and peripheral cornea.

#### 4.1.1. Definition of central and peripheral cornea

There is no clear definition of the different regions of the corneal surface.<sup>8</sup> A commonly used concept refers to the corneal geography as three distinct areas, using the corneal apex as the central reference point (figure VII). This thesis will be concentrated on just two of these areas: central and peripheral cornea.

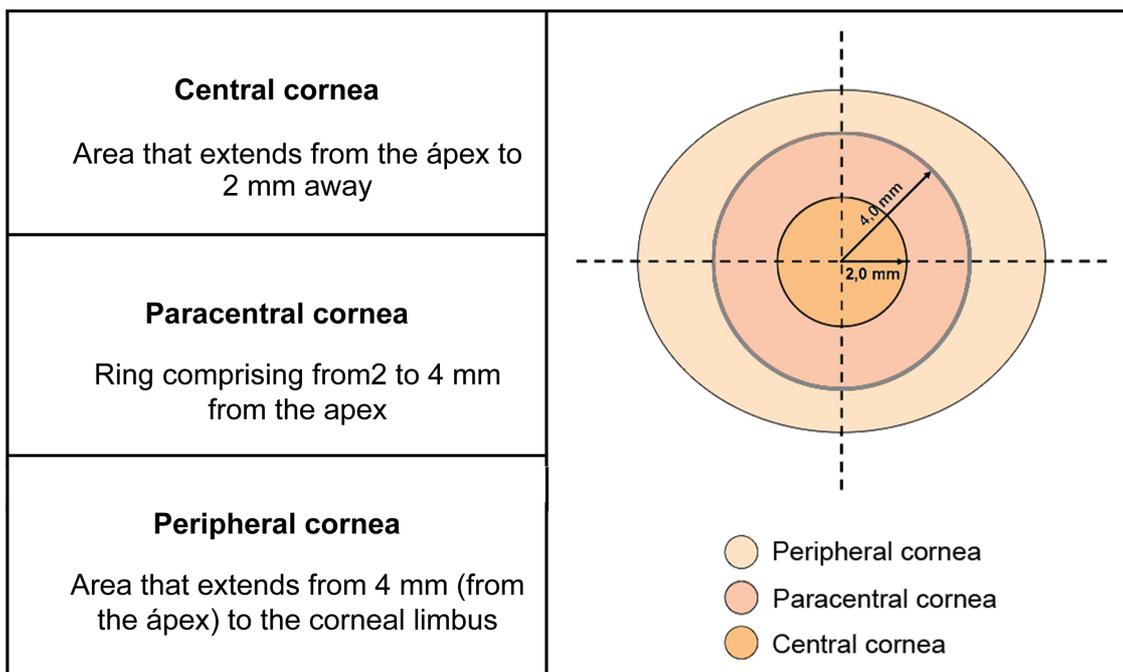


Figure VII. Distribution of the three corneal regions.

#### 4.1.2. Central and peripheral corneal thickness differences

The first and most striking difference between both areas of the cornea is that its thickness progressively increases from the apex to the limbus. The cornea has an average thickness of 535  $\mu\text{m}$  in the centre<sup>8</sup> and 672  $\mu\text{m}$  in the periphery<sup>8</sup> (area outside the 4 central mm). However, this increase in thickness is not symmetrical from the centre towards the periphery, existing an asymmetric thickening where the superior zone is the thicker, followed by the nasal, inferior and temporal zones.<sup>140</sup> If measured along the horizontal meridian, the nasal area at 4 mm from the apex is approximately 21% thicker than the central area, while the temporal area at the same distance from the apex is just 19% thicker than the centre.<sup>141</sup>

Despite this marked difference in the corneal thickness between central and peripheral cornea, only central corneal thickness (CCT) is routinely measured clinical practice. However, the measurement of the thickness at the periphery of the cornea could provide useful information when evaluating, monitoring, and treating corneal diseases such as keratoconus,<sup>142</sup> systemic sclerosis (which results in thickening of the central area of the cornea without thickening at the periphery),<sup>143</sup> herpes simplex infections (which produces a deeper and more painful damage on the corneal periphery),<sup>144</sup> or measurement of intraocular pressure (which is influence by the mid-peripheral thickness).<sup>145</sup> It is also important to assess the peripheral corneal thickness when preparing the evaluation of patients undergoing corneal surgery and subsequent postoperative monitoring, such as in intrastromal ring surgery,<sup>146</sup> limbal relaxing incisions,<sup>146</sup> refractive surgery,<sup>147</sup> penetrating keratoplasty,<sup>147</sup> or corneal crosslinking (which is less effective at the periphery than at the corneal centre).<sup>148</sup>

#### 4.1.3. Other anatomical differences

In addition to the thickness, there are other differences between the centre and the periphery of the cornea. This is the case for the anterior radii of curvature and refractive power,<sup>149</sup> corneal innervation,<sup>150</sup> nutrition and defence,<sup>151</sup> and cell density in epithelium,<sup>152</sup> stroma<sup>154</sup> and endothelium.<sup>156</sup>

#### 4.1.4. Corneal peripheral thickness and oedema induced by CL wear

Given the anatomical differences between the central and peripheral corneal regions it seems possible that the corneal response to CL- induced hypoxia also differs in magnitude between both areas or between different peripheral locations. Previous studies have provided contradictory conclusions: (1) the central cornea swells to a greater extent than the peripheral cornea,<sup>38,124,158-164</sup> (2) the peripheral cornea swells more than the central cornea,<sup>164-166</sup> and (3) the entire cornea swells equally.<sup>1,166-169</sup>

These results seem to be independent from the respective study design. Both short-term (between two and eight hours with CL)<sup>124,158,159,162-164,166,169</sup> and medium-long term studies (at least one week with CL)<sup>1,38,160,161,165,167,168</sup> have shown different corneal responses. This makes it difficult to establish the possible relationship between the CL wearing time and the resultant corneal response to hypoxia (early response versus chronic response), in terms of topographic distribution of the oedema over the cornea.

Previous studies of the IOBA Optometry Research Group (University of Valladolid) found a uniform distribution of the corneal oedema induced after one week with HCL, i.e. the same oedematous response was noted for the corneal centre and the corneal periphery.<sup>1</sup>

#### 4.2. STUDY OF THE CORNEAL THICKNESS ASYMMETRY IN A SHORT-PERIOD OF TIME CONTACT LENS WEAR MODEL

Due to the uncertainty with regard to the degree and location of CL-associated corneal oedema at central and peripheral regions it seems reasonable to propose new studies to help clarify this issue. One aim of these studies was to provide further information on the mechanisms underlying the corneal response to CL-induced hypoxia. No previous study has assessed how the oedema affects the asymmetry in the thickness between the nasal and temporal periphery, so deepen into this issue would lead to a better understanding of corneal structure and responses to adverse conditions such as hypoxia.

#### 4.2.1. Methods

This work formed part of a multicentre research project between the Vision Sciences unit of the Department of Life Sciences at Glasgow Caledonian University and the IOBA – Eye Institute at University of Valladolid. The University of Valladolid financed the stay of an investigator (ADR) at Glasgow Caledonian University for three months with a grant under the *“Support for short collaboration visits during the development of a doctoral thesis”* scheme. The protocol was approved by the Ethics Committee for Clinical Research of the University of Valladolid.

##### 4.2.1.1. Subjects

Twenty volunteers were included in this study. Healthy subjects with no history of anterior segment disease and with no history of ocular surgery were included. No CL use was allowed seven days before the beginning of the study. The nature of the study was explained to participants and informed consent was obtained from each subject prior to participation. All of the subjects were treated in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

##### 4.2.1.2 Lenses

A low-Dk CL (Etafilcon A, Dk= 28, Acuvue 2, Johnson & Johnson, Jacksonville, FL) and a high-Dk CL (Lotrafilcon B, Dk= 110, Air Optix Aqua, Ciba Vision, Duluth, GA) were selected for use in the study. The differences in the Dk of these CL ensure different levels of hypoxia and thus different degrees of corneal swelling to develop.

##### 4.2.1.3. Instrumentation

Evaluation of the corneal pachymetry was carried out with the Pentacam Scheimpflug Topographer (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Germany). The high reliability of the central and peripheral corneal thickness measurements for this device has been reported in several previous studies.<sup>170-172</sup>

For each corneal pachymetry measure, three consecutive readings were obtained and the average of the three measurements was used as the final value. The same experienced operator (ADR) took the measurements as

recommended by the manufacturer and collected the values for each corneal pachymetry measurement at five different corneal locations (figure VIII).

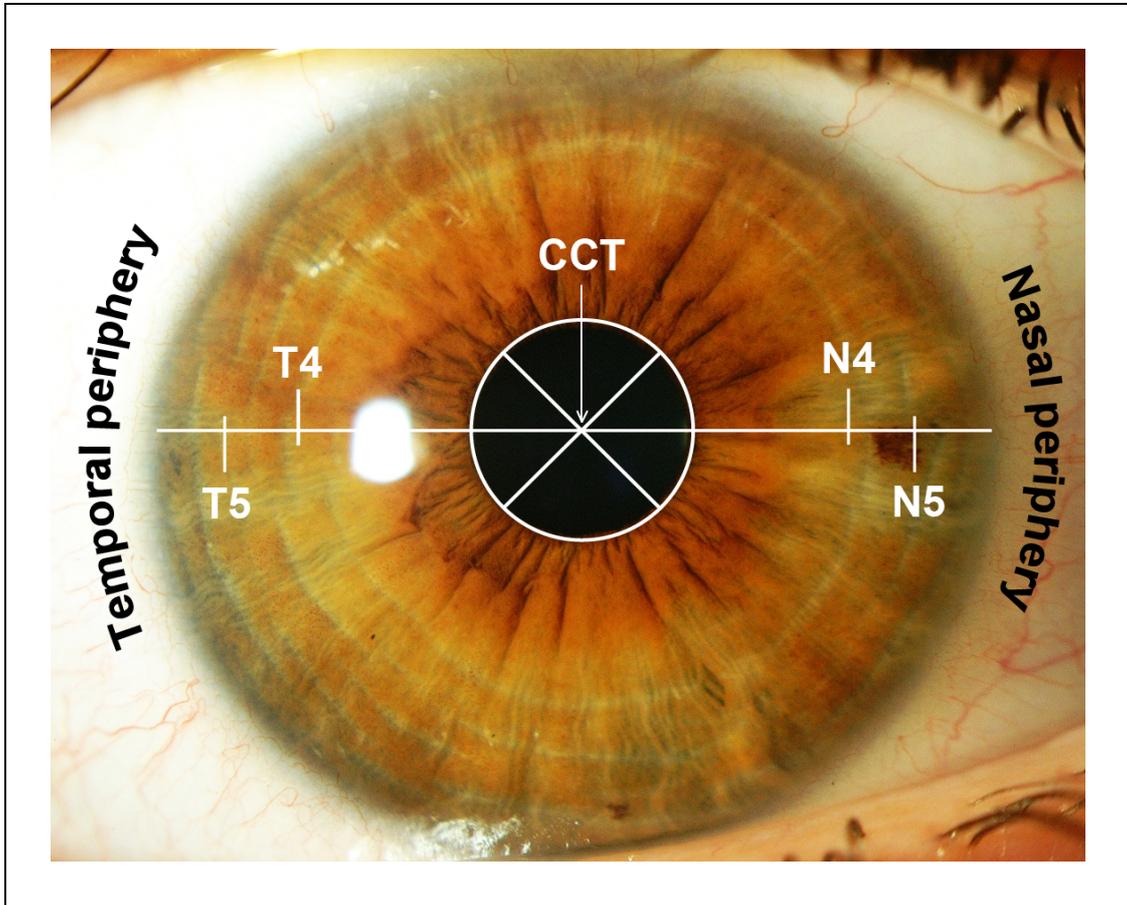


Figure VIII. Representation of the five different locations where corneal pachymetry values were collected. CCT: central corneal thickness (geometrical centre of the cornea). N4, N5: nasal corneal thickness at 4 and 5 mm from the CCT. T4, T5: temporal corneal thickness at 4 and 5 mm from the CCT.

To evaluate regional differences in corneal oedema between these five different locations the ratio between peripheral and central corneal thickness was calculated and the pachymetric data was considered in relative terms. The ratio was calculated by dividing the thicker (peripheral) by the thinner (central) location ( $N5/CCT$ ,  $N4/CCT$ ,  $T5/CCT$ ,  $T4/CCT$ ,  $N5/T5$  and  $N4/T4$ ). The index obtained is the rate of progression for the corneal pachymetry from the centre to the periphery of the cornea, or between the nasal and temporal periphery, and will subsequently be referred to as the relative peripheral index or IRP (Spanish acronym).

#### 4.2.1.4 Procedures

This prospective, randomized, double-masked, clinical study was conducted within two study visits.

In the first visit (visit 1), the full nature of the study was explained to participants and informed consent was obtained from each subject prior to any procedure. Then, evaluation of the corneal surface and basal measurements for corneal thickness were taken. A low-Dk or high-Dk CL was then randomly fitted in one eye of each subject. The contralateral eye served as a control. A correct CL fit was confirmed, and subjects were asked to attend the following visit (40 minutes after the visit 1).

The second visit (visit 2) was scheduled after 40 minutes of CL wear. First, corneal health was assessed. Then the CL was removed and corneal thickness measurements obtained. Corneal health evaluation was established by searching for signs of damage or alteration attributable to the CL use.

#### 4.2.1.5 Data analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical package for Windows.

The Saphiro-Wilk test was used to test the normality of the data distribution. Appropriate parametric tests were used to assess differences. Descriptive statistics were generated. A student paired t-test was used to detect differences between the baseline visit and after 40 minutes of CL wear. Analyses of variance with post hoc comparisons (ANOVA with Bonferroni correction) were used to detect differences between control (non-CL-wearing contralateral eyes), high-Dk and low-Dk CL-wearing eyes (control group, high-Dk group and low-Dk group). A p value <0.05 was considered statistically significant.

### **4.2.2. Results**

Forty eyes from 20 volunteers were included in this study (14 women; six men). The mean age was  $26.7 \pm 4.4$  years (range: 21 to 34 years). The mean spherical equivalent refraction was  $-1.33 \pm 1.92$  D (range: +0.50 to -6.00 D). Seven participants were regular users of CL (six of them were using

HCL, the other one was using RGPCL). All of them discontinued CL use at least seven days before the beginning of the study.

#### 4.2.2.1. Corneal health evaluation

The slit-lamp examination of the corneal surface did not reveal any keratopathy or sign of damage attributable to the CL wear.

#### 4.2.2.2. Central and peripheral corneal thickness

Corneal thickness changes (CL-induced oedema) are summarized in table VI. Statistically significant differences ( $p < 0.01$  ANOVA with Bonferroni correction) were found for all the locations studied (CCT, N5, N4, T5 and T4) between the low-Dk CL group and the other two groups. Control group and high-Dk CL group showed no differences on corneal swelling.

	Oedema (%) $\pm$ SD			P*
	Control group	High-Dk CL group	Low-Dk CL group	
N5	-0.82 $\pm$ 1.17	-0.50 $\pm$ 1.29	1.61 $\pm$ 1.33	<0.01
N4	-0.53 $\pm$ 1.11	-0.51 $\pm$ 0.88	1.62 $\pm$ 1.24	<0.01
CCT	-0.45 $\pm$ 0.99	-0.66 $\pm$ 0.77	1.08 $\pm$ 1.60	<0.01
T4	-0.79 $\pm$ 1.31	-0.48 $\pm$ 1.38	1.20 $\pm$ 1.62	<0.01
T5	-1.12 $\pm$ 1.56	-0.30 $\pm$ 1.44	1.67 $\pm$ 1.95	<0.01

Table VI. Central and peripheral corneal oedema for the three groups: control (non-CL-wearing contralateral eyes), high-Dk and low-Dk; after 40 minutes of CL wear. SD = standard deviation. P\*: ANOVA with Bonferroni correction. Statistically significant differences were found between the control and the low-Dk groups, and between the high-Dk and the low-Dk groups.

No statistical significant differences ( $p > 0.05$  student's paired t-test) were found between the basal IRP and after 40 minutes of CL wear IRP measurements for the control, high-Dk and low-Dk groups (table VII). No statistical significant differences (ANOVA with Bonferroni correction) were found between groups after 40 minutes of CL wear for the IRP between different corneal locations (table VIII).

IRP (%) $\pm$ SD			
	Basal	40 min	P*
<b>Control group</b>			
N5 / CCT	1.47 $\pm$ 0.06	1.46 $\pm$ 0.06	0.805
N4 / CCT	1.30 $\pm$ 0.03	1.30 $\pm$ 0.03	0.935
T5 / CCT	1.39 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.07	0.692
T4 / CCT	1.21 $\pm$ 0.03	1.20 $\pm$ 0.03	0.743
N5 / T5	1.06 $\pm$ 0.04	1.06 $\pm$ 0.04	0.816
N4 / T4	1.07 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.03	0.773
<b>High-Dk CL group</b>			
N5 / CCT	1.46 $\pm$ 0.08	1.46 $\pm$ 0.08	0.977
N4 / CCT	1.30 $\pm$ 0.04	1.30 $\pm$ 0.04	0.992
T5 / CCT	1.39 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.07	0.925
T4 / CCT	1.21 $\pm$ 0.04	1.21 $\pm$ 0.04	0.945
N5 / T5	1.05 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.03	0.888
N4 / T4	1.07 $\pm$ 0.02	1.07 $\pm$ 0.02	0.979
<b>Low-Dk CL group</b>			
N5 / CCT	1.47 $\pm$ 0.05	1.48 $\pm$ 0.04	0.743
N4 / CCT	1.29 $\pm$ 0.03	1.29 $\pm$ 0.02	0.631
T5 / CCT	1.38 $\pm$ 0.06	1.39 $\pm$ 0.05	0.797
T4 / CCT	1.21 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.03	0.937
N5 / T5	1.06 $\pm$ 0.03	1.06 $\pm$ 0.03	0.981
N4 / T4	1.06 $\pm$ 0.02	1.06 $\pm$ 0.02	0.666

Table VII. Differences between the IRP (relative peripheral index) along the study time for all the studied locations (CCT, N5, N4, T5 and T4) in the three groups: control (non-CL-wearing contralateral eyes), high-Dk and low-Dk. SD = standard deviation. P\*: Student's paired t-test.

IRP (%) $\pm$ SD				
	Control group	High-Dk CL group	Low-Dk CL group	P*
N5 / CCT	1.46 $\pm$ 0.06	1.46 $\pm$ 0.08	1.48 $\pm$ 0.04	0.809
N4 / CCT	1.30 $\pm$ 0.03	1.30 $\pm$ 0.04	1.29 $\pm$ 0.02	0.752
T5 / CCT	1.38 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.07	1.39 $\pm$ 0.05	0.795
T4 / CCT	1.20 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.04	1.21 $\pm$ 0.03	0.889
N5 / T5	1.06 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.03	1.06 $\pm$ 0.03	0.629
N4 / T4	1.07 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.02	1.06 $\pm$ 0.02	0.779

Table VIII. Differences in the IRP (relative peripheral index) after 40 minutes of CL wear for all locations (CCT, N5, N4, T5 and T4) for the three groups: control (non-CL-wearing contralateral eyes), high-Dk and low-Dk. SD = standard deviation. P\*: ANOVA with Bonferroni correction.

### 4.2.3. Discussion

The appearance of non-invasive technology<sup>57,66</sup> in recent years capable of obtaining accurate pachymetry information of the central and the peripheral cornea led to the application of these new tools in assessments of the interaction between CL and cornea. As noted above, there is no consensus as to how CL-associated corneal oedema is distributed in different regions, with three possible different scenarios (greater central oedema,<sup>38,124,158-164</sup> greater peripheral oedema,<sup>164-166</sup> even regional distribution of oedema<sup>1,166-169</sup>).

This work is the first study to investigate the central and peripheral oedema induced by different Dk CL during 40 minutes of wear. The main objective was to establish if the oedema is evenly distributed throughout the corneal topography or whether some areas are more affected by CL-associated hypoxia than others. With only 40 minutes of CL use, this study describes the immediate corneal response to hypoxia in form of oedema not only in the centre, but also in the corneal periphery. Other short-term studies have had a CL wear period between two and eight hours, again with controversial results.<sup>124,158,159,162-164,166,169</sup>

The rationale for utilising a short-term period of CL wear was that previous studies have described changes in the morphology of corneal

endothelium with just a few minutes after fitting the lenses, secondary to induced hypoxia (endothelial blebs).<sup>49,173,174</sup> Given that the corneal endothelium is responsible for maintaining the state of relative dehydration of the cornea and that the endothelial metabolism is affected by oxygen deprivation due to CL wear within a few minutes, it seems reasonable to conclude that the corneal oedematous response mechanism may begin to be measurable during the first minutes of CL wear.

In this work a different approach has been introduced to study corneal oedema distribution between the centre and the periphery of the cornea after CL wear. Classically, differences between each area have been assessed by comparing the percentage of oedema between the different points of study, or even by comparing the absolute difference (increase in microns) between points. The method proposed in this study involves assessments of the magnitude of change between different points (CCT, N5, N4, T5 and T4) such that if all points are equally oedematous the proportions studied (N5/CCT, N4/CCT, T5/CCT, T4/CCT, N5/T5, N4/T4) will remain the same, but if the cornea has a greater oedema in any of the studied points then the proportions will be different. The IRP has been used to assess this.

The results show that the IRP remained stable at all locations after 40 minutes of CL wear, in the control group eyes and both when using high and low Dk lenses. These results suggest that hypoxia induced after 40 minutes of CL wear equally affects the centre and the periphery (horizontal axis) of the cornea or, that the thickness change is uniformly distributed across these areas.

This conclusion agrees with the studies published by Lowther,<sup>169</sup> who studied corneal oedema after one, three and six hours of conventional HCL use; and Tyagi,<sup>166</sup> who studied corneal oedema after eight hours of conventional and silicone HCL. Both authors concluded that corneal oedema caused by short-term CL wear is similar in the centre and in the periphery of the cornea.

Other short-term studies have yielded different results, showing greater oedema in the corneal centre than in the periphery. Mandell,<sup>158</sup> who studied corneal oedema after two hours of polymethyl methacrylate (PMMA) CL wear; Carney,<sup>159</sup> who studied corneal oedema after two hours of PMMA CL and conventional HCL wear; Erickson,<sup>162</sup> four hours of conventional HCL wear with closed eyes; Wang,<sup>124</sup> three hours of PMMA CL and conventional HCL wear with closed eyes; Moezzi,<sup>163</sup> three hours of PMMA CL wear with closed eyes; and Tyagi,<sup>164</sup> eight hours of PMMA CL wear.

The only study that found the opposite trend (greater peripheral oedema) is one by Tyagi,<sup>164</sup> who studied corneal oedema after eight hours of RGPCL wear, although the differences between different areas were not statistically significant.

Most of the studies that have found greater central oedema have been performed using PMMA lenses, which do not usually cover the entire surface of the cornea. Thus, it could be concluded that the central cornea might be more affected by hypoxia than that in the periphery (which is not fully covered by the CL and so this area is not subject to the same lack of oxygen) and therefore the central oedema might be also higher than the peripheral oedema.

In the case of HCL studies<sup>124,159,162</sup> (which cover the entire cornea) it is noteworthy that in two of them to the effect of CL-induced hypoxia it must be added the effect of having the eyelids closed during the period of CL wear, which may mask the isolate effect of the CL induced hypoxia. Furthermore, this situation is further away from the actual conditions under which a user will wear their lenses (eyes open) and therefore a comparison with the results obtained in this work is difficult.

#### 4.2.3.1. Strengths and limitations

In this work the corneal response to hypoxia after 40 minutes of CL wear has been studied. The results represent the almost immediate response of the cornea to CL wear, which can provide useful information to help elucidate the corneal oedema mechanisms. However, further studies are needed to study this corneal response after a longer time of CL wear, (closer to the actual wearing conditions).

A main feature of this study is that it has assessed the corneal response not only from the centre, but also at four locations of the corneal peripheral, namely 4 and 5 mm nasally and temporally from the corneal apex. However, current instruments enable the observer to obtain information from almost any point of the corneal surface, allowing for a comprehensive study of the oedematous response.

In addition, the methodology used for this study provides a novel approach in the field. Instead of assessing differences by comparing percentage changes in thickness, this study has determined the regional

thickness variation by using a percentage index that directly determines the magnitude of this variation.

A limitation of this study is that to confirm that the distribution of corneal oedema is different depending on the CL design it would be necessary to conduct a study to include other types of CL, with those one that do not cover the entire corneal surface (PMMA, RGP).

It would be also interesting in future studies to evaluate a possible relationship between the magnitude of any CL-induced oedema and its distribution over the corneal topography. In this work, low-Dk lenses induced significantly higher oedema than high-Dk lenses. However, the measured thickness change did not exceed 1.7% at any of the corneal locations assessed. A more substantial change in corneal thickness (higher percentage of oedema) may show different results from those found in the present study (homogeneous distribution of the corneal oedema).

#### 4.2.3.2. Conclusion

In conclusion, 40 minutes of high-Dk (Lotrafilcon B - Dk=110) or low-Dk CL (Etafilcon A - Dk=28) CL-wear has the tendency to cause evenly distributed corneal thickness changes at the corneal centre and periphery (horizontal meridian). The asymmetry between the nasal and temporal regions and these to the centre of the cornea do not seem to undergo any considerable variation. Low-Dk CL induce significantly more oedema than high-Dk lenses at all locations studied; in any case, the corneal oedema was uniformly distributed.

### **4.3. STUDY OF THE CORNEAL THICKNESS ASYMMETRY IN A MEDIUM-PERIOD OF TIME CONTACT LENS WEAR MODEL**

The results obtained in the study described in chapter 4.2. of this thesis concluded that the corneal oedema induced by HCL wear is equally distributed in the central and in the peripheral (along the horizontal meridian) cornea. However, the short-term corneal response to hypoxia after just 40 minutes of CL wear was evaluated, which is shorter than the regular pattern of wear from most CL users. The purpose of the present study was to evaluate the same parameters for the central and peripheral (along the horizontal meridian)

corneal thickness using the same criteria for oedema and asymmetry as those used in the previous study and using the same CL, but extending the period of CL wear to one week of CL extended (overnight) use.

#### **4.3.1. Methods**

This work formed part of a multicentre research project between the Vision Sciences unit of the Department of Life Sciences at Glasgow Caledonian University and the IOBA – Eye Institute at University of Valladolid. The University of Valladolid financed the stay of an investigator (ADR) at Glasgow Caledonian University for three months with a grant under the “*Support for short collaboration visits during the development of a doctoral thesis*” scheme.

##### 4.3.1.1. Subjects

Subjects included in this study are the same who took part in the study described in chapter 3.2. For the present study, both eyes of each subject were included in the study, i.e. 20 eyes from ten subjects were included in the analysis.

##### 4.3.1.2 Lenses

A low-Dk CL (Etafilcon A, Dk= 28, Acuvue 2, Johnson & Johnson, Jacksonville, FL) or a high-Dk CL (Lotrafilcon B, Dk= 110, Air Optix Aqua, Ciba Vision, Duluth, GA) was randomly fitted in the right eye of each subject. The left eye wore the respective other CL. The differences in the Dk of these CL ensure different levels of hypoxia and thus different degrees of corneal swelling.

##### 4.3.1.3. Instrumentation

Evaluation of the corneal pachymetry was carried out with the Galilei Dual Scheimpflug Topographer (Ziemer Group, Port, Switzerland). The high reliability of the central and peripheral corneal thickness measurements for this device has been reported in several previous studies.<sup>170,175,176</sup>

Three consecutive corneal pachymetry measurements were obtained, using the average of the three measurements for analysis. The same experimented operator (ADR) took the measurements as recommended by the manufacturer and collected the values for each corneal pachymetry measurement at the same five different corneal locations as described in the previous study 4.2. (figure VIII).

The same criteria were used to evaluate differences in the corneal response to hypoxia at the five locations along the horizontal meridian (the pachymetric data was considered in relative terms by dividing the thicker location by the thinner location: N5/CCT, N4/CCT, T5/CCT, T4/CCT, N5/T5 and N4/T4, obtaining the IRP).

#### 4.3.1.4 Procedures

This prospective, randomized, double-masked, clinical study involved two study visits.

The present study was carried out in parallel to the development of the study 3.2, by additionally obtaining the central and peripheral corneal pachymetry of the subjects included in the study with the Galilei topographer. The additional measurements were carried out at two different times of the study 3.2: (1) the baseline measure (visit 1) was performed before fitting CL and (2) the final assessment (visit 2) was performed after seven days of extended CL wear. For the analysis, eye were categorised and allocated to one of two groups based on the CL type used (high-Dk or low-Dk).

#### 4.3.1.5. Data analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical package for Windows.

The Saphiro-Wilk test was used to test the normality of the data distribution. Appropriate parametric tests were used to assess differences. Descriptive statistics were generated. A student paired t-test was used to detect differences between the baseline visit and after seven days of CL wear. A student paired t-test were used to detect differences between high-Dk and low-Dk CL-wearing eyes. A p value <0.05 was considered statistically significant.

### 4.3.2. Results

Twenty eyes from ten volunteers were included in this study (six women; four men). The mean age was  $25 \pm 2.7$  years (range: 20 to 28 years). The mean spherical equivalent refraction was  $-2.40 \pm 2.67$  D (range: +0.50 to -7.25 D). Four participants were regular users of CL (three of them were using HCL, the other one was using RGPCL). All of them discontinued CL use at least 7 days before the beginning of the study.

#### 4.3.2.1. Corneal health evaluation

The examination of the corneal surface revealed one case of superficial punctual keratopathy attributable to the wear of the low-Dk CL.

#### 4.3.2.2. Central and peripheral corneal thickness

Results for the oedema induced are summarized in table IX. Statistical significant differences ( $p > 0.05$  ANOVA with Bonferroni correction) were found for all the locations studied except for N5 between the high-Dk and low-Dk CL groups.

Oedema (%) $\pm$ SD			
	High-Dk CL group	Low-Dk CL group	P*
N5	$2.05 \pm 2.99$	$2.84 \pm 2.91$	0.577
N4	$0.47 \pm 2.23$	$3.75 \pm 2.48$	<0.01
CCT	$-0.05 \pm 2.77$	$3.75 \pm 3.67$	<0.01
T4	$0.65 \pm 2.12$	$2.74 \pm 2.62$	<0.01
T5	$0.49 \pm 3.19$	$1.47 \pm 2.33$	<0.01

Table IX. Central and peripheral corneal oedema for both study groups (high-Dk and low-Dk) after seven days of CL wear. SD = standard deviation. P\*: Student's paired t-test.

No statistical significant differences ( $p > 0.05$  student's paired t-test) were found between the basal IRP and after seven days of CL wear IRP measurements for both high-Dk and low-Dk groups (table X). No statistical significant differences ( $p > 0.05$  student's paired t-test) were found between groups after seven days of CL wear for the IRP between different corneal locations (table XI), except for the N5 location.

IRP (%) $\pm$ SD			
	Basal	7 days	P*
<b>High-Dk CL group</b>			
N5 / CCT	1.34 $\pm$ 0.03	1.36 $\pm$ 0.04	0.149
N4 / CCT	1.22 $\pm$ 0.02	1.23 $\pm$ 0.03	0.624
T5 / CCT	1.24 $\pm$ 0.03	1.24 $\pm$ 0.03	0.833
T4 / CCT	1.12 $\pm$ 0.02	1.13 $\pm$ 0.03	0.529
N5 / T5	1.09 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.03	0.235
N4 / T4	1.08 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.03	0.911
<b>Low-Dk CL group</b>			
N5 / CCT	1.32 $\pm$ 0.03	1.31 $\pm$ 0.05	0.334
N4 / CCT	1.21 $\pm$ 0.02	1.21 $\pm$ 0.03	0.962
T5 / CCT	1.24 $\pm$ 0.04	1.20 $\pm$ 0.04	0.085
T4 / CCT	1.13 $\pm$ 0.02	1.12 $\pm$ 0.03	0.412
N5 / T5	1.07 $\pm$ 0.04	1.08 $\pm$ 0.04	0.378
N4 / T4	1.08 $\pm$ 0.02	1.09 $\pm$ 0.02	0.380

Table X. Differences between the IRP (relative peripheral index) along the study time for all the studied locations (CCT, N5, N4, T5 and T4) in both groups (high-Dk and low-Dk). SD = standard deviation. P\*: Student's paired t-test.

IRP (%) $\pm$ SD			
	High-Dk CL group	Low-Dk CL group	P*
N5 / CCT	1.36 $\pm$ 0.04	1.31 $\pm$ 0.05	0.041
N4 / CCT	1.23 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.03	0.402
T5 / CCT	1.24 $\pm$ 0.03	1.20 $\pm$ 0.04	0.170
T4 / CCT	1.13 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.03	0.251
N5 / T5	1.10 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.04	0.420
N4 / T4	1.08 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.02	0.770

Table XI. Differences in the IRP (relative peripheral index) after seven days of CL wear for all the studied locations (CCT, N5, N4, T5 and T4) for both groups (high-Dk and low-Dk). SD = standard deviation. P\*: Student's paired t-test.

### 4.3.3. Discussion

Differences between the central and peripheral (horizontal meridian) corneal oedema were assessed in the study described in chapter 4.2. after a short-period of time (40 minutes) of HCL wear. The results suggested a uniform corneal oedema distribution throughout the corneal topography of the tissue. However, a major limitation of the study was the short-term nature of the follow-up. While such assessments help to elucidate short-term structural changes and potentially biomechanical mechanisms of the corneal response to hypoxia during the early stages of oxygen deprivation, they do not represent standard conditions CL wearing conditions. Therefore, a similarly structured study with a longer follow-up and extended CL wearing pattern has been performed. In the present study (4.3), corneal oedema has been evaluated by assessing changes in IRP at different corneal locations after one week of extended HCL wear (without removing the lenses during sleep). The CL types used were the same as in study 4.2.

The results of the present study showed that the IRPs remained stable after seven days of extended HCL wear (either high-Dk or low-Dk). These results essentially confirm the short-term findings of study 4.2. (40 minutes of wear), suggesting that hypoxia induced by a medium-term period

(one week) of CL wear affects the centre and the periphery (horizontal axis) of the cornea equally.

Both types of CL (high-Dk and low-Dk) have shown the same trend to induce a uniform thickening at all corneal locations assessed, although it has been noted that the low-Dk CL led to a significantly higher oedema at all locations except for N5, where oedema was not statistically different between high-Dk and low-Dk lenses. These differences between both lens types are attributed to the different oxygen permeability of each material.

These results agree with studies published by Sanders,<sup>168</sup> who monitored corneal oedema during six weeks of conventional HCL wear, Lowther,<sup>169</sup> who monitored oedema during six months of conventional HCL wear, and Martin,<sup>1</sup> who evaluated oedema after one week of conventional and silicone HCL wear. These three studies have concluded that the oedema is equally distributed in the centre and in the periphery of the cornea.

In contrast, Bonanno<sup>38,161</sup> showed that corneal oedema was greater centrally than peripherally after two, four, six and 12 weeks of conventional HCL wear. As a possible explanation the author suggested that corneal peripheral areas receive oxygen from the limbal vessels, which leads to less hypoxia in the periphery and a greater degree of hypoxia and associated oedema centrally. Another possible cause given by the author is the anatomical differences in the transitional zone between the cornea and sclera. The higher endothelial cell density in the periphery than in the centre may contribute to the lower degree of peripheral oedema.

The only reference found in the literature describing greater peripheral oedema is the work published by Kaluzny,<sup>165</sup> who monitored corneal oedema caused by conventional HCL (etafilcon A) during two, four, and six weeks of wear. The author attributes this finding to the negative refractive power of the CL used in the study, providing a lower Dk/t in the peripheral than in the central zone, which results in less oxygen transmission to the most peripheral regions of the cornea.

A limitation of the present study is the relatively small number of participants. Therefore the results should be evaluated cautiously, and any conclusions drawn should be carefully interpreted.

#### 4.3.3.1. Pentacam Vs Galilei Comparison

Two different topographers have been used to study differences between central and peripheral (horizontal meridian) corneal oedema after 40 minutes (Pentacam Scheimpflug topographer, in “*Study of the corneal thickness asymmetry in a short-period of time contact lens wear model*”) and seven days (Galilei Dual Scheimpflug topographer, in “*Study of the corneal thickness asymmetry in a medium-period of time contact lens wear model*”) of CL wear.

Comparing baseline pachymetry values obtained from the different locations (CCT, N5, N4, T5 and T4), statistically significant differences (all peripheral locations) were noted for data obtained with the two types of corneal topographers (N5, N4, T5 and T4). This suggests that both systems may not be used interchangeably for assessments of peripheral corneal topography; further and more detailed analysis would be required to clarify it. These differences could explain the differences in N5/CCT, N4/CCT, T5/CCT, T4/CCT IRPs between both topographers. Measurements for the centre of the cornea (CCT) have yielded no statistically significant differences between both devices.

Previous studies have found similar results, noting a good agreement on CCT measurements between different techniques and disagreement on peripheral pachymetry measurements.<sup>177-180</sup>

It seems that the range of differences between two different systems is not constant along the corneal topography, and is progressively larger moving from the centre to the periphery of the cornea.<sup>178,181-183</sup> Additionally, lower repeatability is usually found in the corneal periphery measurements in comparison with those of the corneal centre.<sup>184,185</sup>

These findings suggest that the accuracy of the different devices to obtain measurements of peripheral corneal thickness is uncertain, which shows the unawareness of the true corneal thickness beyond the central area. Several options have been recently considered as possible reasons that could explain differences between the instruments: (1) in the case of Galilei Dual Scheimpflug topographer the superposition of images in the central cornea is greater than in the periphery due to the rotation of the camera around the optical axis. This leads to a considerable decrease of the measured data points from the central to the peripheral cornea.<sup>140</sup> (2) The use of unstable reference points (e.g. the pupil centre rather than the corneal apex),<sup>186</sup> and (3) scan of the vertical

meridian may be due to artefacts such as partial lid coverage (upper and lower peripheral cornea).<sup>170,187</sup>

#### 4.3.3.2. Strengths and limitations

This study presents an important advancement over the previous work (central and peripheral corneal response to hypoxia induced after 40 minutes of HCL wear). This study has not been limited to the assessment of the immediate response of the cornea to hypoxia, but has extended the initial work by investigations involving measurements of corneal pachymetry after seven days of extended HCL wear, a situation that may resemble much more closely the actual pattern of CL user in patients. However, further studies are required in long-term CL users to assess the evolving response of the corneal topography after several years of CL adaptation and to evaluate if the corneal morphology retains its proportions, e.g. between the centre and the periphery of the cornea, and between the nasal and temporal periphery.

As in the study described in section 4.2, this work has assessed the corneal response not only at the centre, but also at four locations of the corneal peripheral topography, (4 and 5 mm from the corneal apex to nasal and temporal periphery). However, the imaging instruments available today can provide information from almost any point of the corneal surface, so a more exhaustive study of the oedema could be performed not only at four points of the periphery of the horizontal meridian but including the entire map of the cornea.

The methodology used to conduct this study, which differs from other works found in the literature, provides a new approach in the field. Instead of using absolute differences by comparing corneal thickness changes (percentages) at each location, the study determined the relative variation in the proportion between corneal thickness at different locations, by calculating an index that directly determines how substantial this variation is.

An important limitation of this work is the relatively small size of the sample, limiting the statistical power of the study and therefore reducing the precision of the results. The reason for the limited number of subjects was that the study was designed as part of study 3.3. (which was a first proof of concept, and so a small sample was considered to perform it).

Finally, inclusion of the contralateral eye into the study (in which each subject wore CL in both eyes), may be controversial. Previous studies have described a possible sympathetic effect of an eye over the other in the corneal oedema induced.<sup>188,189</sup>

#### 4.3.3.3. Conclusion

In conclusion, corneal oedema induced after seven days of high-Dk (Lotrafilcon B - Dk=110) or low-Dk CL (Etafilcon A - Dk=28) wear is similarly evenly distributed between the corneal centre and the corneal periphery (horizontal meridian). The asymmetry between the central, nasal and temporal regions does not appear to undergo substantial variations in response to up seven days of extended CL wear. As expected, the data has shown that low-Dk lenses induce significantly more oedema than high-Dk lenses at all locations, except for N5. Despite the significant increase on corneal pachymetry of CCT, N5, N4 and T4 after seven days of extended low-Dk CL wear, the corneal proportions remained stable, suggesting a uniform distribution of the corneal oedema over its surface.

## 5. SYNTHESIS

Nowadays, corneal morphology can be evaluated by a wide variety of techniques that make the process of evaluation quick and easy. However, despite the huge advancement in imaging technology over the past decades, the need for new tools allowing the complete understanding of the corneal physiology is evident.

Slit-lamp evaluation of the cornea has been practiced since 1911, when Gullstrand introduced its use in clinical practice (more than 100 years ago). The corneal anatomy can be assessed and pathological signs or corneal abnormalities identified.

Since the introduction of slit-lamp biomicroscopy, corneal evaluation has evolved from an assessment of its general health to the acquisition of non-invasive and *in vivo* permeability measures of the corneal epithelium and endothelium; and it is likely that technology will continue to advance. New and better devices will facilitate even more detailed examination of the cornea, providing further insights into its structure and function.. The ultimate goal continues to be to provide the best care to patients in the clinical practice.

This thesis aims to contribute to the study of corneal responses to CL wear. In order to achieve this aim, a series of projects that included the assessment of both the physiological response (epithelium and endothelium permeability) and the morphological response (change in thickness) of the cornea after HCL wear has been carried out.

To evaluate the physiological response of the cornea to HCL wear, the effectiveness of the corneal bioimpedance technique in animal model (rabbits), after one and seven days of HCL use was assessed first. The results, although controversial, appear to be biologically plausible and, above all, show that the equipment for measuring corneal bioimpedance is sensitive and capable of detecting epithelial permeability changes induced by HCL.

Secondly, the safety and effectiveness of this novel non-invasive tool was assessed in humans, using a strategy of three and seven days of CL wear and of two different types of CL with different Dk/t characteristics. The results showed no statistically significant changes in the permeability of either the epithelium or the endothelium, which is not surprising since both types of lenses were approved by the FDA (U.S. Food and Drug Administration) for extended

(etafilcon A, up to seven days) and continued wear (lotrafilcon B, up to 30 days). However, future studies are needed to determine the mechanisms related to the permeability of the corneal epithelium and its thinning when using HCL.

To evaluate the morphological response, the distribution of the corneal thickness changes (oedema) was evaluated at five different locations of the corneal topography (CCT, N4, N5, T4 and T5), in order to help clarify whether corneal oedema induced by HCL wear is homogeneously distributed between the central and the peripheral cornea.

For this, corneal response after 40 minutes (short-term response) and seven days (medium-term response) of two different Dk/t HCL wear was studied. In summary, the results showed a uniform distribution of corneal oedema, both short and medium-term response and for both high and low-Dk lenses. These results may help to elucidate the controversy surrounding this issue.

In conclusion, further studies are needed to develop new technology to complement the existing methods to better define changes of the corneal physiology and biomechanics, in order to enhance patient care, facilitate clinical decision-making and to improve the methodology and knowledge about the interactions between cornea and CL.



# 1

# INTRODUCCIÓN



## 1.1. Justificación

# JUSTIFICACIÓN

La morfología y la fisiología corneal se ven alteradas por el uso de lentes de contacto (LC). El impacto que éstas producen sobre la superficie ocular ha sido (y continúa siendo) una materia profundamente estudiada por clínicos e investigadores. La literatura disponible en este campo es tan abundante como numerosos los efectos que provoca el uso de las LC en la córnea.

A nivel morfológico, una de las alteraciones más estudiadas es el aumento del espesor de la córnea provocado por el uso de LC, conocido como edema corneal. El grado de edema se determina clásicamente calculando el porcentaje de cambio del grosor corneal secundario al uso de LC y es un parámetro globalmente aceptado para valorar el impacto de éstas sobre la córnea y determinar así la seguridad de su uso. La medida del edema corneal se obtiene de manera rutinaria únicamente en la localización central de la córnea, por lo que en la práctica clínica el efecto de las LC sobre el grosor corneal periférico suele pasar inadvertido. Recientemente se ha postulado que el edema inducido por el porte de LC hidrofílicas (LCH) es similar en centro y periferia corneal.<sup>1</sup> Sin embargo se trata de una afirmación controvertida, pues diferentes trabajos defienden distintas hipótesis sobre el comportamiento del edema a lo largo de la topografía corneal como se describirá más adelante.

Además, la progresión del engrosamiento desde el centro corneal hacia la periferia o las diferencias paquimétricas entre la periferia nasal y temporal apenas se han tenido en cuenta en estudios previos al evaluar el edema corneal producido por el porte de LC. En este trabajo se propone evaluar y cuantificar el impacto que una LC ejerce sobre el grosor corneal no sólo en términos del porcentaje del cambio en la paquimetría central antes y después del porte de la lente (edema), sino estudiando además el comportamiento de la asimetría entre el centro y la periferia de la córnea y la asimetría entre la periferia nasal y temporal de la misma. Este estudio aportaría nuevo conocimiento que podría ayudar a dilucidar los mecanismos morfológicos del edema corneal y conocer mejor la respuesta de la córnea a la hipoxia inducida por el uso de LC.

A nivel fisiológico, está aceptado que la córnea se edematiza cuando los mecanismos de mantenimiento del nivel de deshidratación corneal fallan produciéndose un aumento de su espesor y consecuentemente una pérdida de su transparencia.<sup>2</sup> La responsabilidad de mantener dicho nivel de deshidratación cae sobre el endotelio corneal, que cumple una función activa o metabólica, y una función pasiva o de barrera entre la cámara anterior y el estroma de la córnea de tal manera que mantiene el equilibrio entre los fluidos de ambas partes. Cuando la función del endotelio se ve alterada se produce un desequilibrio en el intercambio de fluidos y el consiguiente engrosamiento de la córnea.

En la actualidad sólo se dispone de una herramienta para la evaluación directa de la función barrera del endotelio corneal en humanos *in vivo*: la fluorofotometría. Básicamente consiste en la instilación de fluoresceína en la superficie corneal y determinar un tiempo después la concentración de ésta sustancia en córnea y cámara anterior por métodos ópticos no invasivos. Ésta técnica no ha experimentado apenas evolución desde que los autores

Jones y Maurice<sup>3</sup> propusieran en 1966 un método matemático basado en la mecánica de fluidos para evaluar la permeabilidad del tejido corneal. Con el paso de los años, ligeras modificaciones se fueron introduciendo tanto en el método matemático como en los procedimientos seguidos para realizar la medida, sin llegar a popularizarse ni a nivel clínico ni a nivel científico, ya que esta técnica cuenta con una serie de inconvenientes que serán detallados más adelante y que la convierten en una técnica poco fiable. A pesar de ello, sigue siendo la única herramienta disponible para evaluar la función barrera no sólo del endotelio sino también del epitelio corneal en humanos *in vivo*, por lo que se hace necesario impulsar investigaciones en esta dirección.

Parece por lo tanto razonable buscar nuevas tecnologías capaces de determinar cuantitativamente el estado de la función barrera del endotelio y epitelio corneal, que puedan ser aplicadas a la evaluación no sólo de usuarios de LC sino también al estudio de diferentes distrofias endoteliales, evaluación de la idoneidad de córneas donadas para su trasplante, monitorización de pacientes sometidos a cualquier tipo de cirugía susceptible de causar edema corneal, etc.

Un abordaje diferente para la cuantificación de la función barrera de estas capas es el aportado por el estudio de las propiedades eléctricas pasivas de la córnea.<sup>4</sup> Desafortunadamente, las investigaciones conducidas hasta el momento en esta materia no pueden ser transferidas a la práctica clínica en humanos debido a su metodología altamente invasiva. Estos estudios se concentran en trabajos *in vitro* o experimentación animal. Sin embargo, recientemente se ha propuesto una nueva técnica, denominada bioimpedancia corneal, también basada en el estudio de las propiedades eléctricas pasivas de la córnea que permite determinar la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal de manera no invasiva en modelo animal *in vivo*. En este trabajo se ha evaluado la capacidad del método de medida de la bioimpedancia corneal para

detectar cambios secundarios a la hipoxia inducida por el uso de LC en modelo animal y la seguridad de la técnica en humanos *in vivo*, valorando la posible transferencia de esta tecnología a la práctica clínica para analizar los cambios en la función barrera epitelial y endotelial que provoca el uso de LC. La aplicación de esta nueva herramienta al estudio de la función barrera del epitelio y endotelio corneal en humanos *in vivo* permitiría profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos que producen edema corneal como respuesta a la hipoxia inducida por el uso de LC.

En resumen, en este trabajo se estudia el edema corneal provocado por el porte de LC desde dos enfoques diferentes; uno más clásico, desde el punto de vista anatómico (analizando las diferencias en la respuesta corneal en distintas zonas de su topografía e intentando aclarar la controversia existente sobre la respuesta corneal central y periférica secundaria al porte de LC) y otro más innovador, intentando un abordaje desde el punto de vista funcional (aplicando una nueva tecnología para evaluar los cambios en la permeabilidad de las barreras corneales ocurridos por el uso de LC y determinando su seguridad en humanos). Los resultados de este trabajo aportan evidencia científica de primer nivel (evidencia tipo I-II),<sup>5</sup> que podría utilizarse para incluir recomendaciones clínicas en protocolos, guías clínicas, y pautas de adaptación de LC entre otros; aumentando la seguridad de los usuarios de LC.

## 1.2. Hipótesis

# HIPÓTESIS

Los cambios producidos en la fisiología corneal inducidos por el uso de lentes de contacto hidrofílicas de distinta permeabilidad pueden evaluarse *in vivo* de manera segura analizando los cambios en la función barrera epitelial y endotelial empleando la medida de la bioimpedancia. Así mismo, los cambios producidos en la morfología corneal secundarios al uso de lentes de contacto hidrofílicas de distinta permeabilidad no modifican la distribución paquimétrica de la córnea en el centro y la periferia, distribuyéndose el edema de manera homogénea por la topografía corneal.



### 1.3. Objetivos

## OBJETIVOS

1. Determinar la capacidad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal para detectar cambios en la permeabilidad epitelial en conejos inducidos por el porte de LCH.
2. Determinar la seguridad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal en humanos *in vivo*.
3. Determinar la capacidad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal para detectar cambios en la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal humano inducidos por el porte de LCH de diferente permeabilidad al oxígeno.
4. Evaluar la distribución topográfica del edema corneal inducido por el uso de LCH de diferente permeabilidad al oxígeno durante un corto plazo de porte, y establecer si el edema se reparte homogéneamente entre centro y periferia o se acentúa más dependiendo de la zona corneal.

- 5.** Evaluar la distribución topográfica del edema corneal inducido por el uso de LCH de diferente permeabilidad al oxígeno durante un medio plazo de porte, y establecer si el edema se reparte homogéneamente entre centro y periferia o se acentúa más dependiendo de la zona corneal.

# 2

**ESTADO ACTUAL**

ESTADO ACTUAL

**DEL TEMA**

DEL TEMA



## 2.1. Anatomía de la córnea

# ESTRUCTURA corneal

La córnea es el elemento con mayor poder refractivo del ojo, contribuyendo aproximadamente con 43 de las 60 dioptrías (D) del sistema óptico ocular, por lo que aporta algo más del 70% de la refracción total.<sup>6</sup> En un humano adulto mide aproximadamente 11 mm en el meridiano vertical y 12 mm en el meridiano horizontal,<sup>7</sup> y su radio anterior de curvatura es de 7,8 mm de media.<sup>6</sup> La córnea tiene un grosor aproximado de  $535\ \mu\text{m}$ <sup>8</sup> y está conformada por 5 capas diferentes: el epitelio, la lámina de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio (figura 2.1). En esta sección se describirán brevemente las principales características de su morfología.

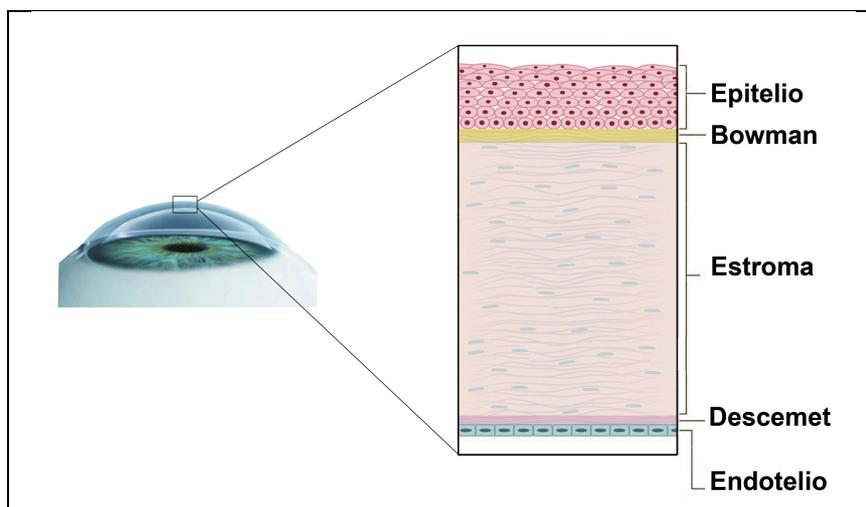


Figura 2.1. Estructura de la córnea.

### 2.1.1. Epitelio

El epitelio corneal (figura 2.2) es la capa que limita la córnea con el medio ambiente, por lo tanto es la más externa de todas y la que está en contacto con la lágrima y la atmósfera. Cuenta con un grosor medio de entre 50 y 60  $\mu\text{m}$  (aproximadamente el 10% del espesor total de la córnea).<sup>7</sup> Está compuesta por 5-7 capas de células, principalmente de tres tipos diferentes: una única fila de células basales, 2 o 3 filas de células aladas y otras 2 o 3 filas de células superficiales.<sup>9</sup> Las células basales del epitelio corneal poseen función mitótica, lo que supone una constante renovación de las mismas.<sup>10</sup> Las células que proliferan se diferencian y migran hacia filas más superficiales para reemplazar a las dañadas o muertas. El ciclo de vida aproximado de una célula epitelial desde que nace, migra y muere es de entre 7 y 14 días,<sup>11</sup> lo que supone una gran ventaja para mantener un epitelio sano rápida y constantemente.

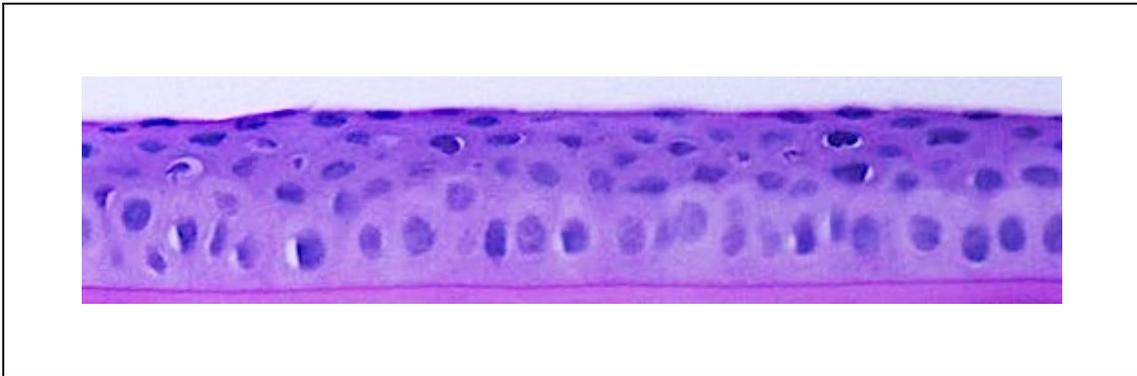


Figura 2.2. Imagen del epitelio corneal humano obtenida mediante microscopía óptica (40x). (Cortesía del laboratorio de Anatomía Patológica Ocular, IOBA)

Esta capa tiene por un lado una función protectora para el ojo al impedir el paso de agentes patógenos para el medio ocular<sup>12</sup> y por otro el de absorber oxígeno y otros nutrientes necesarios para llevar a cabo las funciones metabólicas que tienen lugar en el tejido corneal.<sup>13</sup> También es importante que

mantenga una homogeneidad a lo largo de toda su superficie, contribuyendo a la estabilización de la película lagrimal, para evitar la degradación de la imagen óptica y consecuente pérdida de calidad visual.<sup>14</sup>

### 2.1.2. Lámina de Bowman

---

Situada a continuación del epitelio se encuentra la lámina de Bowman, que tiene un grosor medio de entre 8 y 12  $\mu\text{m}$ ,<sup>7</sup> y va adelgazando con la edad hasta perder un tercio de su grosor aproximadamente.<sup>15</sup> Es una estructura acelular, compuesta por fibras de colágeno y matriz extracelular.<sup>16</sup> Aunque su rol no está completamente dilucidado, se cree que esta capa se encarga de proteger la invasión subepitelial, acelerar la recuperación sensorial del epitelio o impedir la afectación estromal en patologías como la insuficiencia límbica, el pterigium o tumores epiteliales.<sup>17</sup> De cualquier manera se cree que tiene una función superflua, ya que es una capa que carece de capacidad regenerativa y existen estudios que confirman la estabilidad del resto de tejido corneal a pesar de su ausencia (debido a traumatismos o cirugías).<sup>18</sup>

### 2.1.3. Estroma

---

La siguiente capa corneal es el estroma, que comprende aproximadamente el 90% del total del grosor corneal<sup>19</sup> (tomando como referencia un grosor corneal total de aproximadamente 535  $\mu\text{m}$ ,<sup>8</sup> el espesor del estroma sería de unas 480  $\mu\text{m}$ ). Está compuesto por una matriz extracelular formada por queratocitos distribuidos entre las fibras de colágeno (principalmente de tipo I) regularmente ordenadas en láminas paralelas.<sup>7</sup> Ésta regular estructura es la responsable de que la córnea produzca una mínima

dispersión de la luz (menos del 1%)<sup>20</sup> dando lugar a una córnea transparente. El incremento del espesor estromal debido al aumento de la cantidad de agua en su matriz provoca desorden en el espacio regular y constante de sus fibras de colágeno, lo que (dependiendo del tamaño del edema) puede conducir a pérdida de transparencia corneal y por lo tanto de la función principal de la córnea como elemento refractivo.<sup>21</sup>

#### 2.1.4. Membrana de Descemet

---

La membrana de Descemet se encuentra adherida al estroma. Tiene un espesor aproximado de 10  $\mu\text{m}$  y es una membrana que se engrosa progresivamente con la edad<sup>22</sup> hasta alcanzar valores alrededor de las 20  $\mu\text{m}$ .<sup>23</sup> Se compone básicamente de colágeno tipo IV.<sup>7</sup>

#### 2.1.5. Endotelio

---

El endotelio corneal es la capa más interna de la córnea, limita con la cámara anterior y está en contacto con el humor acuoso. Es una capa monocelular de entre 4 y 6  $\mu\text{m}$ <sup>7</sup> de grosor con la apariencia de un mosaico de células hexagonales (figura 2.3). Su función principal es la de mantener el nivel normal de deshidratación de la córnea y evitar el edema, con el fin de prevenir la pérdida de transparencia corneal.<sup>21</sup>

Las células del endotelio no tienen capacidad regenerativa<sup>20</sup> o está muy limitada,<sup>24</sup> por lo que se produce una reducción progresiva en su número con la edad.<sup>24</sup> En un adulto joven (alrededor de 30 años de edad), la densidad celular es de entre 2700 y 2900 células/ $\text{mm}^2$ .<sup>25</sup> El umbral crítico para mantener

la integridad del endotelio y por consiguiente para mantener la transparencia corneal y la función visual<sup>24</sup> es de 400-500 células/mm<sup>2</sup>.

La respuesta a la pérdida de células endoteliales es una migración y expansión de las células adyacentes supervivientes, que cubren los huecos creados y se unen de nuevo manteniendo la barrera endotelial.<sup>26</sup>

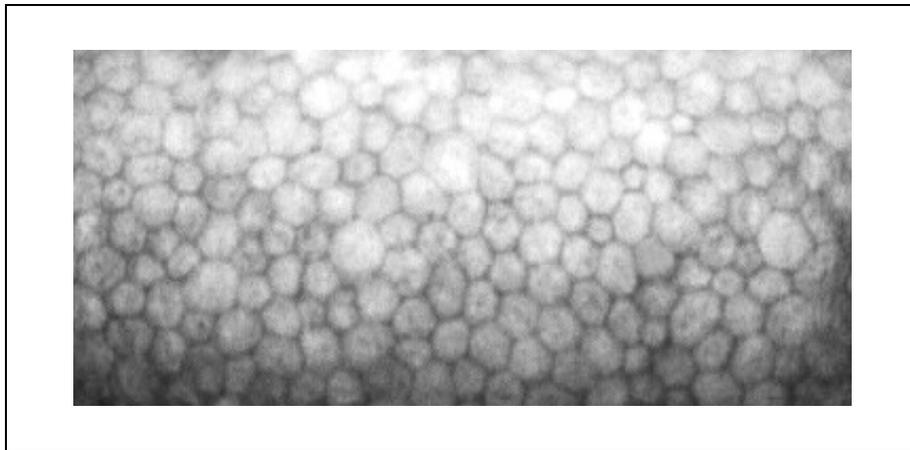


Figura 2.3. Imagen del endotelio corneal humano obtenida mediante microscopía especular.



## 2.2. Fisiología de la córnea

# FUNCIÓN BARRERA de epitelio y endotelio

La principal función del epitelio de la córnea es la protección ante agentes infecciosos.<sup>12</sup> El endotelio corneal por su parte se encarga de mantener el estado de relativa deshidratación corneal y con ello su transparencia.<sup>27</sup> Las uniones intercelulares denominadas "tight junctions" son las encargadas de que ambas capas cumplan esta función.<sup>28</sup> Esta sección revisa brevemente los fundamentos básicos de la función barrera de epitelio y endotelio para contextualizar el uso de la técnica empleada, bioimpedancia corneal, en los experimentos que conforman la presente Tesis Doctoral.

### 2.2.1. Tight junctions

---

Desde un punto de vista funcional, el rol de todo tejido epitelial o endotelial es el de proteger del exterior el medio al que limita y tapizarlo o cubrirlo por la zona interna.<sup>29</sup> Así ocurre con la piel, el tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, epitelio y endotelio corneal, etc.

Para cumplir con su función es indispensable que las células que componen dichos epitelios se encuentren estrechamente unidas, sellando los espacios entre células adyacentes de tal manera que se cree una barrera mecánica y química frente al medio externo. Estas uniones de los espacios intercelulares tienen lugar gracias a los complejos de unión denominados tight junctions (TJ) o uniones estrechas.<sup>29</sup>

Las uniones celulares del tipo TJ se localizan en la zona apical entre los espacios intercelulares.<sup>30</sup> Clásicamente se entiende su función como la creación de una barrera entre el exterior y el interior impidiendo el libre flujo de sustancias a su través y regulando el paso de iones, agua y otras moléculas por los espacios entre célula y célula.<sup>29</sup> También son la primera línea de defensa frente a agresiones mecánicas (piel, epitelio corneal, etc.).<sup>30</sup>

La disfunción de las TJ está íntimamente ligada a diferentes condiciones patológicas en el humano dependiendo del tejido afectado (edema, retinopatía diabética, asma, dermatitis atópica, esclerosis múltiple, infecciones virales, cáncer, etc.).<sup>29</sup>

## 2.2.2. Función barrera del epitelio

Las células superficiales del epitelio corneal están estrechamente unidas por la zona apical de sus paredes laterales mediante uniones intercelulares de tipo TJ<sup>31</sup> (figura 2.4). Su propósito es el de actuar como primera línea de defensa (tanto mecánica como química) de la córnea.<sup>12</sup> Esta función de barrera impide el paso de organismos patógenos y pérdida de fluidos, ofreciendo resistencia a invasiones infecciosas como la queratitis microbiana (una de las complicaciones más graves de las reportadas entre los usuarios de LC hidrofílicas).<sup>32</sup> Por consiguiente, para que el epitelio corneal lleve a cabo su función de barrera, es imprescindible su continuidad mediante las uniones TJ a lo largo de toda su superficie. Cualquier brecha o rotura de su integridad proporciona una ruta de entrada para patógenos en la córnea, constituyendo una amenaza para la salud ocular y la visión. La función barrera del epitelio corneal puede verse comprometida, entre otros factores, por el uso de LC,<sup>32</sup> efecto de las soluciones de mantenimiento de LC,<sup>33</sup> cualquier daño de tipo mecánico,<sup>34</sup> y otros.

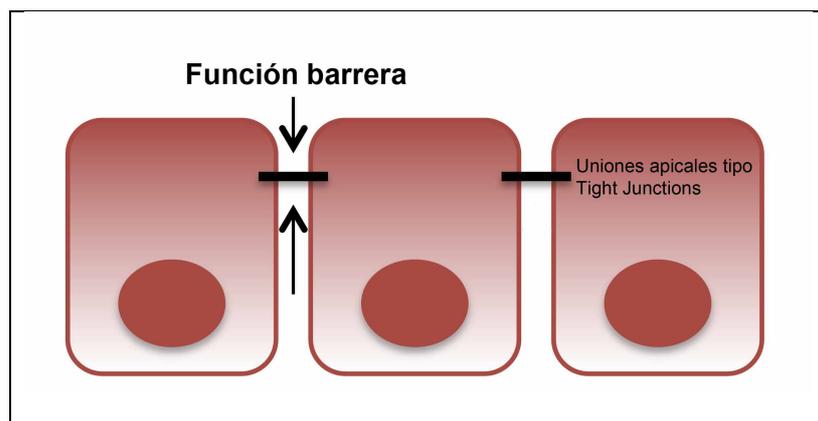


Figura 2.4. Representación de la función barrera del epitelio corneal. Las tight junctions regulan el paso de moléculas a través de los espacios paracelulares.

Afortunadamente, las células epiteliales proliferan rápida y continuamente.<sup>10</sup> Este proceso cíclico de renovación de epitelio corneal se traduce en un mantenimiento continuo de su función de barrera (apartado 2.1.1.).

### 2.2.3. Función barrera del endotelio

---

El endotelio corneal es la capa que tapiza la córnea por su parte interna, separando el estroma de la cámara anterior. Su función consiste en mantener el estado normal de relativa deshidratación de la córnea y, consecuentemente, la transparencia de este tejido necesaria para que en su conjunto cumpla su función óptica.<sup>21</sup>

Para llevar a cabo su función, el endotelio corneal se comporta como una membrana parcialmente permeable al paso de diferentes moléculas en ambas direcciones: desde la cámara anterior hacia el estroma (función pasiva o barrera) y desde el estroma hacia la cámara anterior (función activa o bomba metabólica)<sup>35</sup> (figura 2.5). Ambas funciones son complementarias y necesarias, conduciendo hacia un equilibrio entre la cantidad de agua que entra y sale del estroma y evitando por la tanto la edematización del tejido estromal.

En el caso de la función pasiva o función barrera del endotelio, al igual que sucede con el epitelio, ésta se debe a las fuertes uniones intercelulares que se encuentran en la zona apical de las células endoteliales o TJ.<sup>28</sup> Su función es la de presentar resistencia y por tanto regular el paso de solutos y agua hacia el estroma a través de la vía intercelular, sin embargo no se trata de una barrera completamente impermeable, pues el paso de ciertas

sustancias es necesario para la llegada de nutrientes al estroma desde la cámara anterior.<sup>36</sup>

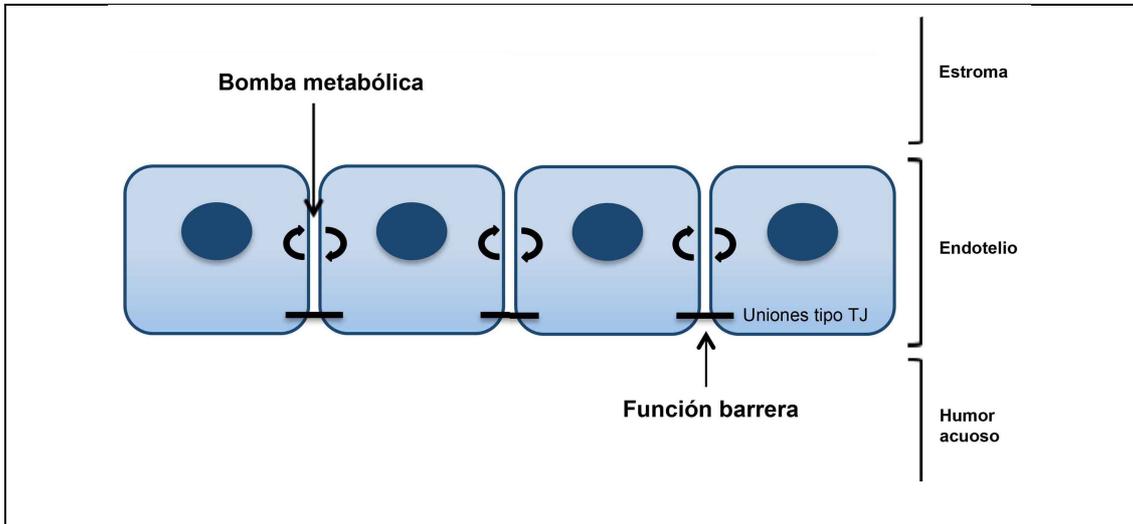


Figura 2.5. Representación de la función barrera y bomba metabólica del endotelio corneal. Ambas funciones colaboran para mantener en equilibrio la relativa deshidratación de la córnea.

En la dirección opuesta, desde el estroma hacia la cámara anterior, actúan las bombas metabólicas de las células endoteliales (conocidas como bombas  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) que se encargan de equilibrar el paso de fluidos hacia el estroma.<sup>35</sup> Para el correcto funcionamiento de esta bomba endotelial es necesaria energía proveniente de la glucosa del humor acuoso y el oxígeno de la lágrima.<sup>35</sup>

Bajo condiciones fisiológicas normales, la función barrera del endotelio y la bomba metabólica trabajan conjuntamente para mantener la desturgescencia de la córnea.<sup>35</sup> Sin embargo, la disfunción de las uniones TJ produce una disminución de la resistencia que ofrece el endotelio al paso de moléculas al estroma, lo que provoca un aumento de la permeabilidad del endotelio traducido en un mayor paso de fluidos desde el humor acuoso y en término final, aparición de edema corneal<sup>28</sup> (figura 2.6).

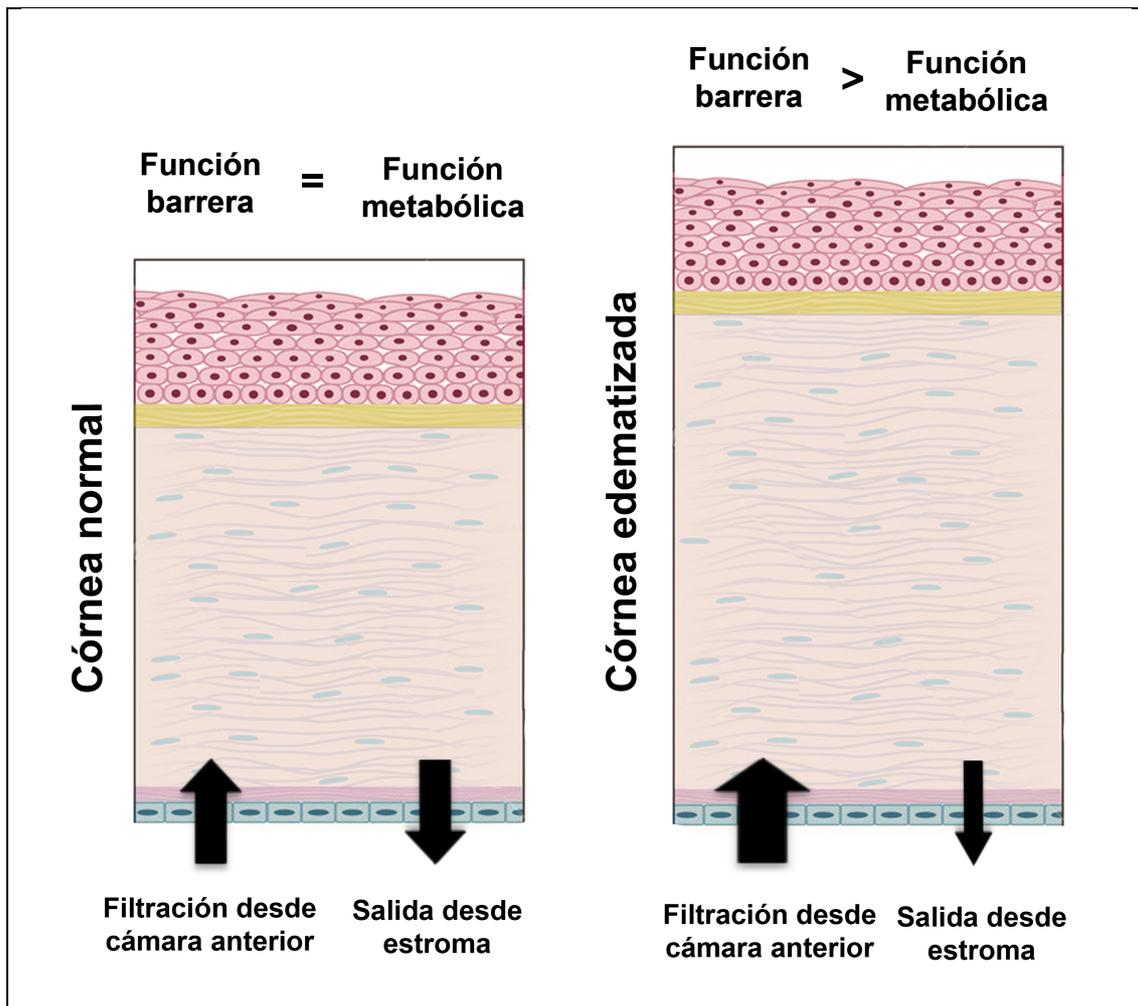


Figura 2.6. Representación de la regulación de la fisiología corneal en una córnea normal (izquierda) y en una córnea edematizada (derecha). Cuando la función barrera del endotelio corneal falla, permite una mayor filtración desde la cámara anterior hacia el estroma. La función de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  no es capaz de contrarrestar esta alteración, y el equilibrio entre ambas funciones se pierde, lo que provoca edema corneal. (Adaptación de Srinivas, SP. 2010)<sup>28</sup>

### 2.3. Evaluación de la fisiología corneal

## TÉCNICAS indirectas

En 1880 Blix determinó por primera vez el espesor de la córnea humana *in vivo*.<sup>37</sup> Desde entonces, los avances para obtener el valor de la paquimetría corneal de la manera más precisa posible han ido en constante crecimiento. El salto más grande se dio durante el siglo XX, con el desarrollo de nuevas tecnologías que resultaron en un amplio rango de herramientas disponibles para la medición de distintos parámetros de la córnea, evaluación de su salud y monitorización y manejo de sus afecciones. El propósito de esta sección es el de revisar brevemente las características más importantes de las diferentes tecnologías utilizadas actualmente en la práctica clínica para evaluar el espesor de la córnea. Estos dispositivos obtienen el valor de la paquimetría corneal de distinta manera.

Para determinar el grado de edema corneal se calcula la diferencia en la paquimetría antes y después de una situación dada (porte de LC, cirugía corneal, disfunción endotelial, y otras). Clásicamente el edema se expresa como el porcentaje de cambio en el espesor corneal<sup>38</sup> (tabla 2.1).

$$\% \text{ edema} = [(P_{\text{final}} - P_{\text{basal}}) / P_{\text{basal}}] \times 100$$

Tabla 2.1. Fórmula empleada para calcular el porcentaje de edema.  $P_{\text{final}}$  = paquimetría final.  $P_{\text{basal}}$  = paquimetría basal.

### 2.3.1. Microscopía especular

---

En 1920, Vogt introdujo la biomicroscopía especular como una técnica para visualizar el endotelio corneal humano *in vivo* observando la luz reflejada desde esta capa.<sup>39</sup> Sin embargo, no fue hasta finales de los años 60 cuando esta técnica comenzó su verdadera evolución gracias a Maurice,<sup>40</sup> y tecnologías más sofisticadas fueron presentadas permitiendo una evaluación corneal más exhaustiva. Los actuales microscopios especulares son instrumentos ópticos de no contacto que utilizan tecnología de autofocus.<sup>41</sup> Proporcionan medidas de la paquimetría corneal y la posibilidad de realizar un profundo análisis de las células del endotelio: densidad celular, polimegatismo, pleomorfismo, identificación de blebs, etc.

### 2.3.2. Paquimetría ultrasónica

---

El uso de los ultrasonidos para la exploración ocular data de los años 50, con los trabajos de Mundt y Hughes<sup>42</sup> y Baum y Greenwood.<sup>43</sup> La paquimetría ultrasónica mide el espesor de la córnea emitiendo energía desde la sonda que está en contacto con la córnea. Parte de esta energía vuelve reflejada en forma de eco. El tiempo que tarda en regresar a la sonda es la información utilizada para calcular el espesor corneal.

Ésta técnica presenta una serie de ventajas como su fácil uso, ser un dispositivo portátil o un bajo coste en comparación con la mayoría de las tecnologías modernas que miden el espesor corneal. Se considera el Gold Standard para obtener la paquimetría corneal. Sin embargo, y aunque es una herramienta esencial en la práctica clínica, no está exenta de limitaciones: instilación obligada de anestesia tópica sobre la superficie corneal (debido al

contacto directo de la sonda con la córnea), incomodidad del paciente, o dificultad a la hora de colocar repetidas veces la sonda perpendicular a la córnea y siempre en el mismo punto.<sup>44,45</sup>

### 2.3.3. Microscopía confocal

---

La córnea humana fue examinada mediante microscopía confocal por primera vez *in vivo* en 1990.<sup>46</sup> Esta técnica se basa en el principio confocal: los caminos de iluminación y detección comparten el mismo plano focal (de aquí el término “confocal”), solucionando el problema de la luz desenfocada de la microscopía convencional.

Esta técnica proporciona paquimetría corneal total y epitelial, y es también capaz de evaluar la córnea a nivel celular<sup>47</sup> por lo que cualquier cambio en la morfología celular o la presencia de estructuras anómalas pueden ser detectadas *in vivo*. También permite la evaluación no invasiva de los nervios corneales<sup>48</sup> y la cuantificación de la densidad de queratocitos del estroma o la densidad celular del endotelio, entre otras capacidades.<sup>49-51</sup>

### 2.3.4. Tomografía de coherencia óptica

---

La tomografía de coherencia óptica (OCT, siglas en inglés) apareció por primera vez en 1991 para la evaluación del segmento posterior del ojo.<sup>52</sup> Tres años después, en 1994, aparecieron las primeras referencias de evaluación del segmento anterior mediante OCT.<sup>53</sup> Desde entonces, el refinamiento de esta técnica ha ido progresando hacia el análisis del segmento anterior. La tecnología OCT se basa en interferometría de baja coherencia.

Mide el retardo de la luz infrarroja (1310 nm) reflejada desde las diferentes estructuras del segmento anterior en comparación con una reflexión de referencia.

En la actualidad existen dos tipos diferentes de OCT en el mercado: los OCT de dominio en el tiempo (TD - OCT, del anglosajón time-domain), en los cuales la variación de la posición del espejo de referencia produce las imágenes transversales; y los OCT de dominio espectral (SD - OCT, del anglosajón spectral-domain), en los que el espejo de referencia es fijo lo que permite una mayor velocidad de adquisición debido a la ausencia de elementos mecánicos.<sup>54</sup> Además de una mayor velocidad de captura de la imagen, los SD - OCT poseen una mayor resolución, lo que permite la visualización de más detalles de la estructura del tejido examinado. Sin embargo, los TD - OCT son capaces de mostrar todas las estructuras del segmento anterior en una sola imagen, mientras que los SD - OCT procesan únicamente una pequeña parte.<sup>52</sup>

La técnica del OCT proporciona una amplia variedad de mapas paquimétricos de la córnea, incluyendo medidas del resto estromal y espesor del flap después de cirugía refractiva.<sup>52</sup> Una de las mayores ventajas del sistema OCT es que permite medir el espesor corneal sin necesidad de retirar la LC en el caso de los usuarios de LC, lo que lo convierte en una excelente herramienta para monitorizar cambios en el espesor corneal secundarios al porte de LC.<sup>55</sup>

La técnica OCT es también capaz de evaluar diferentes estructuras del segmento anterior a parte de la córnea, incluyendo las dimensiones de la cámara anterior (profundidad de la cámara anterior, ángulo iridocorneal y distancia de ángulo a ángulo, entre otras), y analizar el cristalino (espesor y densidad).<sup>56</sup>

También permite hacer una medida precisa de la localización de los anillos corneales intraestromales en los pacientes con queratocono<sup>52</sup> o visualizar las lentes fáquicas intraoculares después de su implantación.

### 2.3.5. Topografía de elevación

---

En 1995 apareció la topografía de elevación por escáner de hendidura, una combinación de una técnica de proyección (escáner de hendidura) y otra de reflexión (principio de los discos de Plácido). Su objetivo era el de proporcionar medidas de la curvatura anterior y posterior de la córnea y obtener mapas de su estructura.<sup>57</sup> El Orbscan II (Bausch and Lomb Inc., Rochester, NY, USA) es el único dispositivo disponible en el mercado que emplea esta tecnología actualmente.<sup>58</sup> Ofrece una amplia gama de variables y mapas, incluyendo mapas paquimétricos de la córnea, su poder óptico, profundidad de la cámara anterior, distancia blanco-blanco, y otros datos del segmento anterior del iris y cristalino.<sup>59</sup>

El Orbscan II determina el espesor corneal como la diferencia entre la superficie anterior y posterior de la córnea. Esta información se muestra en forma de mapas que siguen un código de colores, donde el verde representa el rango esperado de paquimetría corneal, el púrpura y colores cálidos indican áreas más gruesas y el rojo indica áreas más delgadas. Estos mapas también incluyen valores numéricos para la paquimetría corneal. En comparación con el Gold Standard (la paquimetría ultrasónica) puede proporcionar valores de paquimetría significativamente diferentes, por lo que el fabricante sugirió introducir un factor acústico de 0,92 para transformar las medidas del Orbscan II en sus equivalentes de paquimetría ultrasónica.<sup>60</sup> Sin embargo, el uso de cualquier factor acústico es controvertido, y diferentes autores recomiendan no utilizarlo cuando se requiere una evaluación prospectiva del paciente.<sup>61,62</sup>

### 2.3.6. Topografía de Scheimpflug

---

Theodor Scheimpflug fue un cartógrafo de la marina austríaca, y fue quien primero introdujo el principio de Scheimpflug en el campo de la fotografía a comienzos del siglo XX.<sup>63</sup> El principio de Scheimpflug describe la condición óptica de las imágenes en las que el plano de un objeto no es paralelo a la película de la cámara. Se ha aplicado en el campo de la oftalmología desde finales de los años 50, cuando Drews propuso su uso para obtener imágenes del segmento anterior del ojo.<sup>64,65</sup> Sin embargo, esta técnica no comenzó a emplearse en la práctica clínica hasta la aparición en 1995 de nuevos instrumentos, incluyendo el Pentacam (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Alemania) y el Galilei (Ziemer Group, Port, Suiza).<sup>66</sup> Ambos dispositivos comparten muchas de sus características y miden básicamente los mismos parámetros corneales que el Orbscan II, incluyendo elevación corneal, curvatura y espesor. Es más, el Pentacam representa sus mapas siguiendo el mismo código de colores que emplea el Orbscan II en sus mapas, donde el verde simboliza valores normales y los colores rojizos indican valores anormales.

De manera similar a la topografía de elevación, la topografía de Scheimpflug describe un amplio rango de parámetros corneales, variables y mapas, incluyendo datos de la topografía anterior y posterior de la córnea, queratometría, radio de curvatura, poder corneal (con la cantidad y eje del astigmatismo), datos de la paquimetría (espesor corneal en el centro de la córnea, en el ápex, en el punto más delgado de la córnea, en localizaciones de la periferia corneal, etc.), excentricidad corneal, profundidad de la cámara anterior, diámetro pupilar, tamaño del ángulo iridocorneal, opacificación y espesor del cristalino, entre otros.<sup>67</sup>

Al igual que la topografía de elevación, la principal ventaja de la técnica de Scheimpflug es que es un método de no contacto con rápidos tiempos de adquisición, además de permitir facilidad de uso sin pasar por un largo periodo de aprendizaje.<sup>56</sup>

### 2.3.7. Uso de la fluoresceína en la evaluación ocular

---

La fluoresceína es una molécula que posee la propiedad de emitir luz verde fluorescente cuando recibe fotones de una longitud de onda de aproximadamente 490 nm (luz azul cobalto). Fue sintetizada por primera vez por Baeyer en 1871,<sup>68</sup> aunque fue Pfluger quien propuso su aplicación para la evaluación de abrasiones corneales en 1882.<sup>69</sup> Desde entonces, y en combinación con la lámpara de hendidura, su uso en el ejercicio clínico para la evaluación de la superficie corneal se ha extendido convirtiéndose en una práctica rutinaria en cualquier consulta de optometría u oftalmología. Algunos de los principales usos de la fluoresceína son detectar defectos, queratitis o erosiones en el epitelio corneal,<sup>70</sup> así como para evaluar la superficie ocular en usuarios de LC<sup>71</sup> u otras condiciones clínicas.

La fluoresceína se instila de manera tópica sobre la superficie anterior del ojo y rápidamente se mezcla con la película lagrimal, dando un tinte amarillento a la superficie corneal (visto con luz blanca). Al observar con luz azul cobalto, las áreas dañadas serán identificadas por un color verde fluorescente. Así, se puede realizar de manera rápida y sencilla una evaluación macroscópica de los defectos de la superficie anterior del ojo, aunque la información obtenida no pueda relacionarse de manera objetiva con el estado de la función barrera o permeabilidad del epitelio o endotelio corneal, y se trate de una cuantificación subjetiva a la hora de gradar la severidad de los hallazgos.



## 2.4. Evaluación de la fisiología corneal

# TÉCNICAS directas

Desafortunadamente, las técnicas para la evaluación directa y de manera cuantitativa del estado de la fisiología corneal no han evolucionado tan rápido como aquellas técnicas destinadas a la evaluación de la morfología de este tejido, que permiten la valoración indirecta del estado de la homeostasis corneal. De hecho, hasta la fecha la única técnica que ha conseguido cierta aplicabilidad dentro de la investigación en contactología para evaluar el estado de la función barrera del epitelio y endotelio corneal en humanos *in vivo* es la medida de la fluorofotometría, un método que consiste básicamente en instilar fluoresceína sobre la superficie corneal y calcular la cantidad que penetra a través de estas capas hacia estructuras más profundas del ojo.<sup>72</sup> También es posible evaluar el estado de la función barrera de epitelio y endotelio mediante el estudio de las propiedades eléctricas pasivas del tejido *in vivo* aunque de momento sólo es aceptable su aplicación en modelos de experimentación animal, pues la técnica empleada resulta demasiado invasiva para su implantación en la práctica clínica.<sup>73</sup>

El objetivo de esta sección es el de revisar las características más destacadas de estos dos métodos empleados en la actualidad para evaluar el estado de las barreras corneales.

### 2.4.1. Fluorofotometría

---

En 1952 Langley y MacDonald<sup>74</sup> sugirieron por primera vez instilar fluoresceína sobre la superficie corneal para observar después cómo ésta penetraba hasta el humor acuoso a través del endotelio. Después de varios intentos fallidos por parte de distintos autores a lo largo de los años siguientes, fueron Jones y Maurice los que publicaron en 1966 los principios de la técnica de la fluorofotometría para la evaluación de la dinámica del humor acuoso.<sup>3</sup> En los años 70, Ota<sup>75</sup> y Yablonsky<sup>76</sup> introdujeron algunas mejoras matemáticas que simplificaron la técnica y, desde entonces, este método apenas ha experimentado evolución: la misma metodología descrita entonces se sigue empleando hoy en día,<sup>77,78</sup> a pesar de ser una técnica que presenta importantes inconvenientes.

La fluorofotometría es una técnica no invasiva capaz de determinar por métodos ópticos la concentración de fluoresceína en los tejidos y compartimentos oculares. Aprovecha la característica de fluorescencia de la molécula de la fluoresceína para calcular su concentración en un medio determinado. De esta manera, cuando la fluoresceína recibe fotones de una longitud de onda de aproximadamente 490 nm (luz azul cobalto) emitirá fotones a aproximadamente 525 nm (luz verde). El fluorofotómetro recoge la luz cercana a esta longitud de onda y cuantifica el número de fotones a lo largo del eje ocular. La estimación de la permeabilidad del epitelio y el endotelio corneal mediante la medida de la fluorofotometría consiste por tanto en la instilación de fluoresceína sobre la superficie de la córnea y calcular los cambios en el tiempo de su concentración en córnea (función barrera del epitelio) y cámara anterior (función barrera del endotelio), utilizando un fluorofotómetro.

Sin embargo, a pesar de que esta técnica es la única utilizada para evaluar el estado de la función barrera de epitelio y endotelio, la fluorofotometría está lejos de ser una técnica fiable: se trata de un método que consume un tiempo excesivo,<sup>79</sup> de baja repetibilidad,<sup>80</sup> y que necesita un mayor refinamiento para hacer de ella una herramienta clínica verdaderamente útil.<sup>72,81</sup> Además, existen una serie de factores que afectan a la intensidad o brillo de la fluorescencia de la molécula de fluoresceína que son difícilmente controlables al realizar la medida de la fluorofotometría y que también podrían contribuir a la falta de precisión de la técnica, como son el pH de la superficie corneal (la absorción y emisión de luz por parte de la molécula de la fluoresceína es dependiente del pH de la superficie ocular)<sup>70,82</sup> o la distribución de la fluoresceína en el medio estudiado (la intensidad de la fluorescencia es mayor en áreas con mayor concentración de ésta molécula, como en el menisco lagrimal).<sup>68,83</sup>

La inconsistencia entre diferentes estudios que han empleado esta técnica pone de manifiesto estas carencias. McNamara<sup>84</sup> reportó un incremento medio del 41% en la permeabilidad epitelial después de 1 hora de porte de LC hidrofílicas con los párpados ocluidos, mientras que Lin<sup>85</sup> no halló cambios en la permeabilidad epitelial en sujetos que llevaron LC hidrofílicas en las mismas condiciones.

En cuanto al endotelio, Dutt<sup>86</sup> encontró un incremento significativo de la permeabilidad endotelial en un grupo de usuarios de LC (con una media de 4 años de uso) frente a un grupo de sujetos control. Sin embargo, Bourne<sup>87</sup> no halló cambios significativos en la función barrera endotelial en un grupo de usuarios de LC (con al menos 5 años de uso) frente a un grupo de sujetos control. Finalmente, Chang<sup>78</sup> reportó un descenso de la permeabilidad endotelial en dos grupos de usuarios de LC (divididos en función del tiempo de uso de las lentes: menos de 5 años y más de 5 años) frente a un grupo de

sujetos control. Este último autor atribuye sus resultados (descenso de la permeabilidad endotelial) a la falta de fiabilidad del método de medida de la fluorofotometría.

Las limitaciones de la técnica de medida de la fluorofotometría han contribuido a que no haya llegado a ser un método popular para la evaluación de la permeabilidad epitelial y endotelial en la práctica clínica, a pesar de ser la única capaz de hacerlo en humanos *in vivo* en la actualidad.

#### 2.4.2. Resistencia eléctrica transepitelial

---

También es posible evaluar la integridad de la función barrera de epitelio y endotelio *in vivo* mediante el estudio directo de las propiedades eléctricas pasivas del tejido, aunque en la actualidad se trata de una técnica aplicable únicamente en modelo animal. Los primeros intentos de elucidar las propiedades eléctricas de la córnea datan de los años 40, con los trabajos de Holt y Cogan.<sup>4</sup> Desde ese momento las investigaciones de distintos autores han conducido al desarrollo de las técnicas que se emplean en la actualidad.<sup>73,88-92</sup> La revisión de estos avances escapa al interés de este trabajo.

La función de barrera del epitelio y el endotelio corneal consiste en presentar resistencia contra agentes patógenos (función barrera del epitelio)<sup>12</sup> o contra el movimiento de fluidos desde la cámara anterior hacia la córnea (función barrera del endotelio).<sup>35</sup> Cuando la función de estas barreras se ve alterada, la resistencia ofrecida disminuye permitiendo una mayor entrada a su través (sección 2.2). El estudio de las propiedades eléctricas pasivas de epitelio y endotelio permite medir la resistencia real de estas barreras mediante el

análisis de la oposición que estas capas ofrecen a ser atravesadas por una corriente eléctrica dada. La familia de métodos en los que se aplica una corriente eléctrica para evaluar el estado de un tejido dado se denomina bioimpedancia, aunque la mayoría de la literatura se refiere a estas medidas como medidas de la resistencia eléctrica transepitelial (TER, del anglosajón *translayer electrical resistance*). La medida del TER epitelial y endotelial permite una evaluación cuantitativa del estado de su función barrera.

La mayoría de los estudios en este campo han sido llevados a cabo en modelos *ex vivo*<sup>93</sup> o *in vitro*,<sup>33</sup> hasta que Uematsu desarrolló en 2007 un modelo para determinar la medida del TER *in vivo* en córnea de conejo.<sup>94</sup> Sin embargo, la metodología empleada consiste en la aplicación de un electrodo dentro de un anillo relleno de solución salina sobre la superficie corneal y otro dentro de la cámara anterior mediante la realización de una incisión en la córnea periférica (figura 2.7).<sup>94-97</sup>

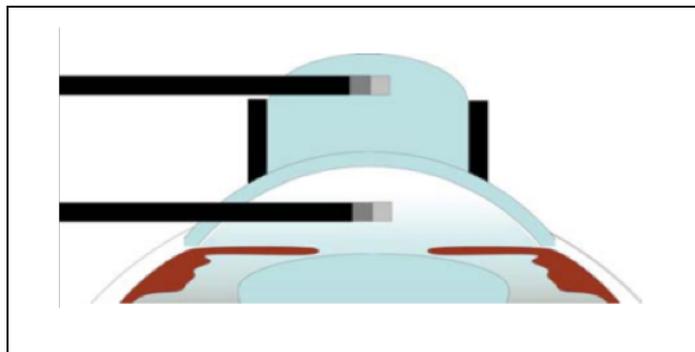


Figura 2.7. Representación de la colocación de los electrodos necesarios para llevar a cabo la medida del TER en modelo animal *in vivo*. (Adaptación de Uematsu, M. 2007)<sup>94</sup>

Desafortunadamente esta técnica es tan invasiva que no puede ser utilizada en la práctica clínica, con humanos *in vivo*.

En resumen, a pesar de ser la única herramienta disponible para evaluar de manera directa la función barrera del epitelio y el endotelio corneal humano *in vivo*, la fluorofotometría tiene un valor limitado en la práctica clínica dadas sus desventajas.

Por otro lado las medidas del TER para la valoración directa del estado de la función barrera del epitelio y el endotelio de la córnea no son aplicables a medidas en humanos *in vivo* por su naturaleza altamente invasiva. Parece por tanto que existe un vacío de herramientas capaces de valorar la permeabilidad de estas capas de manera no invasiva y eficaz.

## 2.5. Córnea y lentes de contacto

# EDEMA CORNEAL con LC hidrofílicas

Las LC son dispositivos médicos que se colocan sobre la superficie corneal, normalmente para la corrección de las ametropías visuales. Otros usos de las LC incluyen razones cosméticas o terapéuticas.<sup>98</sup> En 2005, se estimó que más de 140 millones de personas en el mundo utilizan LC.<sup>99</sup>

Es ampliamente conocido que el porte de LC altera algunas características de la morfología y fisiología de la superficie ocular.<sup>100</sup> La magnitud de estos cambios está relacionada con el material y diseño de las LC (que condicionan el paso de oxígeno a la córnea), el patrón de porte (diario o continuado, entre otros), tiempo desde que comenzó el uso, hábitos del usuario, y otros.

En esta sección será brevemente descrita la etiología y morfología de los cambios inducidos en el espesor corneal secundarios al porte de LC hidrofílicas.

### 2.5.1. Propiedades de las LC

---

Generalmente, las LC se clasifican dentro de dos tipos principales dependiendo del material del que estén hechas: lentes rígidas permeables a los gases (LCRPG) o lentes blandas o hidrofílicas (LCH).<sup>101</sup> La interacción entre LC y córnea dependerá de las diferentes características de las LC, de su material y diseño. El objetivo final es el de mantener la salud y fisiología corneal normal.

La habilidad de una LC para mantener la homeostasis de la córnea viene normalmente determinada por la cantidad de oxígeno que es capaz de transmitir desde la atmósfera a la córnea.<sup>102</sup> Existen dos parámetros que permiten la cuantificar la cantidad de oxígeno que llega a la córnea:<sup>103</sup>

- Permeabilidad al oxígeno (Dk): la permeabilidad al oxígeno es una característica del material de las LC. Se refiere a cómo de permeable es ese material al paso del oxígeno y otros gases a su través.<sup>104</sup>
- Transmisibilidad al oxígeno (Dk/t): la transmisibilidad al oxígeno es una característica del diseño de las LC. No es apropiado decir que el parámetro Dk es representativo de todas la LC hechas de un material dado, pues la transmisión real de oxígeno a la córnea también depende del diseño, el poder refractivo y en resumen del espesor de cada LC.<sup>105</sup>

### 2.5.2. Edema corneal inducido por el porte de LCH

---

Cuando se coloca una LC sobre la córnea puede decirse que ésta actúa como una barrera entre el medio ambiente y la superficie corneal, disminuyendo la difusión de oxígeno al tejido corneal y por lo tanto induciendo hipoxia.<sup>106</sup> Los mecanismos moleculares que subyacen el edema corneal secundario al uso de LC han sido extensamente revisados en la literatura existente.<sup>35</sup>

Brevemente explicado, como resultado de la falta de oxígeno las funciones de barrera y metabólica del endotelio se ven alteradas, lo que conduce a una mayor difusión de fluido desde la cámara anterior al estroma, el consiguiente aumento del contenido de agua estromal y, finalmente, edema corneal. Niveles de más de un 6% de edema causan cambios en la estructura corneal que suponen una amenaza para el mantenimiento de su transparencia, su función óptica y en última instancia su salud.<sup>107</sup>

Como se ha mencionado anteriormente (secciones 2.3 y 2.4), existen dos modos de evaluar el impacto que ejerce una LC sobre el espesor de la córnea: indirectamente (cambios morfológicos) y directamente (cambios fisiológicos).

Los métodos indirectos se basan en cuantificar el espesor corneal antes y después del porte de LC, con el objetivo de calcular el porcentaje de edema inducido (tabla 2.1). Éstos métodos permiten conocer el incremento del espesor corneal, lo que es útil para poder comparar con ese valor de seguridad del 6%<sup>107</sup> y tomar decisiones clínicas como cambiar las características o diseño de la LC utilizada, modificar el patrón de uso, o saber si es seguro o no para el

usuario continuar con el porte de LC, entre otras. Sin embargo, este método no permite conocer el estado real de la función barrera del endotelio corneal, la principal afectada por la hipoxia inducida por las LC. Para evaluarlo, el único método del que se dispone en la práctica clínica es la técnica basada en medidas fluorofotométricas, la cual no está exenta de limitaciones que impiden su popularización en la práctica clínica (como se ha explicado en el apartado 2.4.1).

Además, aunque el fallo en la función barrera del epitelio no es responsable del edema corneal inducido por el porte de LC, sí que induce pérdida y rotura de las TJ del epitelio, lo que puede provocar una complicación clínica.<sup>77</sup> Una de las complicaciones más graves tanto para la visión como para la salud ocular de las reportadas entre usuarios de LCH es la queratitis microbiana.<sup>108</sup>

Nuevamente, en la actualidad el único modo de evaluar el estado de las TJ del epitelio corneal en humanos *in vivo* es mediante medidas de la fluorofotometría (apartado 2.4.1).

# 3

**BIOIMPEDANCIA**

**CORNEAL**

**APLICACIÓN NO INVASIVA IN VIVO**



### 3.1. Introducción

## DESCRIPCIÓN de la técnica

El estudio de las propiedades eléctricas pasivas de la córnea se emplea habitualmente para evaluar la permeabilidad de epitelio y endotelio corneal en estudios *in vitro*, *ex vivo* o modelo animal *in vivo* (de manera invasiva), tal y como se ha descrito en el apartado 2.4.2. Recientemente, una técnica también basada en el estudio de las propiedades eléctricas pasivas de la córnea, ha sido validada para evaluar de forma no invasiva la permeabilidad de las distintas capas de la córnea en modelo animal (conejos) *in vivo*.<sup>109,110</sup>

En esta sección se describirán las bases electrofisiológicas de esta técnica, se explicarán las características del equipo de medida y se expondrán los resultados previos obtenidos en modelo animal hasta el momento (validación de la técnica).

### 3.1.1. Bases electrofisiológicas

---

La bioimpedancia eléctrica es un método sencillo, rápido y de bajo coste, basado en el estudio de las propiedades eléctricas pasivas de un tejido biológico. Ésta técnica observa cómo circula una corriente eléctrica a través del tejido, en concreto, estudia la resistencia que éste ofrece al paso de la corriente a su través. Así, cuanto mayor sea la resistencia ofrecida por el tejido menor será su permeabilidad y viceversa.

Para saber cómo circula una corriente eléctrica a través de un tejido dado, es necesario primero aplicar esta corriente para después estudiar su comportamiento. A su vez, hay que tener en cuenta que la corriente no circulará de la misma manera dependiendo de su frecuencia, por lo que ésta ha de quedar determinada cada vez que se aplique la corriente en el tejido.

En un medio celular, la corriente puede fluir alrededor de las células (medio extracelular) o atravesando las células. A bajas frecuencias (<1 KHz) la mayor parte de la corriente fluye por el medio extracelular, pues no es capaz de penetrar y atravesar las membranas celulares. A mayores frecuencias (>100 KHz) la membrana celular no puede presentar la resistencia suficiente para impedir el paso de la corriente a su través, por lo que ésta fluye de manera indiscriminada por el medio extra e intracelular (figura 3.1).

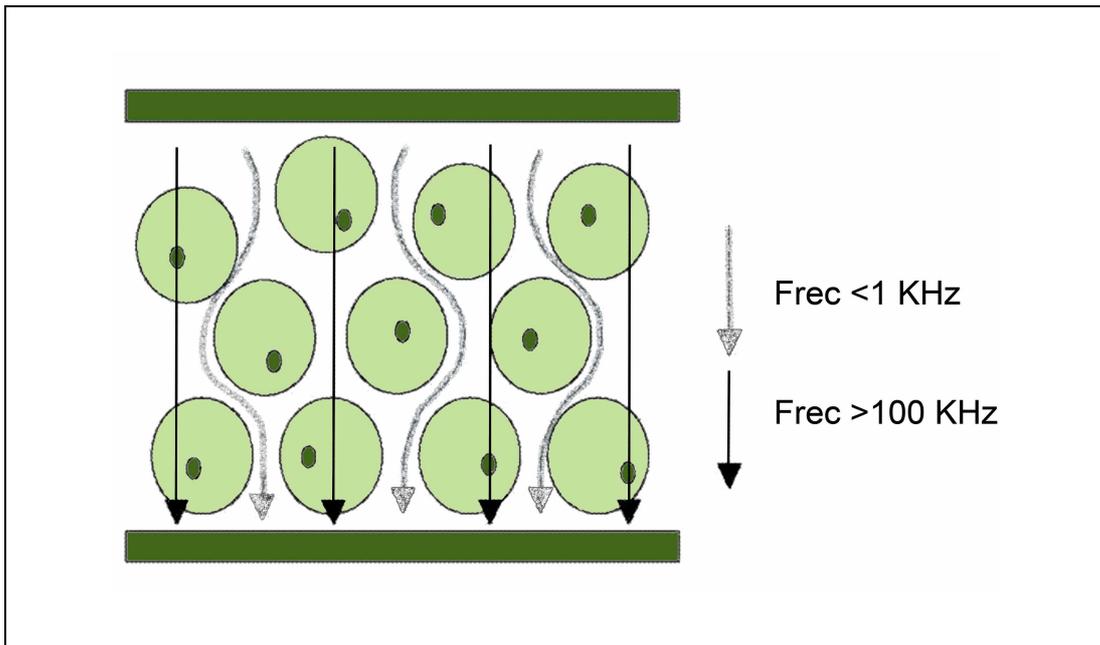


Figura 3.1. Esquema del comportamiento de la corriente eléctrica a diferentes frecuencias al atravesar una capa celular. Línea discontinua: bajas frecuencias (<math><1\text{ KHz}</math>), la corriente circula por el medio extracelular. Línea continua: altas frecuencias (>100 KHz), la corriente atraviesa la pared celular y el medio intracelular. Frec = frecuencia. (Adaptación de Ivorra, A. 2002)

Si se traslada este principio al tejido corneal, las medidas de bioimpedancia obtenidas al aplicar una corriente dada proporcionarán información de la permeabilidad de las distintas capas de la córnea, dependiendo siempre de la frecuencia de la corriente empleada. Una mayor facilidad de la corriente para atravesar una determinada capa corneal se asocia con mayor permeabilidad de esta capa, y viceversa.

Así, en función de la capa que se quiera estudiar (epitelio, estroma o endotelio) se han diferenciado tres rangos de frecuencias para la corriente:

1. Frecuencias menores de 1 KHz o frecuencias bajas: proporciona información del epitelio. La cantidad de corriente eléctrica de baja frecuencia que puede atravesar el epitelio corneal es prácticamente nula debido a su baja permeabilidad (en condiciones fisiológicas normales). Por ello, se asume que los cambios en la bioimpedancia obtenidos al aplicar corrientes de frecuencias menores de 1KHz (frecuencias bajas) se corresponden con cambios en la permeabilidad del epitelio corneal (pérdida de adhesión de la TJ del epitelio).
  
2. Frecuencias de entre 1 y 100 KHz o frecuencias medias: proporciona información del endotelio. En este rango de frecuencias el análisis es más complejo, pues entran en juego varios factores. Por un lado, hay que tener en cuenta que la corriente a estas frecuencias es capaz de atravesar las capas celulares de la córnea (por tanto las capas que tienen una función de barrera: epitelio y endotelio) y llegar a zonas acelulares: estroma y humor acuoso. Por otro lado, la conductividad del humor acuoso es mayor que la del estroma, por lo que la corriente tiende a circular por el humor acuoso. Evidentemente, la corriente que circula por el humor acuoso ha llegado hasta allí atravesando el endotelio por lo que cambios en la bioimpedancia medidos en este rango de frecuencias se corresponden con cambios en la permeabilidad del endotelio (pérdida de adhesión de la TJ del endotelio).
  
3. Frecuencias mayores de 100 KHz o frecuencias altas: proporciona información del estroma. En el caso de frecuencias mayores de 100KHz la corriente atraviesa sin ningún tipo de resistencia las capas celulares (epitelio y endotelio), por lo que

se asume que los cambios en la medida de la bioimpedancia se corresponden con cambios en la conductividad de las zonas acelulares (estroma y humor acuoso). La conductividad del humor acuoso es constante, por lo que cambios en la conductividad a estas frecuencias se atribuyen a cambios en el estroma (influenciado en este caso por variaciones en el grado de hidratación o edema corneal).

Aplicando estas nociones al estudio de la bioimpedancia de epitelio y endotelio se puede obtener información relativa al estado de su permeabilidad o función barrera.

Así, para estudiar cambios en la permeabilidad del epitelio, se aplicará una corriente de baja frecuencia ( $<1\text{KHz}$ ) a la córnea. Una disminución de la resistencia ofrecida por el epitelio al paso de esta corriente se asocia con una menor adhesión de las TJ que conforman la función barrera del epitelio, facilitando el paso de la corriente a su través (a menor resistencia, la corriente atravesará el tejido con mayor facilidad y, consecuentemente, mayor será la disfunción de la barrera del epitelio o mayor será la permeabilidad de esta capa).

Para estudiar cambios en la permeabilidad del endotelio, se aplicará una corriente de frecuencias entre  $1\text{KHz}$  y  $100\text{KHz}$  a la córnea, de manera que una disminución de la resistencia al paso de la corriente a su través se traduce en fallo de la función barrera del endotelio o aumento de la permeabilidad de esta capa.

### 3.1.2. Equipo y proceso de medida

Para el estudio de la bioimpedancia de la córnea es necesario un equipo de medida que incorpore medios capaces de aplicar una corriente eléctrica de frecuencia variable a la córnea y poder recibir de manera simultánea la respuesta al paso de esta corriente (resistencia) (figura 3.2).



Figura 3.2. Equipo de medida de la bioimpedancia corneal CORBI. Este dispositivo permite tomar y almacenar datos de forma automática, para su posterior transferencia mediante conexión bluetooth a un ordenador que permite su análisis. Su funcionamiento se detalla en el Manual de Usuario CORBI (ANEXO II).

El prototipo de medida de la bioimpedancia corneal de reciente creación ha sido denominado CORBI (Corneal - Bioimpedance). El dispositivo ha sido clasificado como un producto sanitario de clase II a, y cumple con los requisitos para la seguridad de los equipos electromédicos (UNE-EN 60601-1).

Para realizar la medida de manera no invasiva, este equipo cuenta con un sensor flexible conectado al dispositivo de medida de bioimpedancia (figuras 3.3.A y 3.3.B). Una explicación más exhaustiva de la invención puede encontrarse en la patente internacional de título "*Sensor no invasivo para determinar características funcionales de la córnea, dispositivo que incluye dicho sensor y su uso*" (ANEXO I), número WO 2011/107645 PCT/ES2011/070131.



Figura 3.3.A. Imagen del sensor de medida de la bioimpedancia corneal listo para su aplicación sobre la córnea. Consta de un cabezal para su correcta manipulación y conexión al equipo de medida CORBI.

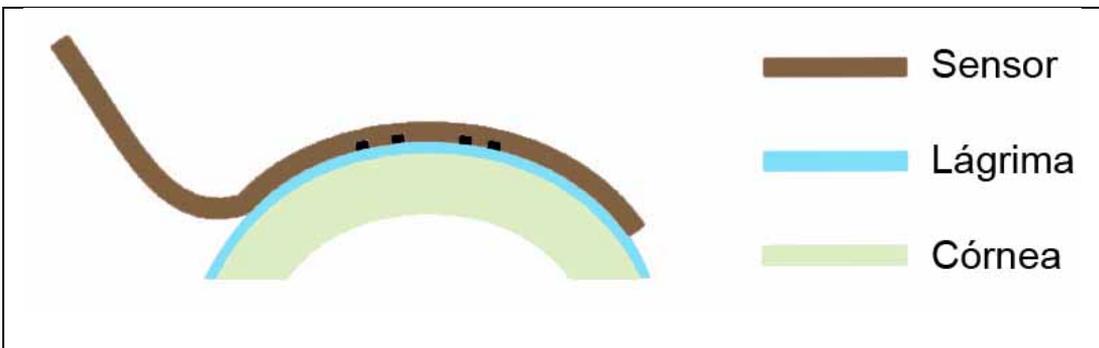


Figura 3.3.B. Esquema del apoyo del sensor flexible sobre la superficie corneal (Adaptación de Guimerà, A. 2013).

El modo de funcionamiento, utilización y procedimiento a seguir al realizar las medidas de bioimpedancia corneal se detallan en el Manual de Usuario CORBI (ANEXO II). Básicamente, consiste en la aplicación de manera manual del sensor previamente esterilizado sobre la córnea. Con el objetivo de reducir la incomodidad del sujeto y disminuir los movimientos oculares involuntarios se aconseja administrar una gota de anestésico tópico sobre la superficie corneal. Una vez en contacto con la superficie corneal, se realiza la medida de bioimpedancia, que dura aproximadamente 6 segundos. Finalizada la medida, se retira el sensor. Los datos quedan almacenados en el equipo de forma automática, para su posterior transferencia mediante conexión bluetooth a un ordenador que permite su análisis. Por lo tanto, el único requisito para llevar a cabo la medida es que el sensor esté durante estos 6 segundos en contacto con la superficie corneal (evitando movimientos bruscos del ojo y parpadeos).

### 3.1.3. Validación de la técnica – Resultados previos en modelo animal

---

La seguridad y capacidad de esta técnica *in vivo* ha sido validada en modelo animal (conejo) bajo el marco del proyecto CORBI (SAF2009-14724C02). Los resultados obtenidos han verificado su seguridad (ANEXO III) y validez<sup>109,110</sup> como herramienta para la evaluación clínica de la permeabilidad de la córnea de manera no invasiva. Estos trabajos se han centrado en detectar los cambios producidos sobre la permeabilidad del tejido corneal provocados por el efecto del cloruro de benzalconio (BAC) en diferentes concentraciones, ya que es un hecho ampliamente documentado que el BAC destruye las TJ del epitelio corneal.<sup>95</sup> Los resultados mostraron que la técnica desarrollada es capaz de detectar cambios mínimos en la permeabilidad del epitelio corneal y gradar diferentes niveles de alteración funcional en función del daño ejercido sobre el tejido (dependiendo de la concentración de BAC).<sup>109,110</sup>

### 3.2. Estudio I. Bioimpedancia corneal

## PERMEABILIDAD EPITELIAL en Modelo Animal

De las conclusiones alcanzadas de los trabajos previos mencionados en el apartado 3.1.3. se desprende que la técnica de medida de la bioimpedancia corneal es válida para su utilización como herramienta capaz de determinar el estado de la función barrera de manera no invasiva en modelo animal *in vivo*.

Teniendo en cuenta que el uso de LC afecta la función barrera de epitelio y endotelio (apartado 2.5.2.), parece adecuado evaluar la aplicación de esta nueva herramienta para medir el impacto que ejercen las LC sobre la fisiología corneal.

En el presente trabajo se estudia la eficacia del equipo de medida de bioimpedancia para detectar cambios en la permeabilidad del epitelio secundarios al uso de LCH en modelo animal (conejo).

### 3.2.1. Introducción

---

Una de las complicaciones más habituales secundarias al uso de LC son las queratitis infecciosas propiciadas entre otros factores por la rotura de las TJ del epitelio<sup>108</sup> (apartado 2.5.2.). Actualmente sólo existe la posibilidad de evaluar en humanos *in vivo* de manera directa, objetiva y no invasiva el estado de las TJ del epitelio (y por consiguiente el estado de su función barrera) mediante técnicas fluorofotométricas<sup>77</sup> (apartado 2.4.1).

El principal propósito de este estudio fue la valoración de la capacidad del prototipo basado en medidas de la bioimpedancia corneal para evaluar los cambios secundarios al porte de LCH en la permeabilidad del epitelio corneal de conejo.

### 3.2.2. Hipótesis y objetivos

---

#### 3.2.2.1. Hipótesis

La medida de la bioimpedancia corneal permite detectar cambios en la función barrera del epitelio corneal en modelo animal (conejo) inducidos por el porte de lentes de contacto hidrofílicas.

#### 3.2.2.2. Objetivos

- **Objetivo 1 de la tesis:** Determinar la capacidad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal para detectar cambios en la permeabilidad epitelial en conejos inducidos por el porte de LCH.

### 3.2.3. Material y métodos

#### 3.2.3.1. Animales

Un total de 20 conejos de raza Blanco de Nueva Zelanda de entre 2,5 y 3 Kg fueron incluidos en el estudio. Todos los animales fueron tratados según las directrices para la experimentación animal en investigación visual de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO);<sup>111</sup> y bajo la supervisión del Comité Ético para la Experimentación y Bienestar Animal (CEEBA) de la Universidad de Valladolid.

#### 3.2.3.2. Lentes de contacto

Las LC empleadas en el estudio fueron lentes de bajo Dk (vasurfilcon A, Dk = 38, Precision UV, Ciba Vision, Duluth, GA), que aseguraran una baja transmisión de oxígeno a la córnea con el objetivo de inducir cambios en la permeabilidad corneal secundarios a la hipoxia inducida. Las características de las LC se muestran en la tabla 3.1.

<b>Material</b>	<b>Radio (mm)</b>	<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Espesor* (mm)</b>	<b>Hidratación</b>	<b>Dk</b>	<b>Potencia (D)</b>
Vasurfilcon A	8,40	14,40	0,14	74%	38	+10,00

Tabla 3.1. Parámetros de las LC utilizadas en el estudio “*Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal*”. \*Espesor central para una LC de -3,00 D.

### 3.2.3.3. Instrumentación

Para la medición de la bioimpedancia del epitelio corneal se utilizó el equipo descrito en el apartado 3.1.2 (ANEXO I), siguiendo el procedimiento detallado en el Manual de Usuario CORBI (ANEXO II). Para facilitar la separación de los párpados durante las medidas se colocó un blefaróstato antes de comenzar con las mismas. La medida se realizó tres veces consecutivas en cada ojo, empleándose la media de las tres medidas como valor final. El mismo explorador realizó siempre las medidas de bioimpedancia a todos los conejos.

También se monitorizaron los cambios en el espesor corneal central a lo largo del estudio, por ser un indicador de la integridad y salud corneal. Estas medidas se realizaron con el paquímetro ultrasónico Sonogage (Corneo-Gage Plus, Cleveland, OH, USA). Las bases de su funcionamiento se explican en el apartado 2.3.2. En cada ocasión la paquimetría corneal se midió tres veces consecutivas en cada ojo, utilizándose la media de las tres medidas como valor final. El mismo explorador realizó siempre las medidas de paquimetría corneal siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 3.2.3.4. Procedimiento

El estudio fue prospectivo. Estuvo organizado en tres visitas (tabla 3.2) y dos grupos de estudio, dependiendo del tiempo de porte de las LC (tabla 3.3).

<p><b>Visita 1:</b></p> <p>Común para los 20 conejos, donde se recogieron las medidas basales</p>
<p><b>Visita 2:</b></p> <p>Visita final del grupo 1, donde se recogieron las medidas finales de 10 animales (después de 1 día con las LC).</p>
<p><b>Visita 3:</b></p> <p>Visita final del grupo 2, donde se recogieron las medidas finales de 10 animales (después de 7 días con las LC).</p>

Tabla 3.2. Visitas del “Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal”.

<p><b>Grupo 1:</b></p> <p>1 día (de manera prolongada) con la LC (n=10)</p>
<p><b>Grupo 2:</b></p> <p>7 días (de manera prolongada) con la LC (n=10)</p>

Tabla 3.3. Grupos del “Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal”.  
Uso prolongado de LC = sin retirarlas durante el sueño

En la primera visita y antes de realizar ningún procedimiento, los animales fueron anestesiados mediante una inyección intramuscular de 50 mg/kg de ketamina (Imalgene 1000®, Merial) y 7 mg/kg de Xylazina (Rompun®, Bayer). Una vez sedados, el primer paso fue llevar a cabo la medida basal de la bioimpedancia epitelial según se ha descrito en el apartado 3.2.3.3 (figura 3.4). A continuación se midió la paquimetría central corneal con el paquímetro ultrasónico Sonogage (apartado 3.2.3.3).

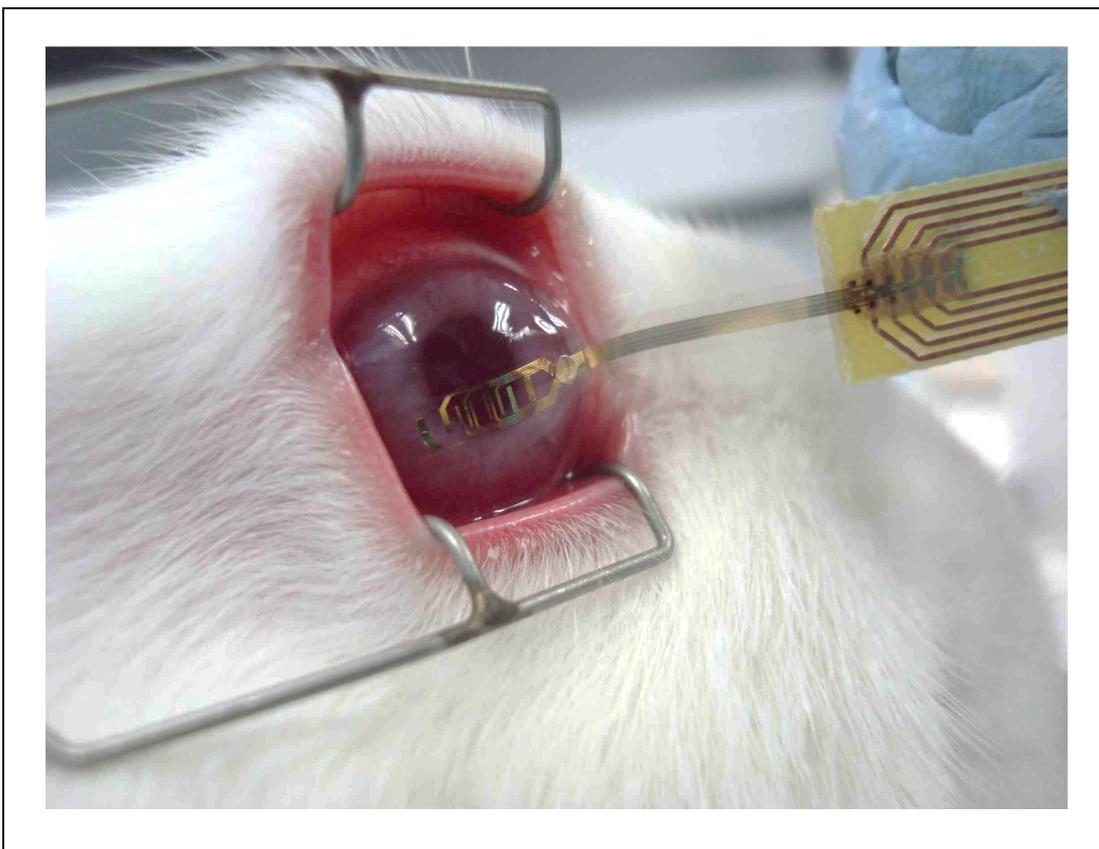


Figura 3.4. Imagen de la medida de bioimpedancia epitelial. Se observa la aplicación del sensor sobre la superficie corneal del conejo.

Una vez realizadas las medidas basales de bioimpedancia epitelial y paquimetría corneal, un ojo de cada animal fue aleatoriamente asignado como ojo control mientras que el contralateral portaría la LC (apartado 3.2.3.2). Para garantizar la retención de la LC sobre la córnea del conejo se procedió al cierre de la apertura palpebral del ojo portador de la lente con suturas 6-0 (Mersilk, Ethicon, Francia).<sup>112</sup>

Al final de esta primera visita, 10 de los conejos fueron asignados de manera aleatoria al grupo 1 (1 día con LC) y los otros 10 conejos fueron asignados al grupo 2 (7 días con LC).

En la segunda y tercera visita (después de uno o siete días con la LC, dependiendo del grupo de estudio) y antes de realizar ningún procedimiento, los animales fueron anestesiados de la misma manera que en la visita inicial. Una vez sedados, se procedió a retirar las suturas que cerraban la apertura palpebral del ojo portador de la lente y se retiró la LC.

Inmediatamente después se realizó la medida de la bioimpedancia epitelial y de la paquimetría corneal (siguiendo el mismo procedimiento que durante la primera visita). A continuación, el estado de la superficie ocular fue evaluado con lámpara de hendidura portátil (KOWA SL-15, Kowa; Düsseldorf, Alemania) después de la instilación de fluoresceína tópica en ambos ojos en busca de alteraciones epiteliales detectables macroscópicamente, que pudieran ser atribuidas o bien al uso de la LC o bien a la aplicación del sensor de medida de bioimpedancia.

Al final de la visita los animales fueron eutanasiados mediante inyección intravenosa de 200 mg/kg de pentobarbital (Dolethal Vetoquinol) y se procedió a la enucleación de ambos ojos y extracción de córneas para su posterior análisis histopatológico.

#### 3.2.3.5. Criterio de edema

El criterio que se empleó para determinar el grado de edema corneal inducido entre la medida basal y la medida final (después de portar la LC) fue la variación que se produjo en el espesor corneal central expresado en porcentaje. La fórmula empleada para calcular este porcentaje se muestra en la tabla 3.4.

$$\% \text{ edema} = [(P_{\text{final}} - P_{\text{basal}}) / P_{\text{basal}}] \times 100$$

Tabla 3.4. Fórmula empleada para calcular el porcentaje de edema inducido.  $P_{\text{final}}$  = paquimetría después de utilizar la LC.  $P_{\text{basal}}$  = paquimetría basal.

### 3.2.3.6. Análisis histopatológico

Todas las córneas fueron examinadas histológicamente mediante microscopía óptica convencional por un patólogo enmascarado.

Las córneas se fijaron en formol tamponado a pH neutro al 10% (Panreac, España) y conservadas de manera rutinaria hasta su inclusión en parafina. Los bloques de parafina fueron seccionados con microtomo a 3  $\mu\text{m}$  y fueron teñidas con hematoxilina eosina. Se evaluó la distribución y composición del epitelio en busca de anomalías con el microscopio automatizado LEICA DM4000B (Leica, Alemania).

### 3.2.3.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA) para Windows. Se evaluó la normalidad de la distribución de los datos mediante el test de Saphiro-Wilk. Se emplearon los siguientes contrastes estadísticos (se tomó un valor de  $P < 0,05$  como diferencia significativa):

- Las diferencias en el espesor corneal en el tiempo (entre visitas) se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni entre la medida basal (antes de

llevar la LC) y la medida final de los grupos 1 (1 día con LC) y 2 (7 días con LC).

- Las diferencias en el espesor corneal entre el ojo control y el ojo portador de LC (entre grupos) se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados para detectar si las diferencias eran atribuibles a la hipoxia provocada por el uso de LC.
- Las diferencias en el grado de edema en el tiempo se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) entre el edema después de 1 día y 7 días con la LC.
- Las diferencias en el grado de edema entre el ojo control y el ojo portador de LC se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados para detectar si las diferencias eran atribuibles a la hipoxia provocada por el uso de LC.
- Las diferencias en la permeabilidad epitelial en el tiempo se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni entre la medida basal (antes de llevar la LC) y la medida final de los grupos 1 (1 día con LC) y 2 (7 días con LC).
- Las diferencias en la permeabilidad epitelial entre el ojo control y el ojo portador de LC se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados.

### 3.2.3.8. Instalaciones

Todas las medidas se realizaron en el quirófano de experimentación animal del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid.

## 3.2.4. Resultados

---

### 3.2.4.1. Detección de diferencias en la paquimetría y en el edema inducido

Los datos de paquimetría y edema corneal siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Los resultados de la paquimetría corneal se muestran en la Tabla 3.5. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la paquimetría entre los ojos control y los ojos de estudio en la visita basal ( $P=0,208$  t Student para datos apareados).

Sin embargo, después de 1 día y 7 días con la LC, la paquimetría corneal aumentó de manera estadísticamente significativa en el caso de los ojos portadores de LC ( $P<0,001$  t Student para datos apareados).

Además, los ojos control no mostraron diferencias estadísticamente significativas en su paquimetría en ninguna de las visitas del estudio (basal, 1 día y 7 días con LC) ( $P=0,348$  ANOVA), mientras que los ojos portadores de LC mostraron un incremento estadísticamente significativo de su espesor corneal a lo largo del estudio ( $P<0,001$  ANOVA).

<b>Paquimetría corneal (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: un día con LC (GRUPO 1)</b>	<b>Visita 3: siete días con LC (GRUPO 2)</b>	<b>P<sup>†</sup></b>
<b>Ojos control</b>	375 $\pm$ 0,15	373 $\pm$ 0,14	375 $\pm$ 0,17	0,348
<b>Ojos con LC</b>	374 $\pm$ 0,11	462 $\pm$ 0,30	535 $\pm$ 1,36	<0,001
<b>P*</b>	0,208	<0,001	<0,001	

Tabla 3.5. Resumen de las medidas del espesor corneal central (media  $\pm$  DS), obtenidas con el paquímetro ultrasónico Sonogage para las tres visitas del estudio. \*Test t Student para datos apareados. <sup>†</sup>Análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni.

Los resultados del edema corneal inducido se muestran en la Tabla 3.6. Después de 1 día y 7 días con la LC, el edema fue significativamente superior en el caso de los ojos portadores de LC ( $P < 0,001$  t Student para datos apareados).

Por su parte, los ojos control no mostraron variaciones estadísticamente significativas en el edema corneal a lo largo del estudio ( $P = 0,140$  ANOVA), mientras que los ojos portadores de LC mostraron un incremento estadísticamente significativo del edema corneal entre las distintas visitas ( $P < 0,001$  ANOVA).

<b>Edema corneal (%)</b>			
	<b>Visita 2: un día con LC (GRUPO 1)</b>	<b>Visita 3: siete días con LC (GRUPO 2)</b>	<b>P<sup>†</sup></b>
<b>Ojos control</b>	-1,53 ± 4,09	-0,71 ± 4,47	0,140
<b>Ojos con LC</b>	26,58 ± 9,56	42,46 ± 36,96	<0,001
<b>P*</b>	<0,001	<0,001	

Tabla 3.6. Edema corneal inducido (media ± DS) después de 1 día y 7 días de uso prolongado con las LC. \*Test t Student para datos apareados. †Análisis de la varianza (ANOVA).

#### 3.2.4.2. Detección de diferencias en la permeabilidad epitelial

Los datos de bioimpedancia epitelial siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Los resultados se muestran en la Tabla 3.7. Los ojos control no muestran diferencias estadísticamente significativas a lo largo del estudio (basal, 1 día y 7 días con LC) en la permeabilidad epitelial (P=0,884 ANOVA). Sin embargo, los ojos portadores de LC mostraron un descenso inicial de la permeabilidad epitelial después de 1 día con la lente y un drástico aumento después de 7 días con la lente ( $p < 0,001$  ANOVA) (Figura 3.5).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la permeabilidad epitelial entre los ojos control y los ojos de estudio en la visita basal (P=0,222 t Student para datos apareados). Sin embargo,

después de 1 día y 7 días con la LC, la permeabilidad epitelial varió significativamente entre los ojos control y los ojos portadores de LC ( $P < 0,001$  y  $P < 0,05$  respectivamente, t Student para datos apareados).

<b>Permeabilidad corneal (<math>\Omega</math>)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: un día con LC (GRUPO 1)</b>	<b>Visita 3: siete días con LC (GRUPO 2)</b>	<b>P<sup>†</sup></b>
<b>Ojos control</b>	-1451,99 ± 396,72	-1472,81 ± 405,60	-1464,29 ± 355,36	0,884
<b>Ojos con LC</b>	-1495,24 ± 377,20	-1833,77 ± 377,88	-1265,18 ± 929,33	<0,001
<b>P*</b>	0,222	<0,001	<0,05	

Tabla 3.7. Resumen de las medidas de bioimpedancia corneal (media ± DS), obtenidas con el equipo de medida de bioimpedancia corneal CORBI, para las tres visitas del estudio. \*Test t Student para datos apareados. †Análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni.  $\Omega$ = Ohmio

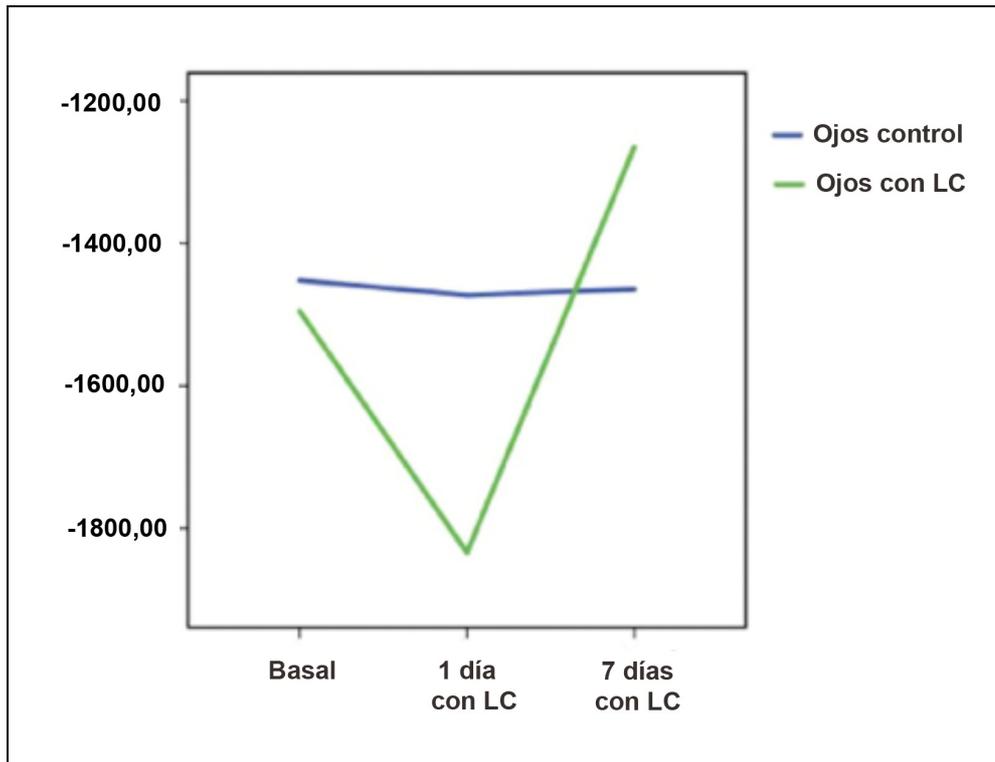


Figura 3.5. Representación de los valores de impedancia para los ojos control y los ojos que portaron LC en las tres visitas del estudio: medida basal, medida después de 1 día con la LC, y medida después de 7 días con la LC. Los valores se representan como la media de cada grupo.

#### 3.2.4.3. Tinción epitelial y evaluación histopatológica

Las córneas de los ojos control no mostraron signos macroscópicos de tinción corneal (Figura 3.6.A), con poca evidencia de daño epitelial en la evaluación histopatológica mediante microscopía óptica (Figura 3.6.B). Sin embargo, las córneas de los ojos portadores de LC mostraron signos de tinción epitelial (Figura 3.6.C) y una clara alteración del epitelio corneal en la evaluación histopatológica con microscopía óptica (Figura 3.6.D).

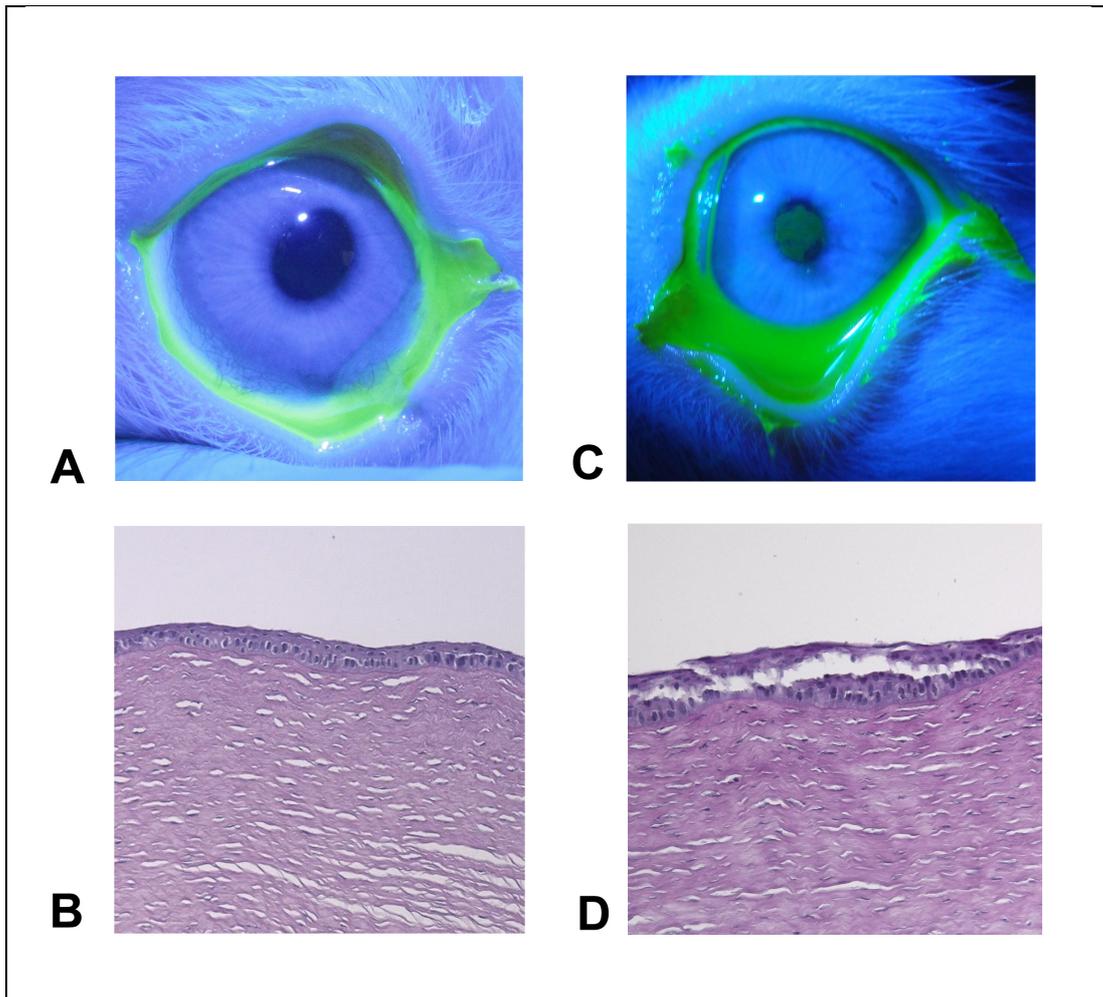


Figura 3.6. Imágenes de la evaluación de la superficie corneal mediante tinción con fluoresceína en la observación con lámpara de hendidura y luz azul cobalto (A y C), e imágenes de microscopía óptica de la evaluación histopatológica (B y D). Imágenes A y B = ojo control. A nivel macroscópico (A) no se aprecia tinción por fluoresceína en la superficie ocular. A nivel histopatológico (B) no se observan alteraciones. Imágenes C y D = ojo tras 7 días de porte de LC. A nivel macroscópico (C) se aprecia un parche de tinción por fluoresceína (úlceras). A nivel histopatológico (D) se observa una bulla intraepitelial (separación de las células del epitelio) secundaria a edema.

### 3.2.5. Discusión

---

El edema corneal inducido por el uso de LC ha sido ampliamente estudiado en la literatura.<sup>49,113</sup> Así mismo, la alteración de la barrera epitelial producida bajo condiciones de hipoxia ha sido demostrada tanto en estudios de TER *in vitro*<sup>114,115</sup> como por métodos de fluorofotometría *in vivo*.<sup>77,116</sup> Como ya se abordó en el apartado 2.4.1, la única manera de evaluar objetivamente la permeabilidad del epitelio *in vivo* de manera no invasiva es midiendo la concentración de fluoresceína que ha sido capaz de penetrar en el tejido. Recientemente, Duench<sup>77</sup> ha reportado que el uso diario de LC de alto Dk (Dk=101) aumenta la permeabilidad epitelial al paso de la fluoresceína. El aumento de la permeabilidad epitelial se entiende como una pérdida o rotura de las TJ del epitelio, con la consecuente disfunción de su función de barrera. Esto representa una amenaza para el mantenimiento de la homeostasis corneal y la salud ocular, ya que sin una función barrera epitelial plenamente funcional, la córnea es susceptible de infecciones microbianas que pueden conducir a una pérdida de la transparencia corneal y pérdida de función visual en último término.<sup>117</sup>

Por tanto, conocer el estado de la función barrera del epitelio es de gran importancia para la comunidad clínica, a pesar de que hoy en día existe un vacío de técnicas no invasivas que permitan detectar y cuantificar los cambios producidos en la fisiología epitelial como consecuencia del uso de LC, ya que la fluorofotometría presenta una serie de desventajas que han impedido su popularización, especialmente en la práctica clínica relacionada con la adaptación de LC (apartado 2.4.1.).

La técnica propuesta en este trabajo, basada en medir la bioimpedancia epitelial, permite la detección y cuantificación de cambios

mínimos en la fisiología del epitelio tras exposición al BAC<sup>109,110</sup> y con este estudio se ha pretendido demostrar que también es capaz de detectar alteraciones en la fisiología epitelial secundarias a la hipoxia inducida por el uso de LC en modelo animal.

Los resultados muestran que los parámetros tanto morfológicos (paquimetría, edema, tinción y análisis histopatológico) como fisiológicos (bioimpedancia) del grupo de ojos que sirvió como control no variaron de forma estadísticamente significativa a lo largo del estudio (después de 1 o 7 días de uso de LC), por lo que se puede asumir que cualquier diferencia observada en estos indicadores a lo largo del estudio en el grupo de ojos que portó LC se puede atribuir a la hipoxia inducida por el uso de las LC y la oclusión palpebral (necesaria para la retención de las lentes).<sup>7</sup>

#### 3.2.5.1. Cambios inducidos por el porte de LC

El cambio morfológico más destacado fue el aumento de la paquimetría corneal tras 1 y 7 días de uso de las lentes. También se detectó tinción con fluoresceína en la evaluación de la superficie anterior con lámpara de hendidura y alteraciones histopatológicas mediante microscopía óptica. Sin embargo, actualmente existe un debate sobre qué tiñe exactamente la fluoresceína en el epitelio corneal y por consiguiente lo que representa este hallazgo en la práctica clínica,<sup>102,118</sup> por lo que no se trata de una herramienta muy fiable para la evaluación de la función barrera del epitelio.

La permeabilidad epitelial disminuyó después de 1 día de uso de las LC, es decir, que la resistencia del epitelio al paso de la corriente aumentó, haciendo el tejido menos permeable. Sin embargo, en las medidas realizadas después de 7 días de uso de las LC se observó una considerable

reducción de la resistencia ofrecida por el epitelio, lo que se traduce en un considerable aumento de la permeabilidad del epitelio. Estos hallazgos parecen contradictorios, sin embargo podría existir una explicación plausible para los mismos. La permeabilidad de un tejido biológico está directamente relacionada con los espacios extracelulares,<sup>119,120</sup> cuanto menor sea este espacio, peor circulará la corriente por el tejido (menor permeabilidad) y viceversa. De esta manera, una compresión del tejido (en este caso, una disminución del espesor epitelial) aumentaría la resistencia del mismo al paso de corriente y consecuentemente disminuiría su permeabilidad.

El adelgazamiento epitelial tras el uso de LC ha sido descrito anteriormente en diversos trabajos.<sup>108,121,122</sup> Este adelgazamiento del epitelio puede ser entendido como una disminución del espacio extracelular al existir una mayor compresión de las células que lo componen. Esta reducción del espacio extracelular puede justificar el aumento de la resistencia epitelial al paso de la corriente a su través encontrado después de 1 día con LC.

Pasados 7 días de uso prolongado con las LC, el incremento detectado en la permeabilidad del epitelio puede atribuirse a la pérdida o rotura de las TJ del epitelio, que hacen el tejido menos resistente al paso de la corriente a su través ya que ésta puede fluir más fácilmente. Parece pues que existe una primera tendencia del epitelio a "resistir" el porte de las LC sobre la córnea y un punto de inflexión en el que las TJ del mismo pierden sus uniones estrechas disminuyendo por lo tanto la eficacia de su función de barrera.

En cualquier caso, las medidas de la bioimpedancia epitelial fueron capaces de detectar cambios en la permeabilidad del epitelio después del porte de LCH, por lo que esta técnica podría utilizarse en un futuro para

la evaluación del estado de la función barrera del epitelio de manera directa, objetiva y no invasiva.

#### 3.2.5.2. Puntos fuertes y limitaciones

Estos resultados sugieren que la permeabilidad epitelial disminuye al principio del proceso de respuesta frente a condiciones de hipoxia secundarias al porte de LC (compresión del epitelio) y que después, por razones aún por dilucidar, las uniones tipo TJ del epitelio no pueden permanecer estrechamente unidas, aumentando su permeabilidad y abriendo paso no sólo al flujo de corriente sino también a la posible entrada de agentes del medio exterior dañinos para la córnea.

Además estos resultados confirman hallazgos previos<sup>77,116</sup> que encontraron un aumento de la permeabilidad epitelial mediante medidas fluorofotométricas en usuarios de LC. El desarrollo de esta nueva herramienta para la adquisición de información cuantificable del estado de la función barrera del epitelio *in vivo* en humanos permitiría una evolución en el diagnóstico, monitorización y manejo de ciertas patologías y afecciones corneales, mejorando el diagnóstico precoz, y proporcionaría una oportunidad a la comunidad científica de obtener un mayor conocimiento de la fisiología corneal.

Sin embargo, este estudio presenta importantes limitaciones. En primer lugar, la explicación de por qué la permeabilidad parece disminuir tras 1 día de uso de las LC se basa en el supuesto de que el epitelio adelgaza y con ello disminuye el espacio extracelular, que hace que la resistencia al paso de la corriente sea mayor. En el momento de la realización de este trabajo no se contó con la tecnología necesaria para monitorizar cambios en el grosor epitelial, por lo que el supuesto de que el epitelio adelgaza se basa

en la literatura publicada. Además, tampoco este campo está exento de polémica, pues algunos autores han reportado efectivamente un adelgazamiento del grosor epitelial tras el porte de LC,<sup>121</sup> otros han reportado un aumento del espesor,<sup>123</sup> y por último existen autores que no han encontrado cambio alguno.<sup>124</sup> De cualquier manera, parece que la teoría más aceptada es la que defiende que el grosor del epitelio disminuye con el porte de LC; si bien este planteamiento debería aclararse con rotundidad.

Es importante señalar que en este experimento también se ha de sumar el efecto de la tarsorrapia aplicada en los ojos que llevaron LC, necesaria para la retención de las LC en el ojo, que contribuye al aumento de la hipoxia corneal. Por otro lado, siendo el objetivo del trabajo el de estudiar la respuesta corneal a la disminución del aporte de oxígeno, la hipoxia inducida por la tarsorrapia no debería afectar significativamente a las conclusiones del estudio.

Tampoco se dispuso en el momento del experimento con técnicas fluorofotométricas para comparar con los resultados de la bioimpedancia, pues a pesar de no ser una técnica muy fiable es la única que existe hoy en día para la evaluación de la permeabilidad epitelial *in vivo* de manera no invasiva.

Otra limitación es la alta desviación estándar encontrada sobre todo en los datos del edema inducido, que puede ser debido al tamaño de la muestra del estudio, por lo que un aumento del número de ojos podría suponer una mejora en la calidad de los resultados obtenidos. La existencia de diferencias significativas en los ojos portadores de LC permiten valorar estos resultados con optimismo para la futura aplicación en humanos usuarios de LC.

En el futuro sería además de gran interés establecer los valores basales normales de la permeabilidad epitelial en el conejo para que sirva de referencia en investigaciones futuras, así como determinar la repetibilidad y reproducibilidad de la medida de la bioimpedancia en ojos con y sin edema.

Los esfuerzos en todo caso habrán de ser dirigidos a la comprensión de las bases mecánicas y fisiológicas de la respuesta inflamatoria y alteraciones sufridas en la función barrera del epitelio secundario al uso de LC, cualquier tipo de cirugía corneal o efectos secundarios de cualquier medicamento dado en forma de gotas.

#### 3.2.5.3. Conclusiones

En conclusión, la evaluación *in vivo* del estado del epitelio corneal con la medida de la bioimpedancia permite un análisis no invasivo y cuantificable de la función barrera del mismo. Los datos de bioimpedancia obtenidos en este trabajo en córneas sanas (ojos control) y en córneas edematizadas (1 y 7 días con LC) están en concordancia con los hallazgos de paquimetría corneal, grado de edema, tinción corneal y microscopía óptica.

Futuras aplicaciones de esta técnica ayudarían a la evaluación y seguimiento de la función barrera del epitelio en usuarios de LC, una vez evaluada la seguridad y eficacia de la técnica en humanos.



### 3.3. Estudio II. Bioimpedancia corneal

## PERMEABILIDAD EPITELIAL Y ENDOTELIAL

### Prueba de Concepto en Humanos

La técnica de medida de la bioimpedancia corneal ha demostrado ser segura en trabajos previos a la realización de esta tesis llevados a cabo en modelo animal<sup>109,110</sup> (ANEXO III).

Además, durante la realización de esta tesis se ha evaluado la capacidad de esta técnica para detectar cambios inducidos en la permeabilidad epitelial secundarios al porte de LC en modelo animal (*“Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal”*), con resultados positivos. Así, parece lógico emprender el siguiente paso para su futura aplicación a la práctica clínica. Para ello, en primer lugar se ha de realizar una primera prueba de concepto en la que se estudie la seguridad y la eficacia de éste método en córneas humanas *in vivo*. Éste fue el propósito del presente estudio.

### 3.3.1. Introducción

---

La función barrera del epitelio y del endotelio corneal juega un papel fundamental en la protección del ojo frente a agentes externos infecciosos (epitelio) y en el mantenimiento del estado normal de deshidratación corneal y consiguiente conservación de su transparencia (endotelio) (sección 2.2).

Como se ha detallado en el apartado 2.5.2, el porte de LCH se asocia con riesgo de padecer queratitis microbiana<sup>77,108</sup> (lo que supone una amenaza tanto para la visión como para la salud ocular) y edema corneal<sup>125</sup> (un edema superior al 6% del espesor corneal total produce cambios en la estructura y fisiología corneal inaceptables para la práctica clínica y para el uso seguro de LC).<sup>107</sup>

Hasta la fecha, la única manera de evaluar de manera directa y objetiva en humanos *in vivo* el estado de la función barrera del epitelio y del endotelio corneal es mediante técnicas de fluorofotometría (apartado 2.4.1), basadas en calcular la cantidad de fluoresceína que atraviesa el epitelio o el endotelio corneal.<sup>72</sup> Desafortunadamente, ésta técnica presenta una serie de desventajas que han limitado su popularización en la práctica clínica. Destacan la limitada resolución espacial del equipo<sup>126</sup> y la elevada variabilidad entre medidas repetidas, por lo que no se considera lo suficientemente fiable como para monitorizar cambios en un paciente dado.<sup>80</sup> Además cada examen fluorofotométrico consume un tiempo excesivo, lo que ha provocado que ésta técnica se emplee principalmente en investigación.

El principal propósito de este estudio fue el de llevar a cabo una prueba de concepto que determinara la seguridad y la capacidad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal de manera no invasiva para evaluar el impacto que ejercen las LC en la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal humano *in vivo*.

### 3.3.2. Hipótesis y objetivos

---

#### 3.3.2.1. Hipótesis

La medida de la bioimpedancia corneal de manera no invasiva es una herramienta segura y capaz para evaluar la función barrera del epitelio y endotelio corneal en usuarios de lentes de contacto hidrofílicas.

#### 3.3.2.2. Objetivos

- **Objetivo 2 de la tesis:** Determinar la seguridad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal en humanos *in vivo*.
- **Objetivo 3 de la tesis:** Determinar la capacidad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal para detectar cambios en la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal humano inducidos por el porte de LCH de diferente permeabilidad al oxígeno.

### 3.3.3. Material y métodos

---

El presente trabajo forma parte del estudio clínico "*Evaluación de la sensibilidad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal (dispositivo CORBI)*", financiado por la empresa Laboratorios Salvat, S.A., y realizado en el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid con la colaboración del Centro Nacional de Microelectrónica del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CNM-CSIC).

El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valladolid y por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) del Ministerio de Sanidad.

#### 3.3.3.1. Sujetos

Un total de 10 sujetos que cumplieron los requisitos de inclusión y exclusión (tabla 3.8) fueron incluidos en el estudio.

Aunque se incluyeron ambos ojos de cada sujeto en el estudio, posteriormente sólo se sometieron a análisis estadístico los datos obtenidos de los ojos derechos de los sujetos.

<p><b>Criterios de inclusión</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sujetos adultos de entre 18 y 40 años, con o sin ametropía.</li> <li>- Que entendieran y firmaran el consentimiento informado.</li> <li>- Que no hubieran usado LC la semana previa al momento de inclusión en el estudio.</li> <li>- Que no presentaran ningún tipo de patología ocular o sistémica.</li> <li>- Que superaran la exploración previa a la inclusión en el estudio.</li> </ul>
<p><b>Criterios de exclusión</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sujetos menores de 18 años y mayores de 40 años.</li> <li>- Que hubieran usado LC la semana previa al momento de inclusión en el estudio.</li> <li>- Que presentaran infección, inflamación o enfermedad de la superficie anterior del ojo (conjuntiva, córnea y anejos oculares) tales como defectos epiteliales recurrentes, queratocono, conjuntivitis papilar gigante, blefaritis (activa de grado 2 o más) u ojo seco severo, alergias oculares, etc. o cualquier contraindicación para el uso de LC.</li> <li>- Enfermedades sistémicas como diabetes, artritis, hiper o hipotiroidismo, etc.</li> <li>- Cualquier otra patología ocular o sistémica que pudiera afectar a la fisiología corneal.</li> <li>- Embarazo.</li> </ul>
<p><b>Criterios para abandonar el estudio</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Siendo para el beneficio del sujeto, el investigador podía retirarlo del estudio en cualquier momento y por cualquier razón/es (como aparición de patología ocular incompatible con el uso de LC antes o durante el porte de las LC o suspensión del porte de las LC antes de completar el tiempo determinado para tal efecto).</li> <li>- Los sujetos podían abandonar el estudio de manera voluntaria por cualquier motivo o sin ningún motivo. Las razones dadas por el sujeto, si es que da alguna, habrían de ser registradas.</li> <li>- Los participantes habrían de ser retirados del estudio si el IOBA determinara que éste habría de ser terminado por cualquier razón.</li> </ul>

Tabla 3.8. Criterios de inclusión, exclusión y para abandonar el estudio del “*Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en humanos*”.

### 3.3.3.2. Lentes de contacto

Se utilizaron dos tipos distintos de LC en función de la permeabilidad al oxígeno (Dk) del material con el objetivo de inducir diferente grado de cambio en la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal según la LC utilizada. Así, se escogió una primera LC de bajo Dk (etafilcon A, Dk = 28, Acuvue 2, Johnson & Johnson, Jacksonville, FL) y una segunda LC de alto Dk (lotrafilcon B, Dk = 110, Air Optix Aqua, Ciba Vision, Duluth, GA). Las características de las LC se muestran en la tabla 3.9.

Material	Radio	Diámetro	Espesor*	Hidratación	Dk	Potencia
Etafilcon A	8,40 mm	14,00 mm	0,08 mm	58%	28	+0,50 a -6,00 D
Lotrafilcon B	8,60mm	14,20 mm	0,08 mm	33%	110	+0,50 a -6,00 D

Tabla 3.9. Parámetros de las LC utilizadas en el estudio "*Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en humanos*". \*Espesor central para una LC de -3,00 D.

### 3.3.3.3. Instrumentación

La evaluación de la integridad de la superficie ocular se llevó a cabo con la lámpara de hendidura SL-8z (Topcon Medical Systems Inc., Paramus, NJ, USA) y tinción con fluoresceína, observando bajo luz azul cobalto y gradando los hallazgos biomicroscópicos de la superficie ocular según la norma ISO/CD 11980.2. El mismo evaluador capturó imágenes de la superficie corneal de cada sujeto en cada visita de estudio, siempre después de la aplicación del sensor de medida de la bioimpedancia sobre la superficie corneal.

El espesor corneal total central y el espesor epitelial central se midió con el tomógrafo de coherencia óptica 3D OCT – 2000 (Topcon

Medical Systems Inc; Paramus, NJ, USA), cuyas características técnicas se detallan en el apartado 2.3.5. En cada ocasión la medida se realizó tres veces consecutivas en cada ojo, utilizándose la media de las tres medidas como valor final. El mismo explorador realizó siempre las medidas de paquimetría corneal siguiendo las recomendaciones del fabricante y se encargó de recopilar los valores de paquimetría de cada medida en la localización central de la córnea tanto para el espesor corneal total como para el espesor epitelial.

Para la medida de la bioimpedancia del epitelio y del endotelio corneal se utilizó el equipo descrito en el apartado 3.1.2 (ANEXO I), siguiendo el procedimiento detallado en el Manual de Usuario CORBI (ANEXO II). Con el objetivo de reducir la incomodidad del sujeto y disminuir los movimientos oculares involuntarios siempre se administró previamente a la medida una gota de anestésico tópico Colircusí® (tetracaína 0,1%, oxibuprocaina 0,4%) sobre la superficie corneal del sujeto. En cada visita la medida de bioimpedancia corneal se realizó tres veces consecutivas en cada ojo, empleándose la media de las tres medidas como valor final. El mismo explorador realizó siempre las medidas de bioimpedancia a todos los sujetos.

#### 3.3.3.4. Procedimiento

El estudio estuvo dividido en cuatro visitas. En la primera visita (visita de inclusión) se seleccionó a los participantes en función de los criterios de inclusión y exclusión (apartado 3.3.3.1.). Se explicó a cada sujeto la naturaleza de la investigación y se les invitó a leer una hoja de información al paciente (ANEXO IV). Se requirió de los usuarios portadores habituales de LC que dejaran de utilizar sus lentes al menos una semana antes del comienzo del estudio. Se resolvieron las eventuales dudas de los sujetos y a continuación se obtuvo el consentimiento informado (ANEXO V) de cada

participante. Todos los sujetos fueron tratados acorde a la Declaración de Helsinki.<sup>127</sup>

En la segunda visita se completó la anamnesis del sujeto y se realizó una exploración optométrica donde quedaron registradas la agudeza visual, refracción subjetiva, exploración biomicroscópica del polo anterior y se obtuvieron los valores basales de paquimetría corneal, espesor epitelial y bioimpedancia (figura 3.7), tal y como se ha descrito en el apartado 3.3.3.3. A continuación, un ojo de cada participante fue aleatoriamente asignado al porte de la LC de alto Dk mientras que el ojo contralateral sería el portador de la LC de bajo Dk. Se adaptaron las LC y se comprobó la adaptación (movimiento, centrado, comodidad del paciente y estado de la superficie ocular). De esta manera, finalmente se obtuvieron dos grupos de estudio diferentes (tabla 3.10).

<p><b>Grupo alto-Dk:</b></p> <p>Compuesto por los ojos que llevaron LC de alta permeabilidad al oxígeno</p>
<p><b>Grupo bajo-Dk:</b></p> <p>Compuesto por los ojos que llevaron LC de baja permeabilidad al oxígeno</p>

Tabla 3.10. Grupos del “*Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en humanos*”.

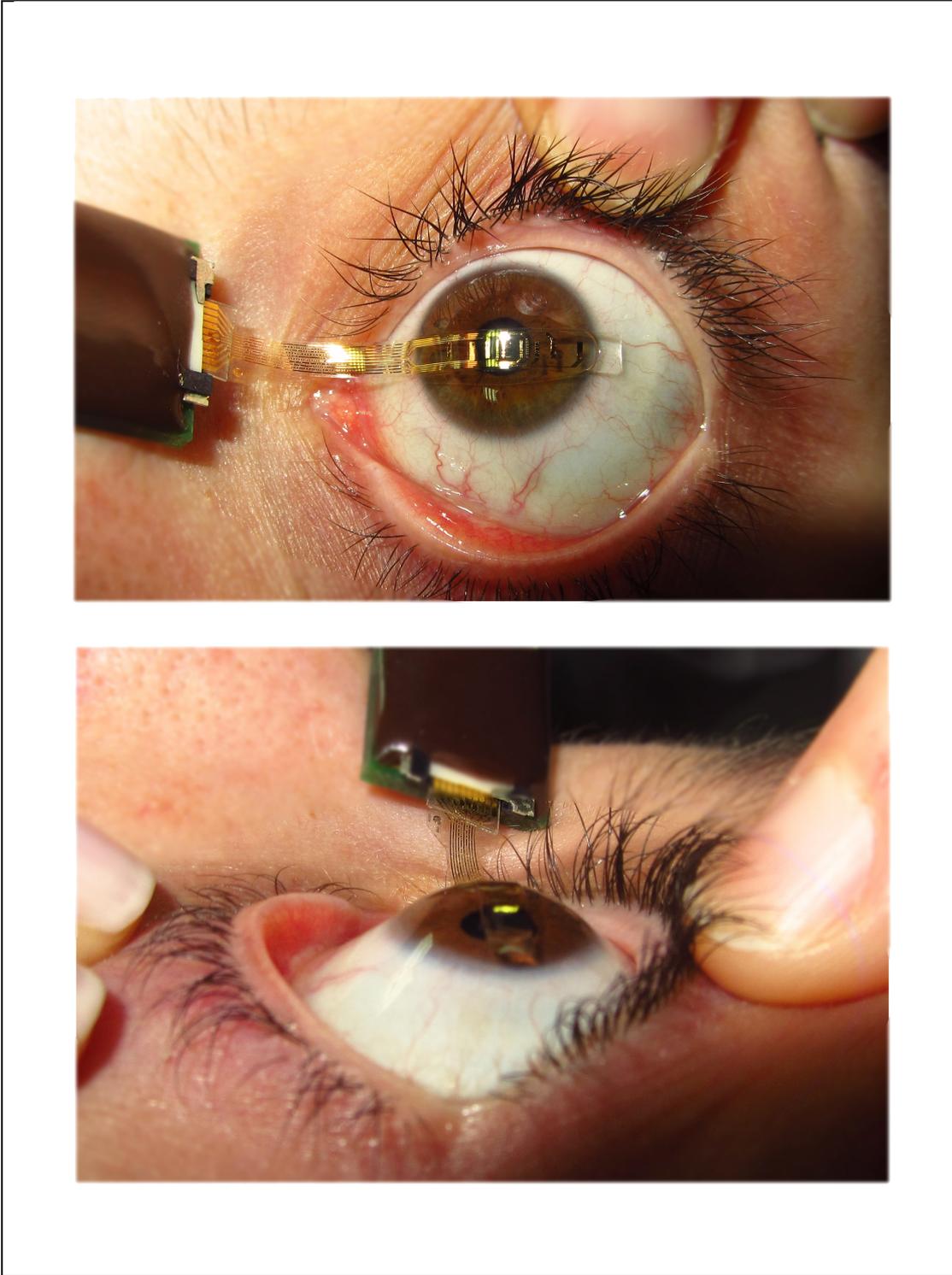


Figura 3.7. Imagen de la medida de la bioimpedancia corneal, donde se puede observar la aplicación del sensor de medida sobre la superficie corneal del sujeto. Arriba: imagen frontal. Abajo: imagen de perfil.

La tercera visita se realizó después de 3 días de porte prolongado de las LC (sin retirar la LC durante el sueño). En primer lugar se llevó a cabo la evaluación con lámpara de hendidura de la superficie corneal. Se retiraron las LC e inmediatamente después se realizaron las medidas de bioimpedancia corneal. A continuación se realizó la medida de la paquimetría corneal y epitelial. Para terminar, se evaluó la integridad corneal con lámpara de hendidura y tinción de fluoresceína bajo luz azul cobalto, en busca de cualquier signo de daño atribuible a la aplicación del sensor de medida de la bioimpedancia sobre la superficie corneal. Al menos una imagen de cada ojo de cada paciente fue registrada durante la evaluación con lámpara de hendidura. Al final de la visita, las mismas LC fueron adaptadas en los ojos que correspondiera de cada paciente, y su adaptación revisada (movimiento, centrado, comodidad del paciente). Se les pidió a los sujetos del estudio volver a la siguiente visita 4 días más tarde (una semana de porte prolongado de las LC).

La cuarta visita se realizó después de 7 días de porte prolongado de las LC (sin retirar la LC durante el sueño). Siguiendo el mismo orden que en la anterior visita, en primer lugar se llevó a cabo la evaluación con lámpara de hendidura de la superficie corneal. Se retiraron las LC e inmediatamente después se realizaron las medidas de bioimpedancia corneal. A continuación se realizó la medida de la paquimetría corneal y epitelial. Para terminar, se evaluó la integridad corneal con lámpara de hendidura y tinción de fluoresceína bajo luz azul cobalto, en busca de cualquier signo de daño atribuible a la aplicación del sensor de medida de la bioimpedancia sobre la superficie corneal. Al menos una imagen de cada ojo de cada paciente fue registrada durante la evaluación con lámpara de hendidura. En este momento se dio por finalizada la participación del sujeto en el estudio; salvo en el hipotético caso de que éste presentara cualquier síntoma o signo de complicación secundario a la aplicación del sensor de medida de bioimpedancia sobre la córnea o al uso de la LC, en cuyo caso se

determinaría un protocolo de visitas y/o tratamiento para paliar los daños si fuera necesario.

#### 3.3.3.5. Criterio de edema

El criterio que se empleó para determinar el grado de edema inducido entre la medida basal y la medida después de portar la LC durante 3 o 7 días fue la variación que se produjo en el espesor corneal total y epitelial expresado en porcentaje para la localización central de la córnea (apartado 3.2.3.5).

#### 3.3.3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA) para Windows. Únicamente los ojos derechos de los sujetos fueron incluidos en el análisis estadístico. Se evaluó la normalidad de la distribución de los datos mediante el test de Saphiro-Wilk. Se emplearon los siguientes contrastes estadísticos (se tomó un valor de  $P < 0,05$  como diferencia significativa):

- Las diferencias en el espesor corneal en el tiempo (entre visitas) se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni entre la medida basal (antes de llevar la LC) y la medida a los 3 días y 7 días con LC.
- Las diferencias en el espesor corneal entre ojos portadores de LC de alto y bajo Dk (entre grupos) se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) para detectar si las diferencias eran atribuibles a la hipoxia provocada por el uso de LC.

- Las diferencias en el grado de edema en el tiempo se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) entre el edema después de 3 días y 7 días con la LC
- Las diferencias en el grado de edema entre ojos portadores de LC de alto y bajo Dk se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) para detectar si las diferencias eran atribuibles a la hipoxia provocada por el uso de LC.
- Las diferencias en la permeabilidad epitelial y endotelial en el tiempo se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni entre la medida basal (antes de llevar la LC) y la medida a los 3 días y 7 días con LC.
- Las diferencias en la permeabilidad epitelial entre ojos portadores de LC de alto y bajo Dk se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA).
- La relación entre el espesor corneal total y epitelial y la permeabilidad epitelial y endotelial se analizó con un análisis del coeficiente de correlación de Pearson.

#### 3.3.3.7. Instalaciones

Todas las visitas tuvieron lugar en el área clínica del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid.

---

### 3.3.4. Resultados

---

#### 3.3.4.1. Muestra

Se incluyeron en el análisis 10 ojos de 10 sujetos, seis mujeres y cuatro hombres. El rango de edad varió desde los 20 a los 28 años con un valor medio de  $25 \pm 2,7$  años. El rango de refracción en términos de equivalente esférico fue de entre +0,50 hasta -7,25 D con un valor medio de  $-2,40 \pm 2,67$  D. Cuatro eran usuarios de LC (tres utilizaban LCH y uno RGPLC), que suspendieron su uso al menos una semana antes de comenzar el estudio.

Durante el estudio, cinco ojos derechos portaron LC de alto Dk, y los cinco ojos derechos restantes portaron LC de bajo Dk. Ningún sujeto abandonó el estudio ni por su propia voluntad ni por decisión del investigador.

#### 3.3.4.2. Valoración de la seguridad del dispositivo

La evaluación del estado de la córnea después de la aplicación del sensor de medida de la bioimpedancia sobre la superficie corneal en cada visita no reveló ningún signo macroscópico de daño atribuible a su uso. No se detectaron signos ni patrón de tinción con fluoresceína que pudiera ser característico del contacto del sensor con la superficie corneal.

Un único sujeto presentó signos de queratopatía punteada superficial (figura 3.8) en el ojo que portó la LC de bajo Dk (grado 1 en la escala Efron para valorar complicaciones de LC),<sup>128,129</sup> probablemente debido a la hipoxia inducida por el porte prolongado de la lente.

Ningún sujeto reportó incomodidad o desagrado durante la medida de la bioimpedancia corneal.

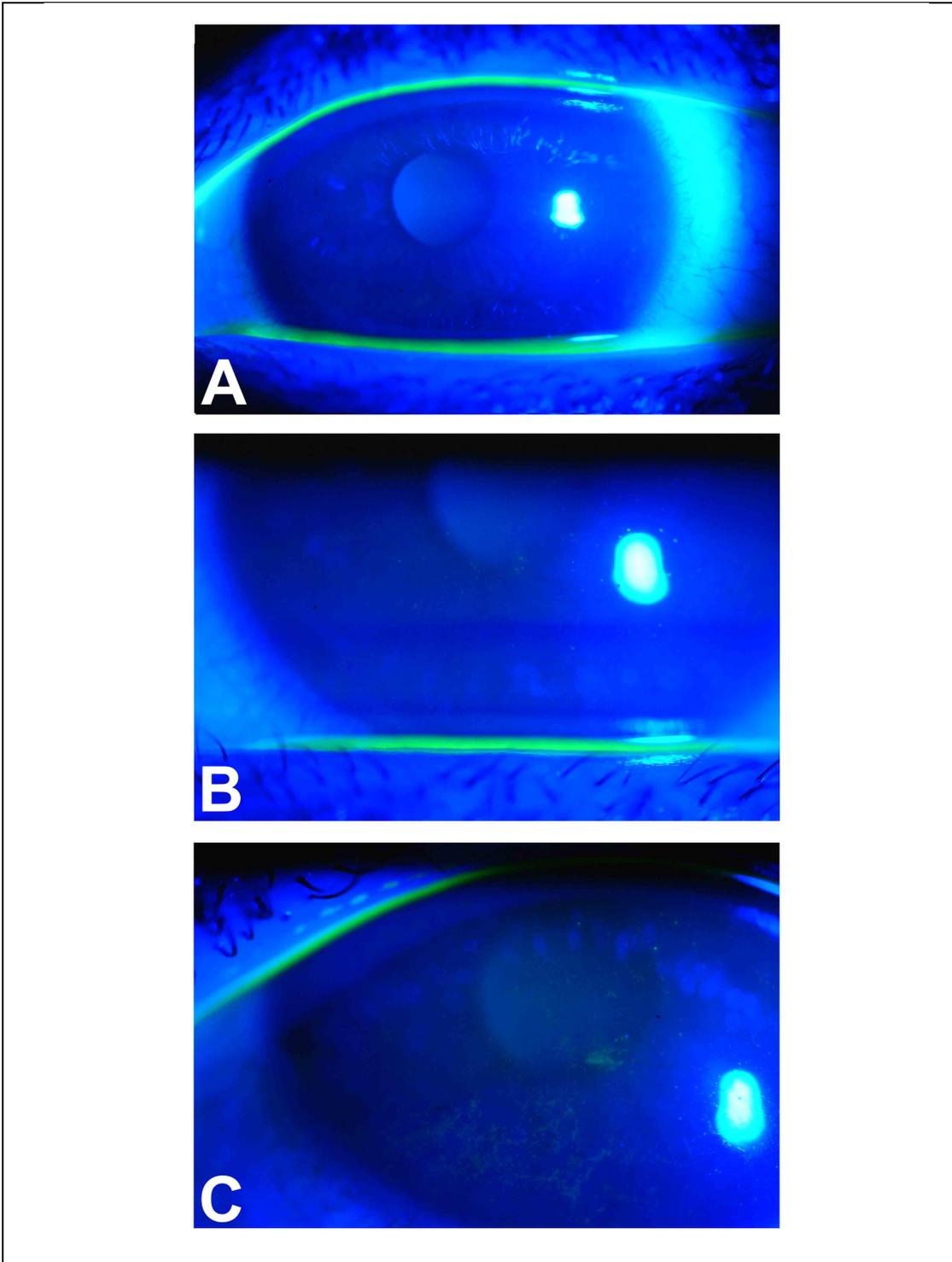


Figura 3.8. Imágenes de la evaluación de la superficie corneal mediante tinción con fluoresceína y observación con lámpara de hendidura y luz azul cobalto del ojo que presentó queratopatía punteada superficial tras 3 días (B) y 7 días (C) de porte de una LC de bajo Dk (Etafilcon A) respecto del momento inicial del estudio (A, imagen basal). Las imágenes fueron siempre tomadas después de realizar la medida de bioimpedancia.

### 3.3.4.3. Detección de diferencias en la paquimetría corneal

Los datos de paquimetría y edema corneal siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Los resultados de la paquimetría corneal se muestran en la Tabla 3.11. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la paquimetría corneal entre los ojos que portaron LC de alto Dk y los ojos que portaron LC de bajo Dk en ninguna de las visitas ( $P > 0,05$  ANOVA). Tampoco se detectó un incremento significativo en el espesor corneal a lo largo del estudio ( $P > 0,05$  ANOVA) en ninguno de los grupos.

Los resultados del edema inducido por el porte de LC se muestran en la Tabla 3.12. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos portadores de LC de alto y bajo Dk después de 3 o 7 días de uso prolongado ( $P > 0,05$  ANOVA). Los ojos portadores de LC de alto Dk no sufrieron un edema corneal significativo a lo largo del estudio ( $P > 0,05$  ANOVA), sin embargo los ojos portadores de LC de bajo Dk sí mostraron un edema corneal significativo entre las distintas visitas ( $P = 0,002$  ANOVA).

<b>Paquimetría corneal (µm)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: tres días con LC</b>	<b>Visita 3: siete días con LC</b>	<b>P<sup>†</sup></b>
<b>LC alto-Dk</b>	578,87 ± 28,10	586,66 ± 27,53	584,60 ± 29,52	0,904
<b>LC bajo-Dk</b>	541,13 ± 24,43	554,20 ± 26,31	554,33 ± 28,64	0,673
<b>P*</b>	0,053	0,093	0,139	

Tabla 3.11. Resumen de las medidas del espesor corneal central (media ± DS), obtenidas con el tomógrafo de coherencia óptica 3D OCT-2000, para las tres visitas del estudio. \*Análisis de la varianza (ANOVA). †Análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni.

<b>Edema corneal (%)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: tres días con LC</b>	<b>Visita 3: siete días con LC</b>	<b>P*</b>
<b>LC alto-Dk</b>	-	1,36 ± 1,27 %	0,98 ± 1,10 %	0,115
<b>LC bajo-Dk</b>	-	2,41 ± 1,07 %	2,42 ± 1,20 %	0,002
<b>P*</b>	-	0,197	0,085	

Tabla 3.12. Edema corneal inducido (media ± DS) después de 3 días y 7 días de uso prolongado con las LC. \*Análisis de la varianza (ANOVA).

#### 3.3.4.4. Detección de diferencias en la paquimetría epitelial

Los datos de paquimetría y edema epitelial siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Los resultados de la paquimetría epitelial se muestran en la Tabla 3.13. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos que portaron LC de alto Dk y los ojos que portaron LC de bajo Dk en ninguna de las visitas ( $P > 0,05$  ANOVA). Tampoco se detectó un incremento significativo en el espesor epitelial a lo largo del estudio ( $P > 0,05$  ANOVA) en ninguno de los grupos.

Sin excepción el espesor epitelial disminuyó con el uso de las lentes, independientemente del tipo de lente utilizado o la visita de estudio (tabla 3.14).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos portadores de LC de alto y bajo Dk después de 3 días de uso de LC ( $P = 0,558$  ANOVA); sin embargo después de 7 días de porte las LC de bajo Dk presentaron un adelgazamiento epitelial significativamente superior que en el caso de las LC de alto Dk ( $P = 0,014$  ANOVA). Por otro lado, ningún ojo sufrió variaciones significativas del espesor epitelial a lo largo del estudio ( $P > 0,05$  ANOVA).

<b>Paquimetría epitelial (<math>\mu\text{m}</math>)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: tres días con LC</b>	<b>Visita 3: siete días con LC</b>	<b>P<sup>†</sup></b>
<b>LC alto-Dk</b>	53,53 $\pm$ 3,58	52,40 $\pm$ 1,75	53,33 $\pm$ 2,21	0,772
<b>LC bajo-Dk</b>	52,47 $\pm$ 3,45	50,00 $\pm$ 2,37	48,00 $\pm$ 4,75	0,196
<b>P*</b>	0,644	0,106	0,053	

Tabla 3.13. Resumen de las medidas del espesor epitelial (media  $\pm$  DS), obtenidas con el tomógrafo de coherencia óptica 3D OCT-2000, para las tres visitas del estudio. \*Análisis de la varianza (ANOVA). <sup>†</sup>Análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni.

<b>Edema epitelial (%)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: tres días con LC</b>	<b>Visita 3: siete días con LC</b>	<b>P*</b>
<b>LC alto-Dk</b>	-	-1,82 $\pm$ 6,49 %	-0,23 $\pm$ 3,19 %	0,759
<b>LC bajo-Dk</b>	-	-4,42 $\pm$ 6,97 %	-8,60 $\pm$ 5,09 %	0,055
<b>P*</b>	-	0,558	0,014	

Tabla 3.14. Edema epitelial inducido (media  $\pm$  DS) después de 3 días y 7 días de uso prolongado con las LC. \*Análisis de la varianza (ANOVA).

#### 3.3.4.5. Detección de diferencias en la permeabilidad epitelial

Los datos de bioimpedancia epitelial siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos que portaron LC de alto Dk o bajo Dk ( $P > 0,05$  ANOVA); y ninguno presentó variaciones estadísticamente significativas ( $P > 0,05$  ANOVA) en la permeabilidad epitelial a lo largo del estudio (tabla 3.15).

#### 3.3.4.6. Detección de diferencias en la permeabilidad endotelial

Los datos de bioimpedancia endotelial siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos que portaron LC de alto Dk o bajo Dk ( $P > 0,05$  ANOVA); y ninguno presentó variaciones estadísticamente significativas ( $P > 0,05$  ANOVA) en la permeabilidad endotelial a lo largo del estudio (tabla 3.16).

<b>Permeabilidad epitelial (<math>\Omega</math>)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: tres días con LC</b>	<b>Visita 3: siete días con LC</b>	<b>P<sup>†</sup></b>
<b>LC alto-Dk</b>	230,20x10 <sup>4</sup> ± 13,58x10 <sup>4</sup>	219,24x10 <sup>4</sup> ± 19,30x10 <sup>4</sup>	219,71x10 <sup>4</sup> ± 21,35x10 <sup>4</sup>	0,904
<b>LC bajo-Dk</b>	204,48x10 <sup>4</sup> ± 27,29x10 <sup>4</sup>	206,24x10 <sup>4</sup> ± 13,53x10 <sup>4</sup>	160,75x10 <sup>4</sup> ± 88,86x10 <sup>4</sup>	0,356
<b>P*</b>	0,096	0,253	0,187	

Tabla 3.15. Resumen de las medidas de bioimpedancia epitelial (media ± DS), obtenidas con el equipo de medida de bioimpedancia corneal CORBI, para las tres visitas del estudio. \*Análisis de la varianza (ANOVA). †Análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni.  $\Omega$ = Ohmio

<b>Permeabilidad endotelial (F)</b>				
	<b>Visita 1: medida basal</b>	<b>Visita 2: tres días con LC</b>	<b>Visita 3: siete días con LC</b>	<b>P<sup>†</sup></b>
<b>LC alto-Dk</b>	450.08x10 <sup>-5</sup> ± 111.78x10 <sup>-5</sup>	586.02x10 <sup>-5</sup> ± 391.45x10 <sup>-5</sup>	447.31x10 <sup>-5</sup> ± 244.07x10 <sup>-5</sup>	0,581
<b>LC bajo-Dk</b>	623.62x10 <sup>-5</sup> ± 573.96x10 <sup>-5</sup>	737.57x10 <sup>-5</sup> ± 204.04x10 <sup>-5</sup>	1212.89x10 <sup>-5</sup> ± 934.85x10 <sup>-5</sup>	0,341
<b>P*</b>	0,526	0,465	0,114	

Tabla 3.16. Resumen de las medidas de bioimpedancia endotelial (media ± DS), obtenidas con el equipo de medida de bioimpedancia corneal CORBI, para las tres visitas del estudio. \*Análisis de la varianza (ANOVA). †Análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni. F= Faradio

### 3.3.4.7. Correlaciones

La permeabilidad epitelial mostró una alta correlación con el porcentaje de adelgazamiento epitelial [(p=0,004;  $r^2=0,817$ ) (figura 3.9)] y con el porcentaje de edema corneal [(p=0,045;  $r^2=-0,643$ ) (figura 3.10)] después de 7 días con las LC.

La permeabilidad endotelial mostró una alta correlación con el porcentaje de edema corneal inducido después de 7 días con las LC (p=0,044;  $r^2=0,646$ ) (figura 3.11).

El porcentaje de adelgazamiento epitelial mostró una alta correlación con el porcentaje de edema corneal después de 7 días con las LC (p=0,012;  $r^2=-0,755$ ) (figura 3.12).

El reducido tamaño de la muestra así como los valores extremos encontrados sugieren una interpretación cautelosa de los resultados.

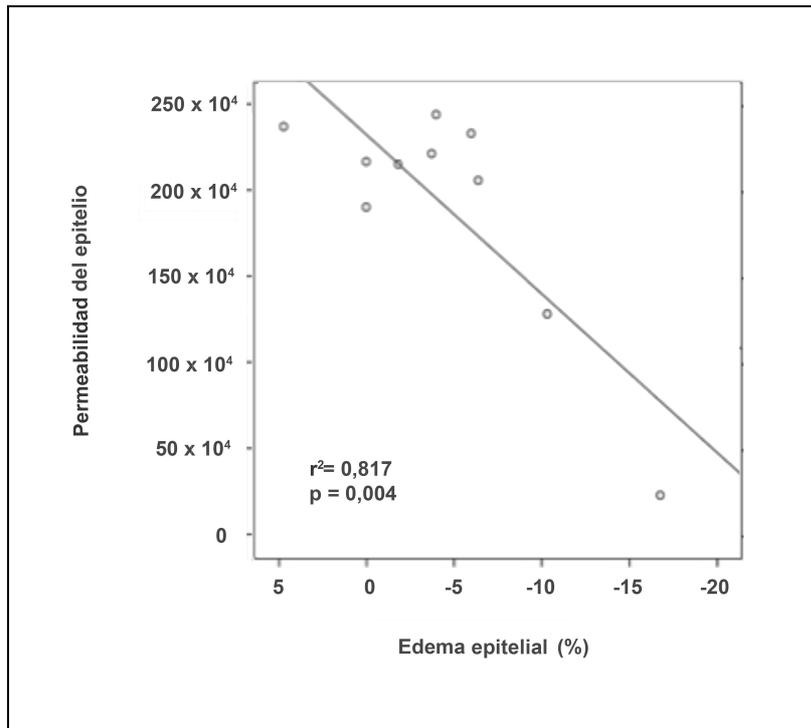


Figura 3.9. Correlación entre permeabilidad epitelial ( $\Omega$ ) y edema epitelial (%).

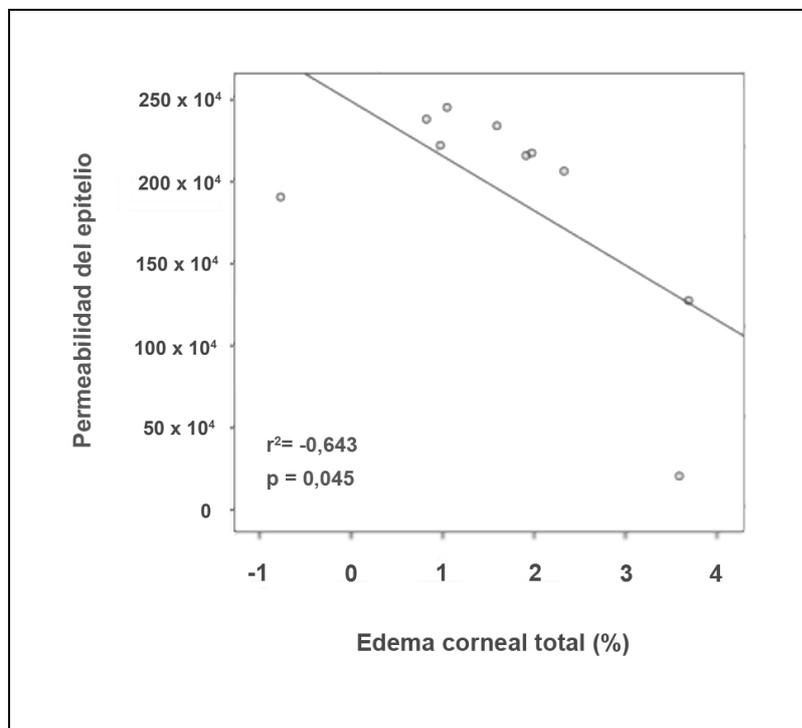


Figura 3.10. Correlación entre permeabilidad epitelial ( $\Omega$ ) y edema corneal total (%).

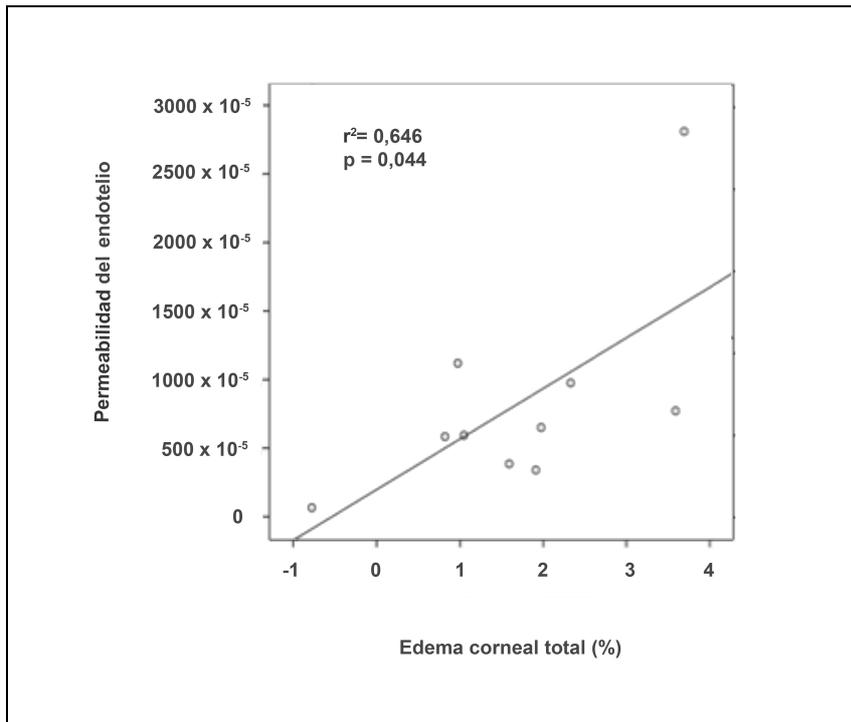


Figura 3.11. Correlación entre permeabilidad endotelial (F) y edema corneal total (%).

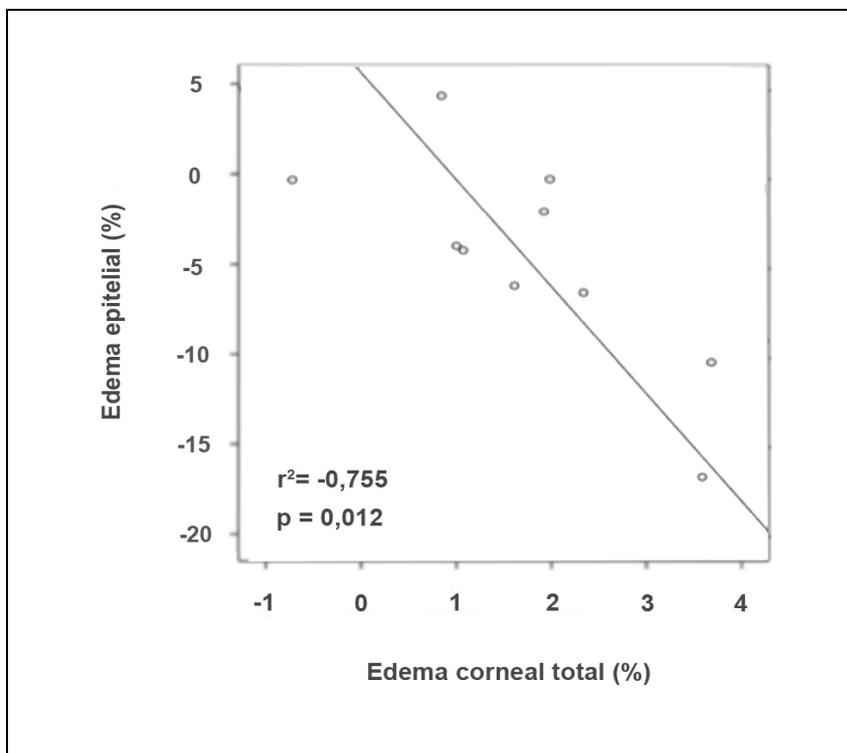


Figura 3.12. Correlación entre edema epitelial (%) y edema corneal total (%).

---

### 3.3.5. Discusión

---

La fisiología de la córnea se ve alterada por el porte de LC, principalmente como resultado de la hipoxia inducida y el trauma mecánico generado.<sup>130,86</sup> Estos cambios en la homeostasis corneal pueden provocar una situación en que la córnea se vuelve vulnerable tanto a la entrada de agentes externos (asociado con un mayor riesgo de infección microbiana,<sup>77,108</sup> cuando la función barrera del epitelio se ve afectada); como al edema corneal<sup>125</sup> (cuando la función barrera del endotelio falla y se pierde el equilibrio necesario para mantener el nivel normal de deshidratación corneal). Es por este motivo que la investigación en el campo de la contactología ha puesto especial interés durante las últimas décadas en desarrollar métodos que evalúen de manera directa y cuantitativa el estado de la función barrera del epitelio y el endotelio corneal.

Como ya se ha descrito anteriormente, la función barrera de estas capas corneales puede ser directamente evaluada objetivamente en humanos *in vivo* únicamente utilizando técnicas de fluorofotometría (medida de la captación de fluoresceína en estroma y cámara anterior, y cambios en su concentración a lo largo del tiempo).<sup>72</sup> La técnica empleada apenas ha evolucionado desde que surgiera a finales de la década de los 60<sup>3</sup> y principios de los<sup>70,75,76</sup> con el inconveniente de que todas sus desventajas se mantienen desde entonces: excesivos tiempos de espera,<sup>79</sup> baja repetibilidad<sup>80</sup> y necesidad de un mayor refinamiento de la técnica para su popularización en la práctica clínica.<sup>72,81</sup>

La inconsistencia entre distintos estudios al aplicar la medida de la fluorofotometría para la evaluación de la función barrera de epitelio y endotelio confirman estas afirmaciones. McNamara<sup>84</sup> reportó un incremento

medio del 41% en la permeabilidad epitelial después de 1 hora de porte de LCH (Dk=18) con los párpados ocluidos, mientras que Lin<sup>85</sup> no halló cambios en la permeabilidad epitelial en sujetos que llevaron LCH (Dk=140) en las mismas condiciones (1 hora con los ojos cerrados). McNamara<sup>116</sup> repitió el estudio pero esta vez aumentaron el tiempo de porte de las LC (las mismas lentes que en el estudio anterior<sup>84</sup>) y encontraron un aumento de la permeabilidad epitelial del 99% en sujetos que llevaron las lentes de manera continuada durante 2 semanas sin observar cambios con lámpara de hendidura.

En cuanto al endotelio, Dutt<sup>86</sup> reportó un incremento significativo de la permeabilidad endotelial en un grupo de usuarios de LCH (Dk/t medio =  $17 \pm 3$ ) con una media de 4 años de uso, frente a un grupo de sujetos control no usuarios de LC. Sin embargo, Bourne<sup>87</sup> y Carlson<sup>131</sup> no encontraron cambios significativos en la función barrera endotelial en un grupo de usuarios de LC (distinto diseño y Dk), con al menos 5 años de uso, frente a un grupo de sujetos control no usuarios de LC. Finalmente, Chang<sup>78</sup> halló un descenso de la permeabilidad endotelial en dos grupos de usuarios de LCH (el autor no especifica Dk), divididos en función del tiempo de uso de las lentes: menos de 5 años y más de 5 años, frente a un grupo de sujetos control. Este último autor atribuye sus resultados (descenso de la permeabilidad endotelial) a la falta de fiabilidad del método de medida de la fluorofotometría y no al efecto del porte de las LC.

Parece razonable por tanto afirmar que la fluorofotometría, a pesar de ser la única herramienta disponible para valorar de manera directa el estado de la función barrera del epitelio y el endotelio de la córnea humana *in vivo*, tiene una utilidad limitada en la práctica clínica, que justifica la necesidad de encontrar nuevas técnicas capaces de detectar y monitorizar

los cambios en la permeabilidad de estas capas corneales en sujetos portadores de LC.

El presente trabajo se planteó con el objetivo de establecer la seguridad y capacidad de un nuevo método basado en el estudio de las propiedades eléctricas pasivas de la córnea (bioimpedancia corneal), para obtener de una manera directa, objetiva y cuantitativa el estado de la función barrera epitelial y endotelial de la córnea humana *in vivo*, cubriendo esta necesidad.

#### 3.3.5.1. Seguridad de la técnica de medida de bioimpedancia corneal

El principal objetivo de este estudio fue determinar si la aplicación del sensor de medida de la bioimpedancia sobre la superficie de la córnea es segura y no provoca daños sobre la misma. Los resultados no muestran signos macroscópicos de daño epitelial secundario a la aplicación del sensor sobre la superficie corneal al ser evaluada mediante tinción con fluoresceína y lámpara de hendidura con luz azul cobalto. Los sujetos no reportaron daño, malestar o incomodidad durante o después de la realización de la medida.

Únicamente se encontró una queratopatía punteada superficial leve en un ojo que portó LC de bajo Dk, tanto a los 3 como a los 7 días de porte, atribuible a la hipoxia inducida por la lente. Es importante resaltar que no se observó tinción por fluoresceína en la evaluación de la superficie ocular de este ojo después de realizar la medida basal de la bioimpedancia corneal (antes de que hubiera llevado la lente), sino que únicamente se apreció tras el porte de la LC.

Estos resultados confirman por tanto que la herramienta de medida de la bioimpedancia corneal es segura para su uso en la práctica clínica como técnica de evaluación de la permeabilidad epitelial y endotelial de manera no invasiva en córneas humanas *in vivo*.

#### 3.3.5.2. Permeabilidad epitelial

La permeabilidad epitelial no ha mostrado cambios significativos a lo largo del estudio (a los 3 o 7 días de porte prolongado) para ninguno de los dos tipos de LC empleadas (alto o bajo Dk). Sin embargo, y aunque no es estadísticamente significativo, sí se ha encontrado un ligero descenso de la permeabilidad epitelial (lo que puede entenderse como una mejora de la función barrera del epitelio) en el caso de los ojos que llevaron la LC de bajo Dk después de 7 días de uso prolongado.

Este hallazgo es muy interesante teniendo en cuenta que a priori podría parecer contrario a lo esperado (fallo de la función barrera y consiguiente aumento de la permeabilidad), lo que se asemeja a los resultados encontrados en el *“Estudio I. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial en modelo animal”*, donde a las 24 horas de porte de las LC el epitelio de los conejos presentó igualmente una disminución en su permeabilidad. En aquel estudio, se planteó que la causa pudiera ser una disminución del espacio extracelular en el tejido epitelial dadas las referencias bibliográficas que proponen un adelgazamiento epitelial en usuarios de LC,<sup>108,121,122</sup> hipótesis que no pudo comprobarse puesto que durante la realización del experimento no se monitorizaron los cambios en el espesor epitelial.

Por este motivo, en el presente trabajo sí se incluyó la medida del espesor epitelial (3D OCT-2000). De la misma manera que no se han

encontrado cambios significativos en la permeabilidad del epitelio, tampoco el espesor epitelial ha mostrado cambios significativos a lo largo del estudio para ninguno de los dos tipos de LC empleadas (alto y bajo Dk). Si bien se ha observado una tendencia al adelgazamiento epitelial en los ojos que llevaron LC de bajo Dk (rozando la significación estadística) que deberá contrastarse en futuros trabajos.

Un adelgazamiento del epitelio puede traducirse en mayor compresión de sus células y por consiguiente menos espacio extracelular. Con la disminución del espacio extracelular se reduce el espacio por donde ha de pasar la corriente durante la medida de la bioimpedancia, lo que supone mayor dificultad para el paso de la corriente, compatible con una disminución de la permeabilidad del epitelio. Son varios los estudios que han reportado un adelgazamiento de la capa epitelial secundario al uso de LC<sup>108,121,122</sup> (aunque en estos trabajos no se ha medido la permeabilidad epitelial), por lo que el cambio en la bioimpedancia parece biológicamente plausible.

Lin<sup>85</sup> reportó la misma tendencia hacia el descenso de la permeabilidad epitelial (aunque sin cambios significativos) en ojos que llevaron una LCH de alto Dk (Dk=140) durante 1 hora. En aquel estudio no se monitorizaron los cambios en la paquimetría epitelial, y el autor no pudo explicar la razón por la cual la función barrera del epitelio parecía mejorar, deduciendo que se trataba de algún tipo de efecto protector por parte del epitelio al hecho de portar LC. Los resultados encontrados en el presente trabajo encuentran una explicación a estos hallazgos que no implica ningún efecto protector del epitelio, sino que sugieren que la permeabilidad epitelial disminuye debido al adelgazamiento del epitelio corneal durante el porte prolongado de LCH de bajo Dk durante una semana.

### 3.3.5.3. Permeabilidad endotelial

La permeabilidad endotelial no ha mostrado cambios significativos a lo largo del estudio (a los 3 o 7 días de porte prolongado) para ninguno de los dos tipos de LC empleadas (alto o bajo Dk) en este trabajo. Sin embargo, sí que se aprecia una clara tendencia al aumento de la permeabilidad del endotelio en los sujetos que llevaron LC de bajo Dk, que correlaciona con el edema corneal inducido ( $r^2=0,646$ ;  $p=0,04$ ). Estos hallazgos parecen sugerir que, aunque no de manera estadísticamente significativa, la función barrera del endotelio puede verse afectada por la hipoxia que induce el uso prolongado de LCH de bajo Dk durante 3 y 7 días, provocando la pérdida de cohesión de las TJ que a su vez incrementa la conductividad eléctrica del endotelio al disminuir la resistencia endotelial, ya que la corriente puede atravesar el tejido con mayor facilidad por los espacios intercelulares. Estos resultados concuerdan con el edema corneal que se ha encontrado en este estudio.

Los estudios de Bourne<sup>87</sup> y Carlson<sup>131</sup> tampoco reportaron cambios significativas en la permeabilidad endotelial en un grupo de usuarios portadores de LC (distinto diseño y Dk) de más de 5 años frente a un grupo de sujetos control no usuarios de LC, empleando la fluorofotometría para evaluar la función barrera del endotelio.

### 3.3.5.4. Puntos fuertes y limitaciones

Este trabajo ha evaluado y cuantificado por primera vez la seguridad y capacidad de una nueva técnica basada en medidas de la bioimpedancia corneal que proporciona de manera objetiva datos de la permeabilidad del epitelio y el endotelio de la córnea en usuarios de LCH *in vivo* de manera no invasiva.

Se han utilizado dos tipos distintos de LC con el objetivo de inducir diferente grado de hipoxia en la córnea y por consiguiente diferente grado de alteración en la permeabilidad de las capas estudiadas para determinar si el prototipo actual permite detectar cambios en la permeabilidad epitelial y endotelial en función del edema determinado con el cambio en el espesor corneal y epitelial durante una semana de porte de LC.

La principal limitación de este estudio fue la pequeña muestra de sujetos empleada, al tratarse de una prueba de concepto cuyo principal objetivo fue la valoración de la seguridad de la aplicación de ésta técnica en humanos *in vivo*. Así, siguiendo las recomendaciones del Real Decreto 561/1993 sobre Ensayos Clínicos, el estudio estuvo compuesto por un número pequeño de voluntarios en los que se evaluó la seguridad de la aplicación de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal *in vivo*.

Además, la falta de trabajos previos con este método en humanos no permite comparar resultados, evaluar su eficacia, o comparar la repetibilidad y reproducibilidad de las medidas. Son necesarias mejoras en el equipo para que permita su futura implantación en la práctica clínica, y más trabajos clínicos que permitan un aumento del tamaño muestral y determinen su eficacia y utilidad clínica. También parece necesario determinar el rango de valores de normalidad de la permeabilidad del epitelio y el endotelio corneal en sujetos sanos y no usuarios de LC.

Por otro lado, se ha considerado la posibilidad de que el anestésico tópico pueda alterar la permeabilidad del epitelio y el endotelio corneal o la paquimetría total de la córnea. En el caso de ésta última, parece que existe un claro consenso por el que se acepta que la oxibuprocaina al 0,4% (empleada en este estudio) no induce cambios significativos en la

paquimetría corneal.<sup>132-137</sup> En el caso de la permeabilidad corneal, aunque el efecto está menos estudiado, ninguno de los trabajos encontrados ha reportado cambios significativos en la permeabilidad epitelial tras la instilación de este anestésico,<sup>138,139</sup> sin que se hayan encontrado referencias en cuanto a la permeabilidad endotelial.

Las futuras aplicaciones de ésta técnica incluirían la monitorización de la función barrera de epitelio y endotelio en diferentes situaciones clínicas como en cirugía ocular (por ejemplo cirugía de cataratas, cirugía refractiva o implante de anillos intraestromales); la evaluación de la idoneidad de una córnea donante para su trasplante, o la monitorización de cualquier tipo de disfunción endotelial (como la distrofia endotelial de Fuch o el síndrome endotelial iridocorneal); lo que ayudaría en el manejo de estos pacientes.

#### 3.3.5.5. Conclusiones

En resumen, este trabajo proporciona por primera vez una medida segura, directa, objetiva y cuantitativa de la permeabilidad del epitelio y endotelio de la córnea humana *in vivo* de manera no invasiva mediante el estudio de sus propiedades eléctricas pasivas, haciendo de la medida de la bioimpedancia corneal una potencial herramienta para el diagnóstico y monitorización de cambios en la fisiología de la córnea.

Este trabajo ha demostrado que la medida de la bioimpedancia es una técnica segura en humanos, si bien es necesaria más investigación que determine si puede llegar a ser un instrumento eficaz para detectar cambios en la permeabilidad del epitelio y endotelio corneal relacionados con el porte de LC.

Por tanto, se necesitan futuros trabajos que mejoren la repetibilidad y fiabilidad del prototipo de medida utilizado, estableciendo un rango de normalidad para los valores de la permeabilidad de las capas epitelial y endotelial en una córnea sana, y correlacionando la medida de la bioimpedancia con las alteraciones corneales secundarias al uso de LC.



# 4

# ASIMETRÍA DEL ESPESOR CORNEAL



## 4.1. Introducción

# DIFERENCIAS ANATÓMICAS centro Vs periferia

Aunque a nivel macroscópico la córnea resulte ser una estructura de dimensiones y organización relativamente similares a lo largo de toda su superficie, la realidad es que existen diferencias significativas entre la zona central y la zona periférica del tejido corneal.

En esta sección se detallarán las diferencias anatómicas más notables entre ambas zonas, con especial atención a las diferencias entre el espesor corneal central y el periférico y su posible repercusión en el uso de LC.

## 4.1.1. Definición de la zona central y periférica de la córnea

Aunque no existe una clara definición de las zonas en que puede ser dividida la superficie corneal,<sup>8</sup> parece que la manera más aceptada distribuye su geografía en 3 zonas teniendo como punto de referencia el ápex corneal: córnea central, córnea paracentral y córnea periférica (figura 4.1).

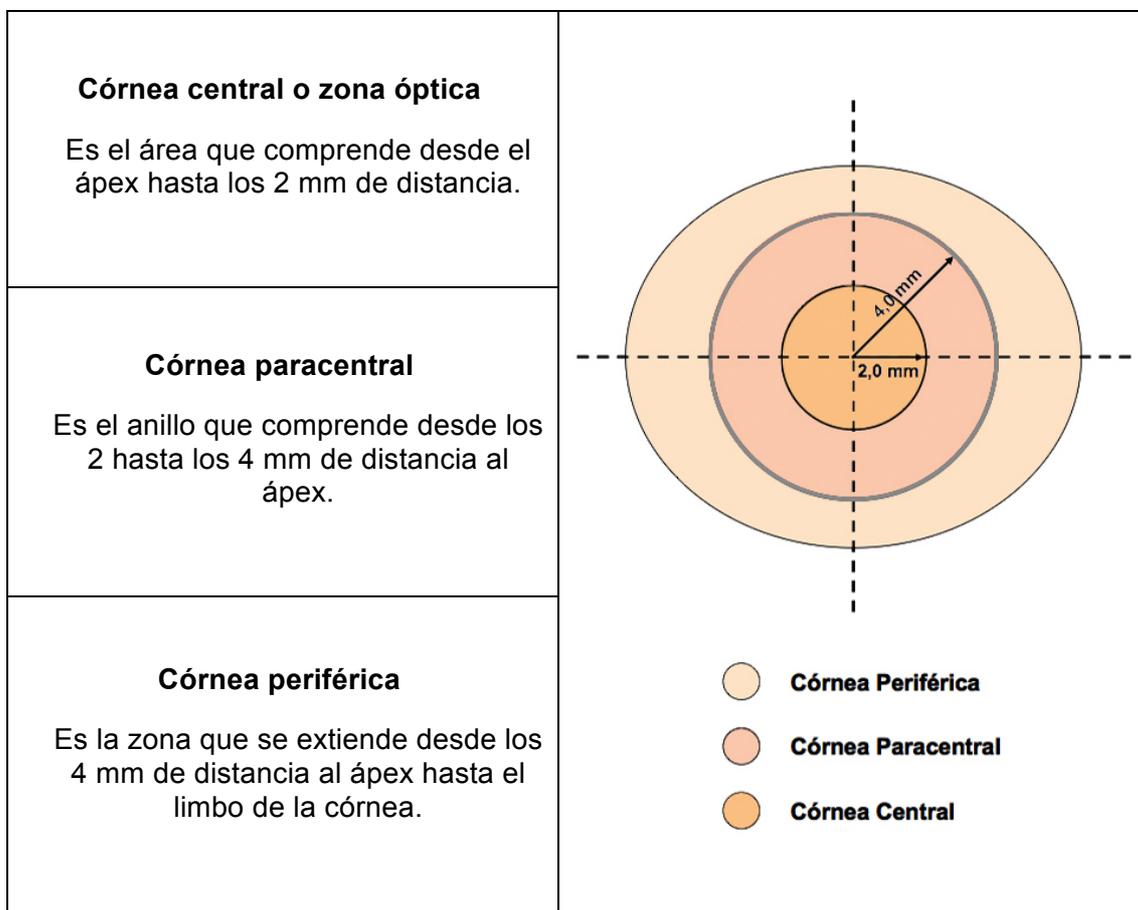


Figura 4.1. Distribución de las tres zonas en que se divide clásicamente la córnea.

#### 4.1.2. Diferencias en el espesor corneal

---

La primera y más notable diferencia entre la córnea central y la periférica es el aumento progresivo del grosor desde el ápex hasta el limbo. La córnea tiene un espesor medio de 535  $\mu\text{m}$  en el centro<sup>8</sup> y de 672  $\mu\text{m}$  en la periferia<sup>8</sup> (fuera de los 4 mm centrales).

Sin embargo, este aumento de grosor no es simétrico desde el centro hacia la periferia, sino que existe un crecimiento asimétrico donde la zona superior presenta el mayor espesor, seguido por la zona nasal, inferior y por último temporal.<sup>140</sup> En el caso del meridiano horizontal, esta asimetría hace que a 4 mm de distancia del centro la córnea sea aproximadamente un 21% más gruesa en la periferia nasal y un 19% más gruesa en la periferia temporal.<sup>141</sup>

#### 4.1.3. Relevancia clínica del espesor corneal periférico

---

A pesar de esta marcada diferencia en el espesor corneal entre el centro y la periferia, generalmente en la rutina de la práctica clínica es usual emplear únicamente la medida del espesor central o ápex de la córnea. Sin embargo, la medida del grosor en la periferia de la córnea puede ser un parámetro a considerar al evaluar, monitorizar y tratar patologías corneales que presentan diferentes afectaciones según la localización. Es el caso de afecciones como el queratocono,<sup>142</sup> la esclerosis sistémica (que produce un engrosamiento de la zona central de la córnea sin engrosamiento en la zona periférica),<sup>143</sup> la infección por el virus del herpes simple (produce lesión en el centro corneal en forma de dendritas y lesión más serpiginosa y dolorosa en la

periferia),<sup>144</sup> o la medida de la presión intraocular (que se ve influenciada por el espesor en la media periferia, especialmente en tonómetros de no contacto).<sup>145</sup>

También es importante valorar el grosor periférico corneal en la evaluación y monitorización de pacientes sometidos a diferentes tipos de cirugía corneal, como puede ser en el caso de la inserción de anillos intraestromales;<sup>146</sup> incisiones relajantes limbares;<sup>146</sup> cirugía refractiva;<sup>147</sup> queratoplastia penetrante,<sup>147</sup> o en el caso del tratamiento del crosslinking (que es menos efectivo en la periferia que en el centro corneal)<sup>148</sup>, entre otros.

#### 4.1.4. Otras diferencias entre el centro y la periferia de la córnea

---

Además de en el espesor, existen otras diferencias entre el centro y la periferia de la córnea. Algunas de estas son:

- Radio de curvatura anterior y potencia refractiva. La superficie corneal anterior sufre un aplanamiento desde la zona central a la periférica,<sup>149</sup> lo cual está a su vez relacionado con la potencia (D), que es mayor en la zona central que en la periferia.
- Inervación. La córnea contiene una mayor densidad de fibras y terminaciones nerviosas en el centro que en la periferia.<sup>150</sup>
- Nutrición y defensa. La zona periférica de la córnea recibe gran parte de su nutrición e inmunodefensa gracias a los vasos sanguíneos y linfáticos que se encuentran en la zona del limbo corneal, lo que explica la presencia en la zona periférica con más frecuencia de indicadores e infiltrados de inflamación.<sup>151</sup>

- Epitelio. La densidad de células madre del epitelio es mayor en la periferia que en el centro,<sup>152</sup> ya que éstas residen en la zona del limbo corneal. Además, las células epiteliales periféricas han demostrado una mayor capacidad de mitosis y proliferación que las de la córnea central.<sup>153</sup>
- Estroma. La densidad de queratocitos es mayor en la periferia que en el centro.<sup>154</sup> Además, se cree que el número de láminas de colágeno así como el espesor de sus fibrillas es superior en la periferia, lo que podría ser en sí una explicación al hecho de que la córnea sea más gruesa en la periferia que en el centro.<sup>155</sup>
- Endotelio. La densidad celular es mayor en la periferia que en el centro.<sup>156</sup> Las células periféricas del endotelio presentan además cierta actividad mitogénica, al contrario que las células de la zona central del endotelio.<sup>157</sup>

#### 4.1.5. Espesor corneal periférico y edema inducido por el uso de LC

---

Dadas las diferencias anatómicas entre la zona central y periférica de la córnea parece lógico pensar que la respuesta corneal a la hipoxia inducida por el uso de LC pudiera ser diferente entre ambas zonas, o incluso entre distintos puntos de la periferia. La literatura presenta controversia y plantea tres respuestas diferentes: que la córnea central se edematiza en mayor medida que la periférica,<sup>38,124,158-164</sup> que la córnea periférica se edematiza más que la central<sup>164-166</sup> y, por último, que toda la superficie corneal se edematiza por igual.<sup>1,166-169</sup>

Esta polémica se mantiene tanto en estudios diseñados a corto plazo (entre 2 y 8 horas de uso de LC)<sup>124,158,159,162-164,166,169</sup> como en estudios diseñados a medio-largo plazo (a partir de 1 semana de porte de LC),<sup>1,38,160,161,165,167,168</sup> lo que hace complicado establecer una posible relación entre el tiempo de porte de las LC y la respuesta corneal a la hipoxia secundaria a su uso (respuesta temprana versus respuesta crónica), en términos de distribución de la topografía del edema a lo largo de la córnea.

Trabajos anteriores del Grupo de Investigación en Optometría del IOBA han encontrado una distribución uniforme del edema inducido por el porte de LC prolongado (durante una semana), es decir, el mismo grado de edema en el centro que en la periferia corneal.<sup>1</sup>

## 4.2. Estudio III. Asimetría del espesor corneal

# PORTE DE LC a corto plazo

Dada la controversia referente al grado de edema corneal provocado por el uso de LC entre el centro y la periferia de la córnea (apartado 4.1.5) parecen necesarios nuevos trabajos que ayuden a clarificar esta controversia y a dilucidar, en la medida de lo posible, los mecanismos de respuesta corneal a la hipoxia inducida por el porte de LC. Además, ningún estudio previo ha evaluado cómo afecta el edema a la asimetría que existe en el espesor corneal entre la periferia nasal y la temporal, por lo que ahondar en este aspecto aportaría nuevo conocimiento para un mayor entendimiento de la biomecánica corneal.

#### 4.2.1. Introducción

---

En la sección 4.1 han sido descritas las diferencias anatómicas entre las zonas central y periférica de la córnea. Varios trabajos han evaluado el edema corneal tanto en el centro de la córnea como en distintos puntos de la periferia, con distintos tiempos de porte de las lentes (corto-medio-largo plazo) y en usuarios de diferentes tipos de LC, existiendo controversia respecto de si el edema se distribuye uniformemente por toda la superficie corneal o es más agudo en una u otra zona de la córnea (apartado 4.1.5). Además, ninguno de los trabajos previos ha tenido en cuenta la asimetría entre las zonas central, nasal y temporal, y su posible variación con el edema inducido por el porte de LCH.

El principal propósito de este estudio fue el de evaluar la respuesta corneal a corto plazo a la hipoxia provocada por el uso de LCH de alta y baja permeabilidad al oxígeno (Dk) determinando los cambios en el centro y en la periferia a lo largo del eje horizontal de la córnea (periferia nasal y temporal).

#### 4.2.2. Hipótesis y objetivos

---

##### 4.2.2.1. Hipótesis

El edema corneal provocado por el porte de lentes de contacto hidrofílicas de alta y baja permeabilidad a corto plazo se distribuye uniformemente desde el centro hacia la periferia corneal (hacia las zonas nasal y temporal), sin que se modifiquen las proporciones entre las distintas zonas de la topografía corneal a lo largo del meridiano horizontal.

#### 4.2.2.2. Objetivos

- **Objetivo 4 de la tesis:** Evaluar la distribución topográfica del edema corneal inducido por el uso de LCH de diferente permeabilidad al oxígeno durante un corto plazo de porte, y establecer si el edema se reparte homogéneamente entre centro y periferia o se acentúa más dependiendo de la zona corneal.

#### 4.2.3. Material y métodos

---

El presente trabajo se enmarcó dentro de un proyecto de investigación multicéntrica entre la Vision Sciences unit del Department of Life Sciences de la Glasgow Caledonian University y el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid. La Universidad de Valladolid financió la estancia de la doctoranda en la Glasgow Caledonian University durante 3 meses con la *“Ayuda para Estancias Breves durante el desarrollo de Tesis Doctorales”*.

El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valladolid.

##### 4.2.3.1. Sujetos

Un total de 20 sujetos que cumplieron los requisitos de inclusión y exclusión (tabla 3.8) fueron incluidos en el estudio.

#### 4.2.3.2. Lentes de contacto

Se utilizaron dos tipos distintos de LC en función del Dk del material con el objetivo de inducir diferente grado de hipoxia en la córnea y por consiguiente diferente grado de edema corneal según la LC utilizada. Así, se escogió una LC de baja permeabilidad al oxígeno (etafilcon A, Dk = 28, Acuvue 2, Johnson & Johnson, Jacksonville, FL) y otra LC de alta permeabilidad al oxígeno (lotrafilcon B, Dk = 110, Air Optix Aqua, Ciba Vision, Duluth, GA). Las características de las LC se detallan en la tabla 3.9.

#### 4.2.3.3. Instrumentación

La medición del espesor corneal se realizó con el equipo Pentacam (Oculus Optikgeräte GmbH, Wetzlar, Alemania). Se trata de un instrumento que utiliza una cámara de Scheimpflug (apartado 2.3.6) que rota 180 grados alrededor del eje óptico del ojo. El proceso de medición completo dura menos de 2 segundos, durante los cuales se toman y analizan hasta 25.000 puntos de elevación de la córnea. Además, durante este tiempo también se corrigen posibles movimientos del ojo para que no afecten a la medida realizada.

La paquimetría se calcula y representa para la superficie completa de la córnea, de limbo a limbo. La fiabilidad de la medida de la paquimetría central y periférica de este instrumento ha sido evaluada en numerosos estudios previos.<sup>170-172</sup>

En cada ocasión se midió tres veces consecutivas la paquimetría corneal en cada ojo, utilizándose la media de las tres medidas como valor final. El mismo explorador realizó todas las medidas de paquimetría corneal siguiendo las recomendaciones del fabricante y se encargó de recopilar los

valores de cada medida en cinco localizaciones diferentes a lo largo del meridiano horizontal de la córnea (figura 4.2):

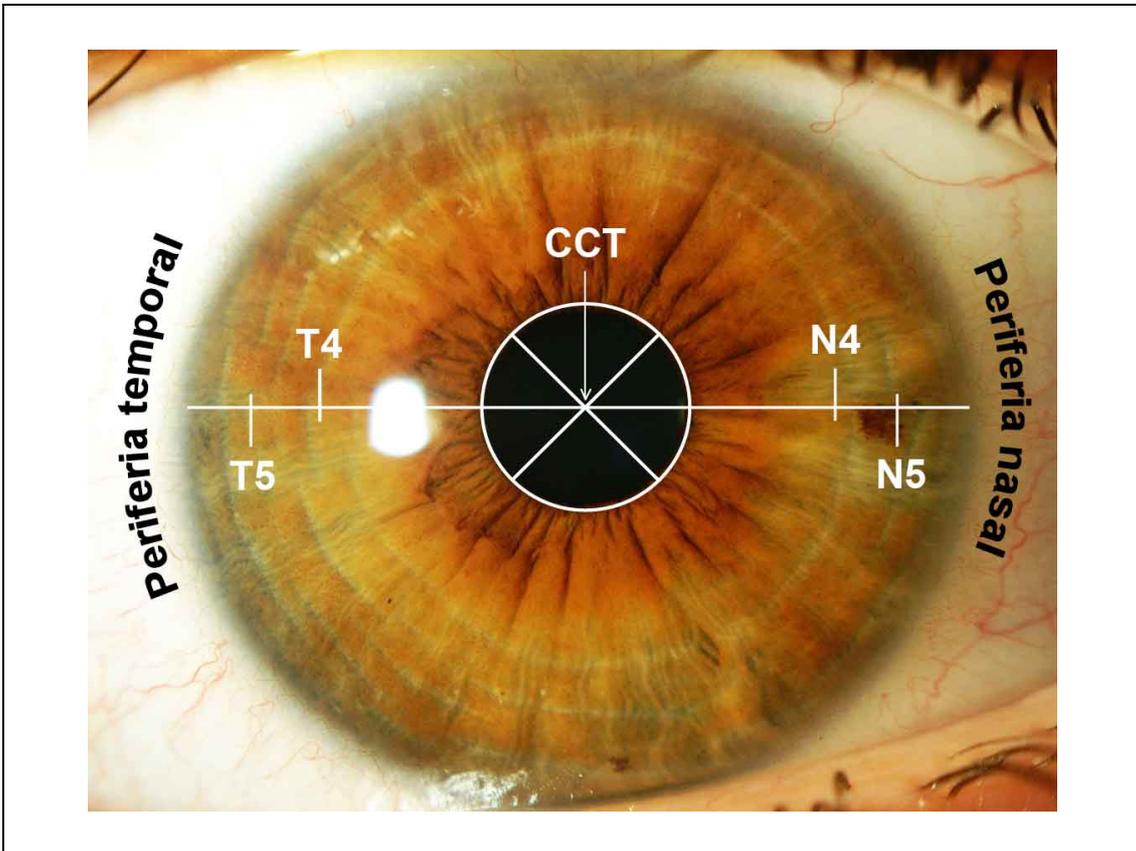


Figura 4.2. Representación de las cinco localizaciones donde se recogieron los valores de paquimetría corneal.

- Centro corneal: el valor utilizado como paquimetría del centro de la córnea fue el centro geométrico de la misma (CCT), siguiendo las recomendaciones de la literatura para obtener medidas fiables y repetibles tanto en el centro como en la periferia<sup>172</sup> (utilizando el CCT como punto de referencia).
- Periferia nasal: utilizando como referencia el punto central CCT, se recogieron los valores a 4 y 5 mm de distancia en el meridiano horizontal hacia el lado nasal de la córnea. De aquí en adelante

estos puntos serán identificados como N4 (periferia nasal, a 4 mm del centro de la córnea) y N5 (periferia nasal, a 5 mm del centro de la córnea).

- Periferia temporal: utilizando como referencia el punto central CCT, se recogieron los valores a 4 y 5 mm de distancia en el meridiano horizontal hacia el lado temporal de la córnea. De aquí en adelante estos puntos serán identificados como T4 (periferia temporal, a 4 mm del centro de la córnea) y T5 (periferia temporal, a 5 mm del centro de la córnea).

#### 4.2.3.4. Procedimiento

El estudio se dividió en dos visitas. En la primera visita (visita de inclusión) se seleccionó a los participantes en función de los criterios de inclusión y exclusión (tabla 3.8). Se explicó a cada sujeto la naturaleza de la investigación y se les invitó a leer una hoja de información al paciente (ANEXO VI). Se requirió de los usuarios habituales de LC que dejaran de utilizar sus lentes al menos una semana antes del comienzo del estudio. Se resolvieron las eventuales dudas de los sujetos y a continuación se obtuvo el consentimiento informado (ANEXO VII) de cada participante. Todos los sujetos fueron tratados acorde a la Declaración de Helsinki.<sup>127</sup>

En la segunda visita (visita de estudio) se completó la anamnesis del sujeto y se realizó una exploración optométrica donde quedaron registradas la agudeza visual, refracción subjetiva, exploración biomicroscópica del polo anterior y se obtuvieron los valores basales de paquimetría corneal con el Pentacam, tal y como se ha descrito en el apartado 4.2.3.3. A continuación, un ojo de cada participante fue aleatoriamente asignado como ojo control mientras que el contralateral sería el portador de la LC. A su vez, se asignó de manera aleatoria la LC que portaría el sujeto (bajo o alto Dk) y se adaptó la LC que

correspondiera en cada caso comprobando que la adaptación (movimiento, centrado, comodidad del paciente) fuese óptima. De esta manera, se obtuvieron tres grupos de estudio diferentes (tabla 4.1).

<b>Grupo control:</b> Compuesto por los ojos que no llevaron LC (n=20)
<b>Grupo alto-Dk:</b> Compuesto por los ojos que llevaron LC de alta permeabilidad al oxígeno (n=10)
<b>Grupo bajo-Dk:</b> Compuesto por los ojos que llevaron LC de baja permeabilidad al oxígeno (n=10)

Tabla 4.1. Grupos del “*Estudio III. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a corto plazo*”.

Las LC se portaron durante un tiempo de 40 minutos. Transcurridos estos 40 minutos, se procedió a la retirada de la LC e inmediatamente se repitieron las medidas de paquimetría, primero del ojo que portó la LC y después del ojo que sirvió como control.

A continuación se repitió la evaluación optométrica que se realizó al comienzo de la visita para descartar cualquier tipo de daño en las córneas de cada sujeto, momento en el que se dio por finalizada la participación del sujeto en el estudio; salvo en el caso de que el sujeto evaluado presentara cualquier síntoma o signo de complicación secundario al uso de la LC, en cuyo caso se determinaría un régimen de visitas y/o tratamiento si fuera necesario.

#### 4.2.3.5. Criterios de edema y asimetría

El criterio que se empleó para determinar el grado de edema inducido entre la medida basal y la medida final (después de portar la LC) fue la variación que se produjo en el espesor corneal expresado en porcentaje para las cinco localizaciones estudiadas (CCT, N4, N5, T4 y T5). La fórmula empleada para calcular este porcentaje se expresa en la tabla 3.4.

La asimetría entre la paquimetría central y periférica se calculó como la diferencia en micras del valor de la periferia menos el valor del centro (diferencia absoluta). El ratio de progresión desde el centro hacia la periferia nasal y temporal se calculó dividiendo el valor de la paquimetría en la periferia entre el valor del centro (índice relativo periférico o IRP) (tabla 4.2).

<b>Diferencia absoluta (<math>\mu\text{m}</math>)</b> = $P_{N4/N5/T4/T5} - P_{CCT}$
<b>IRP (%)</b> = $P_{N4/N5/T4/T5} / P_{CCT}$

Tabla 4.2. Fórmulas empleadas para calcular la diferencia absoluta y el índice relativo periférico (IRP) entre el centro y la periferia de la córnea.  $P_{CCT}$  = paquimetría en el centro corneal.  $P_{N4/N5/T4/T5}$  = paquimetría en las localizaciones periféricas evaluadas: N4, N5, T4 y T5.

La asimetría entre la paquimetría periférica nasal y temporal se calculó como la diferencia en micras del valor en la periferia nasal menos el valor de la periferia temporal en cada localización (a 4 y 5 mm del CCT) (diferencia absoluta). El ratio de la diferencia entre ambas periferias se calculó dividiendo el valor de la paquimetría nasal entre el valor de la paquimetría temporal en cada localización (IRP) (tabla 4.3). Las fórmulas empleadas fueron por tanto:

<b>Diferencia absoluta (<math>\mu\text{m}</math>)</b> = $P_{N4/N5} - P_{T4/T5}$
<b>IRP (%)</b> = $P_{N4/N5} / P_{T4/T5}$

Tabla 4.3. Fórmulas empleadas para calcular la diferencia absoluta y el índice relativo periférico (IRP) entre la periferia nasal y la periferia temporal de la córnea.  $P_{N4/N5}$  = paquimetría en la periferia nasal (N4 o N5).  $P_{T4/T5}$  = paquimetría en la periferia temporal (T4 o T5).

En la tabla 4.4 se muestra la nomenclatura que de ahora en adelante se empleará en referencia a la diferencia absoluta o IRP en función de las localizaciones estudiadas.

Localización	Diferencia absoluta	IRP
Entre el centro y la periferia nasal a 4 mm	N4 – CCT	N4 / CCT
Entre el centro y la periferia nasal a 5 mm	N5 – CCT	N5 / CCT
Entre el centro y la periferia temporal a 4 mm	T4 – CCT	T4 / CCT
Entre el centro y la periferia temporal a 5 mm	T5 – CCT	T5 / CCT
Entre la periferia nasal y la temporal a 4 mm de CCT	N4 – T4	N4 / T4
Entre la periferia nasal y la temporal a 5 mm de CCT	N5 – T5	N5 / T5

Tabla 4.4. Nomenclatura para la diferencia absoluta e índice relativo periférico (IRP) en función de las localizaciones.

#### 4.2.3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA) para Windows. Se generó la estadística descriptiva. Se empleó el test de Saphiro-Wilk para evaluar la normalidad de la distribución de los datos. Se emplearon los siguientes contrastes estadísticos (se tomó un valor de  $P < 0,05$  como diferencia significativa):

- Las diferencias en el espesor corneal en el tiempo se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados entre la medida basal (antes de llevar la LC) y la medida final (40 minutos con LC) en cada grupo de estudio (control, alto-Dk y bajo-Dk).
- Las diferencias en el espesor corneal basal entre grupos (control, alto-Dk y bajo-Dk) se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni para detectar si existían diferencias en el espesor corneal antes del porte de las LC.
- Las diferencias en el grado de edema entre grupos (control, alto-Dk y bajo-Dk) se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni para detectar si las diferencias eran atribuibles a la hipoxia provocada por el uso de LC.
- Las diferencias en la asimetría (asimetría centro – periferia y asimetría nasal – temporal) en el tiempo se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados entre la medida basal (antes de llevar la LC) y la medida final (40 minutos con LC) en cada grupo de estudio (control, alto-Dk y bajo-Dk).

- Las diferencias en la asimetría (asimetría centro – periferia y asimetría nasal – temporal) entre grupos (control, alto-Dk y bajo-Dk) después de 40 minutos de porte de las LC se analizaron con un análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Bonferroni.

#### 4.2.3.7. Instalaciones

Todas las medidas se realizaron en el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid.

El análisis estadístico y de los resultados se llevó a cabo en la Vision Sciences unit del Department of Life Sciences de la Glasgow Caledonian University, en Glasgow, Reino Unido.

#### 4.2.4. Resultados

---

##### 4.2.4.1. Muestra

Se incluyeron en el estudio 40 ojos de 20 sujetos, quince mujeres y cinco hombres. El rango de edad varió desde los 20 a los 34 años con un valor medio de  $27 \pm 4,9$  años. El rango de refracción en términos de equivalente esférico fue de entre +0,50 hasta -6,00 D con un valor medio de  $-1,33 \pm 1,92$  D. Siete eran usuarios de LC (seis utilizaban LCH y uno LCRPG), que suspendieron su uso al menos una semana antes de comenzar el estudio.

Ningún sujeto presentó a lo largo del estudio signos clínicos de complicaciones oculares relacionadas con el uso de las LC del estudio como tinción corneal, inyección limbar, papilas, estrías, u otros hallazgos (grado  $\geq 1$

en la escala Efron para valorar complicaciones de LC).<sup>128,129</sup> Ningún sujeto abandonó el estudio ni por su propia voluntad ni por decisión del equipo investigador.

#### 4.2.4.2. Medida basal del espesor corneal central y periférico y asimetrías corneales

Los datos de paquimetría corneal siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Los valores basales de paquimetría de la muestra de estudio para las localizaciones CCT, N4, N5, T4 y T5 se muestran en la tabla 4.5. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el espesor corneal basal entre los grupos control, alto-Dk y bajo-Dk ( $P > 0,05$  ANOVA).

<b>Localización</b>	<b>Espesor corneal <math>\pm</math> DS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
N5	832,61 $\pm$ 39,71
N4	736,18 $\pm$ 36,186
CCT	566,45 $\pm$ 28,71
T4	686,55 $\pm$ 26,49
T5	786,51 $\pm$ 34,17

Tabla 4.5. Espesor corneal basal en las cinco localizaciones estudiadas para la muestra total del estudio. DS = desviación estándar.

La asimetría entre el centro y la periferia corneal mostró una progresión desigual del engrosamiento corneal entre las zonas nasal y temporal. Concretamente, N4 y N5 resultaron ser un 30% y un 47% respectivamente más gruesa que CCT, mientras que T4 y T5 fueron un 21% y un 39% respectivamente más gruesa que CCT (tabla 4.6). Igualmente, la asimetría entre la zona nasal y la zona temporal mostró que el espesor corneal nasal fue un 7% (N4) y un 6% (N5) mayor que el espesor corneal temporal en T4 y T5 respectivamente (tabla 4.6).

Localización	Diferencia absoluta $\pm$ DS ( $\mu\text{m}$ )	IRP $\pm$ DS (%)
N5 – CCT	266,17 $\pm$ 32,96	1.47 $\pm$ 0,06
N4 – CCT	169,73 $\pm$ 18,93	1.30 $\pm$ 0,03
T5 – CCT	220,06 $\pm$ 34,52	1.39 $\pm$ 0,07
T4 – CCT	120,11 $\pm$ 18,51	1.21 $\pm$ 0,03
N5 – T5	46,10 $\pm$ 29,03	1,06 $\pm$ 0,04
N4 – T4	49,62 $\pm$ 19,35	1,07 $\pm$ 0,03

Tabla 4.6. Diferencias absolutas ( $\mu\text{m}$ ) e IRP (%) entre el espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5). DS = desviación estándar.

#### 4.2.4.3. Diferencias en la paquimetría y edema del espesor corneal central y periférico

Los datos de paquimetría y edema corneal siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Después de 40 minutos de porte de las LC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$  t Student para datos apareados) en el espesor corneal de ninguna de las localizaciones corneales medidas (CCT, N4, N5, T4 y T5) en ninguno de los grupos de estudio: control (tabla 4.7), alto-Dk (tabla 4.8) y bajo-Dk (tabla 4.9).

<b>Paquimetría Grupo control <math>\pm</math> DS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>40 min</b>	<b>P*</b>
N5	833,31 $\pm$ 43,58	826,32 $\pm$ 41,52	0,606
N4	735,87 $\pm$ 37,66	731,78 $\pm$ 34,40	0,722
CCT	565,75 $\pm$ 28,60	563,06 $\pm$ 27,08	0,762
T4	685,78 $\pm$ 28,24	680,25 $\pm$ 27,37	0,534
T5	785,83 $\pm$ 38,04	776,73 $\pm$ 33,63	0,428

Tabla 4.7. Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que no portó LC (grupo control). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

<b>Paquimetría Grupo alto-Dk ± DS (µm)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>40 min</b>	<b>P*</b>
N5	833,36 ± 34,36	829,23 ± 37,23	0,799
N4	746,20 ± 35,49	742,45 ± 37,83	0,822
CCT	571,36 ± 34,72	567,70 ± 37,33	0,823
T4	691,90 ± 21,77	688,76 ± 29,23	0,789
T5	792,67 ± 20,81	790,27 ± 24,86	0,818

Tabla 4.8. Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de alta permeabilidad al oxígeno (grupo alto-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

<b>Paquimetría Grupo bajo-Dk ± DS (µm)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>40 min</b>	<b>P*</b>
N5	830,46 ± 40,48	843,78 ± 40,32	0,471
N4	726,80 ± 34,78	738,62 ± 36,32	0,467
CCT	562,93 ± 24,46	569,00 ± 25,03	0,590
T4	682,76 ± 28,90	691,06 ± 32,59	0,554
T5	781,72 ± 38,68	794,80 ± 42,48	0,481

Tabla 4.9. Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de baja permeabilidad al oxígeno (grupo bajo-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

Las LC de bajo Dk indujeron un grado de edema corneal significativamente mayor ( $P < 0,01$  ANOVA con corrección de Bonferroni) después de 40 minutos de porte de las LC frente al grupo control y al grupo que llevó LC de alto Dk, en todas las localizaciones corneales estudiadas (CCT, N4, N5, T4 y T5) (tabla 4.10).

Edema $\pm$ DS (%)				
Localización	Grupo control	Grupo alto-Dk	Grupo bajo-Dk	P*
N5	-0,82 $\pm$ 1,17	-0,50 $\pm$ 1,29	1,61 $\pm$ 1,33	<0,01
N4	-0,53 $\pm$ 1,11	-0,51 $\pm$ 0,88	1,62 $\pm$ 1,24	<0,01
CCT	-0,45 $\pm$ 0,99	-0,66 $\pm$ 0,77	1,08 $\pm$ 1,60	<0,01
T4	-0,79 $\pm$ 1,31	-0,48 $\pm$ 1,38	1,20 $\pm$ 1,62	<0,01
T5	-1,12 $\pm$ 1,56	-0,30 $\pm$ 1,44	1,67 $\pm$ 1,95	<0,01

Tabla 4.10. Edema corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) de los tres grupos de ojos (grupo control, grupo alto-Dk y grupo bajo-Dk) después de 40 minutos de porte de las LC. DS = desviación estándar. \*ANOVA con corrección de Bonferroni. Diferencias estadísticamente significativas del grupo de bajo-Dk frente a los grupos control y alto-Dk. Los grupos control y alto-Dk no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

#### 4.2.4.4. Diferencias en la asimetría centro - periferia y en la asimetría nasal - temporal

Después de 40 minutos de porte de las LC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$  t Student para datos apareados) en la asimetría de las localizaciones estudiadas en ninguno de los grupos de estudio: control (tabla 4.11), alto-Dk (tabla 4.12) y bajo-Dk (tabla 4.13).

<b>IRP Grupo control ± DS (%)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>40 min</b>	<b>P*</b>
N5 / CCT	1,47 ± 0,06	1,46 ± 0,06	0,805
N4 / CCT	1,30 ± 0,03	1,30 ± 0,03	0,935
T5 / CCT	1,39 ± 0,07	1,38 ± 0,07	0,692
T4 / CCT	1,21 ± 0,03	1,20 ± 0,03	0,743
N5 / T5	1,06 ± 0,04	1,06 ± 0,04	0,816
N4 / T4	1,07 ± 0,03	1,07 ± 0,03	0,773

Tabla 4.11. IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que no portó LC (grupo control). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

<b>IRP Grupo alto-Dk ± DS (%)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>40 min</b>	<b>P*</b>
N5 / CCT	1,46 ± 0,08	1,46 ± 0,08	0,977
N4 / CCT	1,30 ± 0,04	1,30 ± 0,04	0,992
T5 / CCT	1,39 ± 0,07	1,39 ± 0,07	0,925
T4 / CCT	1,21 ± 0,04	1,21 ± 0,04	0,945
N5 / T5	1,05 ± 0,02	1,04 ± 0,03	0,888
N4 / T4	1,07 ± 0,02	1,07 ± 0,02	0,979

Tabla 4.12. IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de alta permeabilidad al oxígeno (grupo alto-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

<b>IRP Grupo bajo-Dk <math>\pm</math> DS (%)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>40 min</b>	<b>P*</b>
N5 / CCT	1,47 $\pm$ 0,05	1,48 $\pm$ 0,04	0,743
N4 / CCT	1,29 $\pm$ 0,03	1,29 $\pm$ 0,02	0,631
T5 / CCT	1,38 $\pm$ 0,06	1,39 $\pm$ 0,05	0,797
T4 / CCT	1,21 $\pm$ 0,03	1,21 $\pm$ 0,03	0,937
N5 / T5	1,06 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,03	0,981
N4 / T4	1,06 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,02	0,666

Tabla 4.13. IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de baja permeabilidad al oxígeno (grupo bajo-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

La asimetría centro – periferia así como la asimetría nasal - temporal se ha mantenido estable después de 40 minutos de porte de las LC, de tal manera que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$  ANOVA) entre los valores de los grupos control, alto-Dk y bajo-Dk (tabla 4.14).

<b>IRP ± DS (%)</b>				
<b>Localización</b>	<b>Grupo control</b>	<b>Grupo alto-Dk</b>	<b>Grupo bajo-Dk</b>	<b>P*</b>
N5 / CCT	1,46 ± 0,06	1,46 ± 0,08	1,48 ± 0,04	0,809
N4 / CCT	1,30 ± 0,03	1,30 ± 0,04	1,29 ± 0,02	0,752
T5 / CCT	1,38 ± 0,07	1,39 ± 0,07	1,39 ± 0,05	0,795
T4 / CCT	1,20 ± 0,03	1,21 ± 0,04	1,21 ± 0,03	0,889
N5 / T5	1,06 ± 0,04	1,04 ± 0,03	1,06 ± 0,03	0,629
N4 / T4	1,07 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,06 ± 0,02	0,779

Tabla 4.14. IRP de las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) de los tres grupos de ojos (grupo control, grupo alto-Dk y grupo bajo-Dk) después de 40 minutos de porte de las LC. DS = desviación estándar. \*ANOVA con corrección de Bonferroni.

#### 4.2.5. Discusión

---

La aparición en los últimos años de tecnología de exploración no invasiva<sup>57,66</sup> capaz de obtener información no sólo del espesor central de la córnea sino también de su periferia de manera precisa ha supuesto la obtención de nuevos datos que enriquecen y mejoran la investigación de la interacción de las LC con la córnea entre otras aplicaciones, tanto en el ámbito científico como clínico.

Como se ha mencionado en el apartado 4.1.5, todavía no existe un claro consenso acerca de cómo se distribuye el edema inducido por el uso de LC a lo largo de la topografía corneal, de tal manera que en la literatura se puede encontrar defensa para las tres posibles situaciones, véase: mayor edema central,<sup>38,124,158-164</sup> mayor edema periférico,<sup>164-166</sup> o igual edema en centro y periferia.<sup>1,166-169</sup> De entre estos trabajos, aproximadamente la mitad tienen un planteamiento de estudio a corto plazo, con tiempos de porte de las LC de entre 2 y 8 horas,<sup>124,158,159,162-164,166,169</sup> con resultados igualmente controvertidos.

El presente trabajo es el primer estudio que investiga el edema central y periférico inducido por el uso de LCH de diferente Dk durante un porte de 40 minutos, con el principal objetivo de establecer si éste se distribuye uniformemente a lo largo de toda la topografía corneal o existe algún área que se vea más afectada por la hipoxia secundaria al uso de LC. Con sólo 40 minutos es el estudio que menos tiempo de porte de LC presenta, analizando la respuesta corneal casi inmediata al porte de LC.

Sin embargo, investigaciones previas han descrito cambios en la morfología del endotelio corneal (blebs endoteliales) con tan sólo unos minutos de porte de LCH, secundarios a la hipoxia inducida por el uso de las lentes.<sup>49,173,174</sup> Teniendo en cuenta que el endotelio corneal es el encargado de mantener el estado de relativa deshidratación de la córnea (apartado 2.2.3) y que en cuestión de unos minutos el metabolismo de las células endoteliales sufre las consecuencias de la privación de oxígeno debido al porte de LC,<sup>49,173,174</sup> parece lógico pensar que el edema corneal como mecanismo de respuesta comience a ser perceptible durante los primeros minutos de porte y, por tanto, susceptible de ser estudiado a corto plazo (minutos de porte).

Además, en este trabajo se plantea un abordaje diferente para el estudio del edema inducido por el uso de LC en el centro y la periferia de la córnea. En la literatura publicada, las diferencias entre una y otra zona se han valorado siempre mediante la comparación del grado de edema entre los distintos puntos objeto del estudio, o incluso mediante la comparación de la diferencia paquimétrica (aumento en micras) entre los distintos puntos. El método empleado en este trabajo consistió en valorar la magnitud del cambio entre los distintos puntos de estudio (CCT, N4, N5 T4 y T5) de tal manera que si todos los puntos se edematizan igual, las proporciones estudiadas (N5 / CCT, N4 / CCT, T5 / CCT, T4 / CCT, N5 / T5, N4 / T4) se mantendrán constantes, pero si la córnea presenta un mayor edema en cualquiera de estos puntos entonces la proporción después del porte de la LC será diferente.

Los resultados muestran que estas proporciones se han mantenido estables en grupo control y después de los 40 minutos de porte de cualquiera de las dos LC (alto y bajo Dk) (tablas 4.11, 4.12, 4.13 y 4.14). Estos resultados sugieren que la hipoxia inducida por el porte de LC a corto plazo afecta por igual al centro y periferia (eje horizontal) de la córnea o que, al menos, el edema se distribuye uniformemente en estas zonas.

Estos resultados coinciden con los trabajos publicados por Lowther,<sup>169</sup> que estudió el edema inducido por LC de hidrogel convencional (LCHC) tras 1, 3 y 6 horas de porte; y por Tyagi,<sup>166</sup> que estudió el edema inducido por LCHC y LC de hidrogel de silicona (LCHSi) tras 8 horas de porte. Ambos autores concluyen que el edema provocado por el porte de LCH a corto plazo es igual en el centro y en la periferia corneal.

Otras investigaciones a corto plazo han arrojado un resultado diferente, encontrando un mayor edema en el centro que en la periferia. Es el caso de los trabajos llevados a cabo por Mandell,<sup>158</sup> que estudió el edema provocado por LC de polimetil metacrilato (LCPMMA) después de 2 horas de porte; Carney,<sup>159</sup> (tras 2 horas de porte de LCPMMA y LCHC), Erickson<sup>162</sup> (LCHC después de 4 horas de porte con ojo ocluido); Wang<sup>124</sup> (LCPMMA y LCHC después de 3 horas de porte con ojo ocluido); Moezzi<sup>163</sup> (LCPMMA después de 3 horas de porte con ojo ocluido) y por último Tyagi<sup>164</sup> (LCPMMA después de 8 horas de porte).

El único estudio que ha encontrado una tendencia contraria (mayor edema en la periferia que en el centro) es el llevado por Tyagi<sup>164</sup> (LCRPG después de 8 horas de porte), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas por lo que sólo podría hablarse de una tendencia y no de una diferencia real.

La mayoría de los trabajos que han encontrado un mayor edema en la zona central que en la periférica se han realizado empleando lentes de PMMA, que por su diseño no llegan a cubrir toda la superficie de la córnea. Así, parece lógico pensar que la hipoxia sufrida por la zona central de la córnea nunca será la misma que la sufrida por la periferia (que al no quedar cubierta por la LC no estará sometida a la misma falta de oxígeno, luego, parece lógico

pensar que el edema en el centro será mayor que en la periferia). Siguiendo esta línea de razonamiento, podría decirse que el edema inducido por el porte de una LC se distribuirá por la topografía de la córnea de manera diferente en función del tipo y diseño de la LC empleada.

En el caso de los trabajos que estudiaron el edema con LCHC<sup>124,159,162</sup> (que sí cubren toda la córnea) cabe destacar que en dos de ellos se estudió el efecto de la hipoxia inducido por el uso de LC con los párpados cerrados, es decir, que al efecto de la hipoxia de la LC habría que sumar el efecto provocado por la oclusión de los ojos durante el tiempo del estudio, lo que puede enmascarar el efecto real producido por las LC. Además se aleja de las condiciones reales en que un usuario de LC portará sus lentes (ojos abiertos) y por lo tanto hace difícil una comparación con los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

#### 4.2.5.1. Puntos fuertes y limitaciones

En este trabajo se ha estudiado la respuesta corneal a la hipoxia inducida por el uso de LC tras solamente 40 minutos de porte, convirtiéndose casi en un estudio del edema inmediato o a muy corto plazo secundario al porte de LCH, lo que puede aportar información que ayude a dilucidar los mecanismos de edematización corneal. Es necesario investigar esta respuesta corneal tras un mayor tiempo de porte de las LC, asemejándose más a las condiciones reales en las que un usuario portaría sus LC. Además, con 40 minutos de uso el edema inducido no ha sido suficiente para causar diferencias significativas en el espesor corneal antes y después del uso de las LC, por lo que es razonable que se hayan mantenido estables las asimetrías entre el centro corneal y la periferia, y las existentes entre la periferia nasal y temporal.

Este trabajo ha obtenido la respuesta a la hipoxia inducida por el uso de LC no sólo en el centro de la córnea sino también en otros cuatro puntos concretos de la topografía corneal, (4 y 5 mm del ápex de la córnea hacia nasal y temporal), sin embargo las herramientas disponibles en la actualidad facilitan la información de cualquier punto deseado de la superficie de la córnea, por lo que podría realizarse un estudio más exhaustivo del edema no sólo en 4 puntos de la periferia del meridiano horizontal sino incluyendo prácticamente el mapa completo de la córnea.

Además, la metodología seguida para llevar a cabo el presente estudio, que difiere del resto de trabajos encontrados en la literatura, supone un nuevo enfoque dentro de la literatura existente. En la mayoría de los trabajos encontrados, para conocer si el edema es igual en el centro que en la periferia de la córnea, calculan el porcentaje de variación en el espesor corneal antes y después del porte de las LC, y comparan por zonas para establecer posibles diferencias. Otra posible manera de determinar estas diferencias es la propuesta en el presente trabajo, que en lugar de establecer las diferencias según el grado de edema en cada zona, se ha determinado la variación en la proporción entre los distintos puntos corneales estudiados, obteniendo así de forma sencilla un índice que determina de manera directa cómo de grande es esa variación.

Otra limitación es que, para corroborar que la distribución del edema corneal es diferente según el diseño de la LC utilizada, sería necesario llevar a cabo un estudio que incluyera LC de otros tipos (PMMA, RGP) a parte de las utilizadas en el presente estudio; si bien esto podría conllevar la inclusión de otras variables de estudio, como la cobertura total o parcial de la córnea, que son difíciles de controlar experimentalmente.

Por otro lado, también sería interesante evaluar en futuros estudios una posible relación entre la magnitud del edema inducido por el porte de LC y su distribución por la topografía corneal. En este trabajo, el grupo de usuarios que portó LC de bajo Dk presentó un edema significativamente superior en todas las localizaciones estudiadas frente a los grupos control y alto-Dk; sin embargo, en ningún caso superó el 1,7% y, quizá, en el caso de edemas de mayor magnitud, los resultados fueran diferentes a los encontrados en el presente estudio (distribución homogénea del edema corneal).

#### 4.2.5.2. Conclusiones

En conclusión, el edema corneal inducido por el uso de LC de alta (Lotrafilcon B – Dk = 110) y baja (Etafilcon A – Dk = 28) permeabilidad al oxígeno después de 40 minutos de porte presenta la misma tendencia repartiéndose uniformemente entre el centro y la periferia del meridiano horizontal de la córnea, por lo que la asimetría entre las zonas nasal y temporal y de éstas con el centro de la córnea no sufren variaciones significativas. Los datos han mostrado que las LC de bajo Dk inducen un edema significativamente mayor que las de alto Dk en todas las zonas corneales estudiadas tras 40 minutos de porte.



### 4.3. Estudio IV. Asimetría del espesor corneal

## PORTE DE LC a medio plazo

En el “*Estudio III. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a corto plazo*” se ha valorado la respuesta corneal a corto plazo a la hipoxia inducida por LCH de diferente permeabilidad al oxígeno durante 40 minutos de porte.

Sin embargo, las condiciones de uso de LC de la mayoría de usuarios se alejan del patrón empleado en el Estudio III, ya que por lo general las utilizarán tiempos superiores a 40 minutos. Por ello, el propósito del siguiente estudio fue el de evaluar los mismos parámetros que relacionan el espesor corneal del centro y la periferia de la córnea (a lo largo del meridiano horizontal) siguiendo los mismos criterios de edema y asimetría que los utilizados en el Estudio III y empleando las mismas LC pero aumentando su porte a una semana de uso prolongado, que aunque tampoco es la elección de la mayoría de los usuarios de lentes de contacto, sí que pueden obtenerse resultados en cuanto al edema inducido más similares a las condiciones de uso real.

#### 4.3.1. Introducción

---

En la sección 4.1 se han descrito las principales diferencias entre las zonas central y periférica de la córnea. Varios trabajos han evaluado el edema corneal inducido por diferentes tipos de LC tanto en el centro de la córnea como en distintos puntos de su periferia. Aunque existe controversia respecto de si el edema se distribuye uniformemente por toda la superficie corneal o es más agudo dependiendo de la zona topográfica de la córnea (apartado 4.1.5), ninguno de los trabajos previos ha tenido en cuenta la asimetría paquimétrica entre las zonas central, nasal y temporal, y su posible variación con el edema inducido por el uso de LC.

En el apartado 4.2.4. se han mostrado los resultados del experimento realizado para un porte a corto plazo de las LC (40 minutos), que encuentran una distribución uniforme del edema entre el centro y la periferia de la córnea. Sin embargo, es necesario conocer si la respuesta de la córnea tras un mayor tiempo de porte de las LC es diferente de la respuesta a corto plazo.

Así, el principal propósito del presente estudio fue el de evaluar la respuesta a la hipoxia provocada por el uso de LCH de alta y baja permeabilidad al oxígeno a medio plazo de porte (una semana en régimen de uso prolongado) en el centro y en la periferia (periferia nasal y temporal en el meridiano horizontal) de la córnea.

Para ello se recogieron los datos paquimétricos centrales y periféricos de los sujetos incluidos en el *"Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en modelo humano"* y se analizaron

siguiendo los criterios de edema y asimetría empleados en el “*Estudio III. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a corto plazo*” (apartado 4.2.3.5).

#### 4.3.2. Hipótesis y objetivos

---

##### 4.3.2.1. Hipótesis

El edema corneal provocado por el porte de lentes de contacto hidrofílicas de alta y baja permeabilidad al oxígeno a medio plazo (régimen prolongado) se distribuye uniformemente desde el centro hacia la periferia en el meridiano horizontal (hacia las zonas nasal y temporal), sin que se modifiquen las proporciones entre los distintos puntos de la topografía corneal.

##### 4.3.2.2. Objetivos

- **Objetivo 5 de la tesis:** Evaluar la distribución topográfica del edema corneal inducido por el uso de LCH de diferente permeabilidad al oxígeno durante un medio plazo de porte, y establecer si el edema se reparte homogéneamente entre centro y periferia o se acentúa más dependiendo de la zona corneal.

#### 4.3.3. Material y métodos

---

El presente estudio se enmarcó dentro de un proyecto de investigación multicéntrica entre la Vision Sciences unit del Department of Life Sciences de la Glasgow Caledonian University y el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid. La

Universidad de Valladolid financió la estancia de la doctoranda en la Glasgow Caledonian University durante 3 meses con la “*Ayuda para Estancias Breves durante el desarrollo de Tesis Doctorales*”.

#### 4.3.3.1. Sujetos

Los sujetos incluidos en el presente trabajo son los mismos que los incluidos en el “*Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en modelo humano*” (apartado 3.3.3.1). Por tanto, los criterios de inclusión, exclusión y criterios para abandonar el estudio son los expuestos en la tabla 3.8.

#### 4.3.3.2. Lentes de contacto

Se utilizaron LC de baja permeabilidad al oxígeno (etafilcon A, Dk = 28, Acuvue 2, Johnson & Johnson, Jacksonville, FL) y LC de alta permeabilidad al oxígeno (lotrafilcon B, Dk = 110, Air Optix Aqua, Ciba Vision, Duluth, GA), que fueron las empleadas en el “*Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en modelo humano*” (apartado 3.3.3.2). Las características de estas LC se muestran en la tabla 3.9.

#### 4.3.3.3. Instrumentación

La medida del espesor corneal se realizó con el topógrafo de cámara dual de Scheimpflug Galilei (Grupo Ziemer, Port, Suiza). El topógrafo Galilei es un instrumento que combina disco de Plácido junto con doble cámara de Scheimpflug (apartado 2.3.7), que rota 180 grados alrededor del eje óptico del ojo. Durante la medida se obtienen imágenes simultáneas con ambos sistemas, que se utilizan para calcular la información de donde derivan los resultados de curvatura, elevación y paquimetría corneal. El proceso de medición completo dura entre 1 y 2 segundos, durante los cuales se toman y analizan hasta

122.000 puntos de la córnea. Además, cuenta con sistema “Eye Tracking” para compensar cualquier ciclotorsión o movimiento del ojo durante la medida. La fiabilidad de la medida de la paquimetría central y periférica de este instrumento ha sido contrastada en numerosos estudios previos a la realización del presente trabajo.<sup>170,175,176</sup>

En cada ocasión la paquimetría corneal se midió tres veces consecutivas en cada ojo, utilizándose la media de las tres medidas como valor final. El mismo explorador realizó siempre las medidas de paquimetría corneal siguiendo las recomendaciones del fabricante y se encargó de recopilar los valores de cada medida en las mismas cinco localizaciones (CCT, N4, N5, T4 y T5) que las recogidas en el “*Estudio III. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a corto plazo*” (figura 4.2).

#### 4.3.3.4. Procedimiento

La recogida de datos se llevó a cabo de manera paralela al desarrollo del “*Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en modelo humano*”, mediante la obtención de los datos de paquimetría corneal en el centro y en la periferia con el topógrafo Galilei.

La paquimetría corneal se midió en dos momentos diferentes (figura 4.3): antes de adaptar las LC (medida basal) y después de portar las LC durante 7 días de manera prolongada (medida final), en las localizaciones corneales de estudio (CCT, N5, N4, T5 y T4). Además, se estudiaron dos grupos de estudio diferentes en función de la LC empleada (alto o bajo Dk) (tabla 4.15).

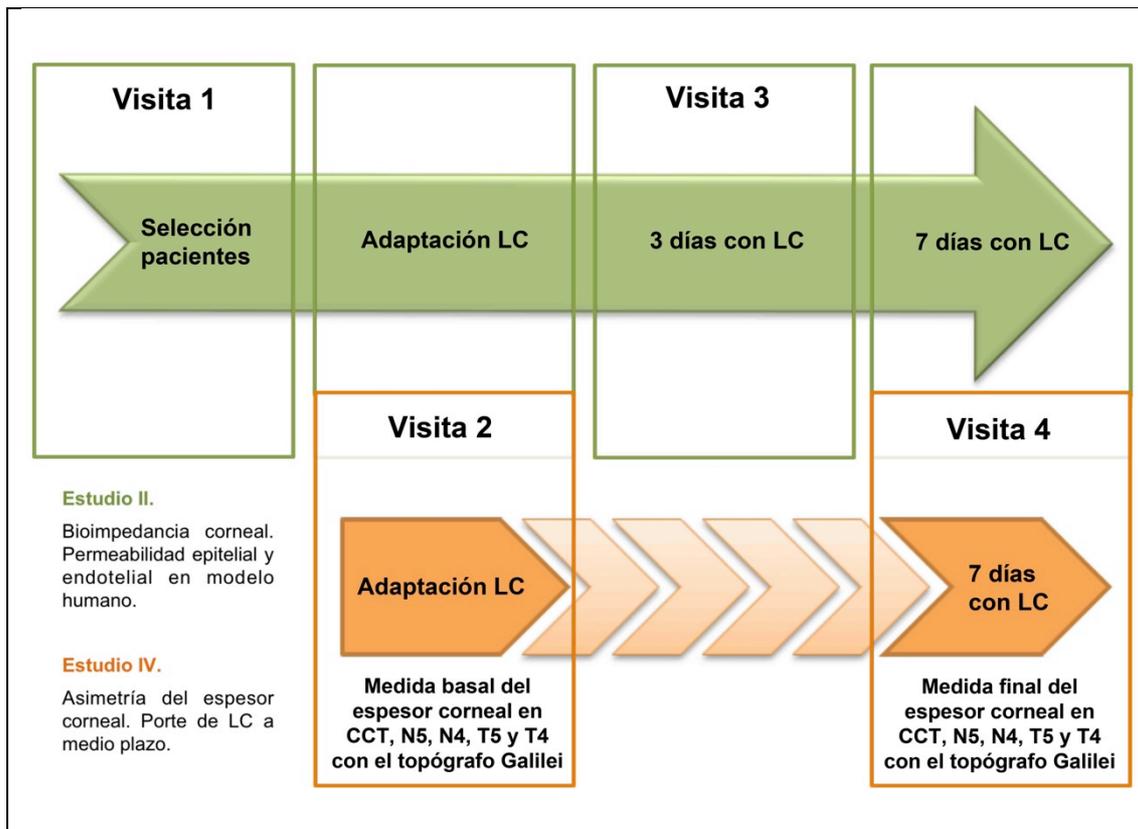


Figura 4.3. Representación esquemática de los momentos de medida del "Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo". Las medidas se obtuvieron en dos momentos diferentes: antes de adaptar las LC (medida basal) y después de 7 días de porte prolongado de las LC (medida final), coincidiendo con las visitas 2 y 4 del "Estudio II. Bioimpedancia corneal. Permeabilidad epitelial y endotelial en modelo humano".

<p><b>Grupo alto-Dk:</b></p> <p>Compuesto por los ojos que llevaron LC de alta permeabilidad al oxígeno</p>
<p><b>Grupo bajo-Dk:</b></p> <p>Compuesto por los ojos que llevaron LC de baja permeabilidad al oxígeno</p>

Tabla 4.15. Grupos del "Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo".

#### 4.3.3.5. Criterios de edema y asimetría

Los criterios de edema y asimetría fueron los mismos que los empleados en el “*Estudio III. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a corto plazo*”, y que se describen en el apartado 4.2.3.5.

#### 4.3.3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA) para Windows. Se generó la estadística descriptiva. Se empleó el test de Saphiro-Wilk para evaluar la normalidad de la distribución de los datos. Se emplearon los siguientes contrastes estadísticos (se tomó un valor de  $P < 0,05$  como diferencia significativa):

- Las diferencias en el espesor corneal en el tiempo se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados entre la medida basal (antes de llevar la LC) y la medida final (7 días con LC) en cada grupo de estudio (alto-Dk y bajo-Dk).
- Las diferencias en el espesor corneal basal entre grupos (alto-Dk y bajo-Dk) se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados para detectar si existían diferencias en el espesor corneal antes del porte de las LC.
- Las diferencias en el grado de edema entre grupos (alto-Dk y bajo-Dk) se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados para detectar si las diferencias eran atribuibles a la hipoxia provocada por el uso de LC.

- Las diferencias en la asimetría (asimetría centro – periferia y asimetría nasal – temporal) en el tiempo se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados entre la medida basal (antes de llevar la LC) y la medida final (7 días con LC) en cada grupo de estudio (alto-Dk y bajo-Dk).
- Las diferencias en la asimetría (asimetría centro – periferia y asimetría nasal – temporal) entre grupos (alto-Dk y bajo-Dk) después de 7 días de porte de las LC se analizaron con la prueba t de Student para datos apareados.
- Las diferencias en el espesor corneal basal entre las medidas obtenidas con el topógrafo Pentacam (Estudio III) y con el topógrafo Galilei (Estudio IV) se analizaron con la prueba t de Student para muestras independientes.
- Las diferencias en la asimetría (asimetría centro – periferia y asimetría nasal – temporal) entre las medidas basales obtenidas con el topógrafo Pentacam (Estudio III) y con el topógrafo Galilei (Estudio IV) se analizaron con la prueba t de Student para muestras independientes.

#### 4.3.3.7. Instalaciones

Todas las medidas se realizaron en el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid.

El análisis estadístico y de los resultados se llevó a cabo en la Vision Sciences unit del Department of Life Sciences de la Glasgow Caledonian University, en Glasgow, Reino Unido.

#### 4.3.4. Resultados

---

##### 4.3.4.1. Muestra

Se incluyeron en el estudio 10 sujetos, seis mujeres y cuatro hombres. El rango de edad varió desde los 20 a los 28 años con un valor medio de  $25 \pm 2,7$  años. El rango de refracción en términos de equivalente esférico fue de entre +0,50 hasta -7,25 D con un valor medio de  $-2,40 \pm 2,67$  D. Cuatro eran usuarios de LC (tres utilizaban LCH y uno RGPLC), que suspendieron su uso al menos una semana antes de comenzar el estudio. Un único sujeto presentó signos de queratopatía punteada superficial (figura 3.8) en el ojo que portó la LC de bajo Dk (grado 1 en la escala Efron para valorar complicaciones de LC).<sup>128,129</sup> Ningún sujeto abandonó el estudio ni por su propia voluntad ni por decisión del investigador.

##### 4.3.4.2. Medida basal del espesor corneal central y periférico y asimetrías corneales

Los datos de paquimetría corneal siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Los valores basales de paquimetría de la muestra para las localizaciones CCT, N4, N5, T4 y T5 se muestran en la tabla 4.16. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el espesor corneal basal entre los grupos alto-Dk y bajo-Dk ( $P > 0,05$  t Student para datos apareados).

<b>Localización</b>	<b>Espesor corneal <math>\pm</math> DS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
N5	749,30 $\pm$ 34,17
N4	685,45 $\pm$ 29,69
CCT	561,65 $\pm$ 28,80
T4	633,62 $\pm$ 26,96
T5	697,73 $\pm$ 28,29

Tabla 4.16. Espesor corneal basal en las cinco localizaciones estudiadas para la muestra total del estudio. DS = desviación estándar.

La asimetría entre el centro de la córnea y la periferia mostró una progresión asimétrica del engrosamiento corneal entre las zonas nasal y temporal. Concretamente, N4 y N5 resultaron ser un 22% y un 33% respectivamente más gruesa que CCT, mientras que T4 y T5 fueron un 12% y un 24% respectivamente más gruesa que CCT (tabla 4.17). Igualmente, la asimetría entre la zona nasal y la zona temporal mostró que el espesor corneal nasal fue un 8% (N4) y un 7% (N5) mayor que el espesor corneal temporal en T4 y T5 respectivamente (tabla 4.17).

Localización	Diferencia absoluta $\pm$ DS ( $\mu\text{m}$ )	IRP $\pm$ DS (%)
N5 – CCT	187,65 $\pm$ 17,04	1,33 $\pm$ 0,03
N4 – CCT	123,80 $\pm$ 10,85	1,22 $\pm$ 0,02
T5 – CCT	136,08 $\pm$ 19,15	1,24 $\pm$ 0,04
T4 – CCT	71,97 $\pm$ 10,62	1,12 $\pm$ 0,02
N5 – T5	51,57 $\pm$ 25,87	1,07 $\pm$ 0,03
N4 – T4	51,82 $\pm$ 16,12	1,08 $\pm$ 0,02

Tabla 4.17. Diferencias absolutas ( $\mu\text{m}$ ) e IRP (%) entre el espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5). DS = desviación estándar.

#### 4.3.4.3. Diferencias en la paquimetría y edema en el espesor corneal central y periférico

Los datos de paquimetría y edema corneal siguieron una distribución normal según el test de Saphiro-Wilk.

Después de 7 días de uso de las LC de manera prolongada, se encontró un grosor corneal significativamente superior ( $P < 0,05$  t Student para datos apareados) en el grupo de ojos que portó la LC de bajo Dk para todas las localizaciones estudiadas excepto en el caso de T5 (tabla 4.18). El grupo de ojos que portó la LC de alto Dk no presentó diferencias significativas ( $P > 0,05$  t Student para datos apareados) después de una semana de uso prolongado de las LC en ninguna de las localizaciones estudiadas (tabla 4.19).

<b>Paquimetría Grupo bajo-Dk <math>\pm</math> DS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>7 días</b>	<b>P*</b>
N5	747,85 $\pm$ 29,29	768,94 $\pm$ 30,45	0,019
N4	684,75 $\pm$ 27,08	710,40 $\pm$ 31,74	0,001
CCT	562,80 $\pm$ 26,89	584,25 $\pm$ 40,44	0,011
T4	635,30 $\pm$ 24,73	652,80 $\pm$ 32,83	0,010
T5	700,90 $\pm$ 25,72	708,94 $\pm$ 29,49	0,099

Tabla 4.18. Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de baja permeabilidad al oxígeno (grupo bajo-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

<b>Paquimetría Grupo alto-Dk <math>\pm</math> DS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>7 días</b>	<b>P*</b>
N5	750,75 $\pm$ 40,03	765,72 $\pm$ 35,37	0,079
N4	686,15 $\pm$ 33,57	689,40 $\pm$ 37,38	0,522
CCT	560,50 $\pm$ 32,03	560,35 $\pm$ 37,78	0,977
T4	631,95 $\pm$ 30,28	636,25 $\pm$ 36,39	0,344
T5	694,55 $\pm$ 31,70	696,17 $\pm$ 35,73	0,686

Tabla 4.19. Espesor corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) del grupo de ojos que portó LC de alta permeabilidad al oxígeno (grupo alto-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

Las LC de bajo Dk indujeron un grado de edema corneal significativamente mayor ( $P < 0,05$  t Student para datos apareados) después de 7 días de porte prolongado de las LC frente al grupo que llevó LC de alto Dk, en todas las localizaciones estudiadas (CCT, N4, T4 y T5) excepto en N5 (tabla 4.20).

Localización	Grupo alto-Dk	Grupo bajo-Dk	P*
N5	2,05 ± 2,99	2,84 ± 2,91	0,577
N4	0,47 ± 2,23	3,75 ± 2,48	<0,01
CCT	-0,05 ± 2,77	3,75 ± 3,67	<0,01
T4	0,65 ± 2,12	2,74 ± 2,62	<0,01
T5	0,49 ± 3,19	1,47 ± 2,33	<0,01

Tabla 4.20. Edema corneal central (CCT), periférico nasal (N4 y N5) y periférico temporal (T4 y T5) de los dos grupos de ojos (grupo alto-Dk y grupo bajo-Dk) después de 7 días de porte prolongado de las LC. DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

#### 4.3.4.4. Diferencias en la asimetría centro - periferia y en la asimetría nasal – temporal

Después de 7 días de porte prolongado de las LC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$  t Student para datos apareados) en la asimetría central y periféricas en ninguno de los grupos de estudio: alto-Dk (tabla 4.21) y bajo-Dk (tabla 4.22).

<b>IRP Grupo alto-Dk <math>\pm</math> DS (%)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>7 días</b>	<b>P*</b>
N5 / CCT	1,34 $\pm$ 0,03	1,36 $\pm$ 0,04	0,149
N4 / CCT	1,22 $\pm$ 0,02	1,23 $\pm$ 0,03	0,624
T5 / CCT	1,24 $\pm$ 0,03	1,24 $\pm$ 0,03	0,833
T4 / CCT	1,12 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,03	0,529
N5 / T5	1,09 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,03	0,235
N4 / T4	1,08 $\pm$ 0,02	1,08 $\pm$ 0,03	0,911

Tabla 4.21. IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de alta permeabilidad al oxígeno (grupo alto-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

<b>IRP Grupo bajo-Dk <math>\pm</math> DS (%)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Basal</b>	<b>7 días</b>	<b>P*</b>
N5 / CCT	1,32 $\pm$ 0,03	1,31 $\pm$ 0,05	0,334
N4 / CCT	1,21 $\pm$ 0,02	1,21 $\pm$ 0,03	0,962
T5 / CCT	1,24 $\pm$ 0,04	1,20 $\pm$ 0,04	0,085
T4 / CCT	1,13 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,03	0,412
N5 / T5	1,07 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,04	0,378
N4 / T4	1,08 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,02	0,380

Tabla 4.22. IRP entre las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) del grupo de ojos que portó LC de baja permeabilidad al oxígeno (grupo bajo-Dk). DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

La asimetría centro – periferia así como la asimetría nasal - temporal se ha mantenido estable después de 7 días de porte prolongado de las LC, de tal manera que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$  t Student para datos apareados) entre los valores de los grupos alto-Dk y bajo-Dk. La única diferencia se ha encontrado en N5, que mostró un engrosamiento relativo significativamente superior en el caso de las LC de alto Dk frente a las LC de bajo Dk (tabla 4.23).

IRP ± DS (%)			
Localización	Grupo alto-Dk	Grupo bajo-Dk	P*
N5 / CCT	1,36 ± 0,04	1,31 ± 0,05	0,041
N4 / CCT	1,23 ± 0,03	1,21 ± 0,03	0,402
T5 / CCT	1,24 ± 0,03	1,20 ± 0,04	0,170
T4 / CCT	1,13 ± 0,03	1,12 ± 0,03	0,251
N5 / T5	1,10 ± 0,03	1,08 ± 0,04	0,420
N4 / T4	1,08 ± 0,03	1,09 ± 0,02	0,770

Tabla 4.23. IRP de las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) de los dos grupos de ojos (grupo alto-Dk y grupo bajo-Dk) después de 7 días de porte prolongado de las LC. DS = desviación estándar. \*Test t Student para datos apareados.

#### 4.3.4.5. Comparación Pentacam Vs Galilei

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las medidas basales del CCT comparando los valores obtenidos con el topógrafo Pentacam (Estudio III) y con el topógrafo Galilei (Estudio IV). Sin embargo, el resto de localizaciones estudiadas, correspondientes a las medidas del espesor periférico (N5, N4, T5 y T4), han mostrado ser significativamente diferentes dependiendo del equipo de medida utilizado (tabla 4.24).

<b>Diferencias en las medidas basales <math>\pm</math> DS (<math>\mu\text{m}</math>)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Pentacam</b>	<b>Galilei</b>	<b>P*</b>
N5	832,61 $\pm$ 39,71	749,30 $\pm$ 34,17	<0,001
N4	736,18 $\pm$ 36,186	685,45 $\pm$ 29,69	<0,001
CCT	566,45 $\pm$ 28,71	561,65 $\pm$ 28,80	0,546
T4	686,55 $\pm$ 26,49	633,62 $\pm$ 26,96	<0,001
T5	786,51 $\pm$ 34,17	697,73 $\pm$ 28,29	<0,001

Tabla 4.24. Diferencias de las medidas basales obtenidas con el topógrafo Pentacam (Estudio III) y con el topógrafo Galilei (Estudio IV), en todas las localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4). DS = desviación estándar. \*Test t Student para muestras independientes.

Los resultados del IRP entre el centro corneal y la periferia también han mostrado diferencias estadísticamente significativas según el equipo de medida. El IRP entre la periferia nasal y la periferia temporal de la córnea no han mostrado diferencias estadísticamente significativas en función del equipo de medida (tabla 4.25).

<b>Diferencias en las medidas basales ± DS (%)</b>			
<b>Localización</b>	<b>Pentacam</b>	<b>Galilei</b>	<b>P*</b>
N5 / CCT	1.47 ± 0,06	1,33 ± 0,03	<0,001
N4 / CCT	1.30 ± 0,03	1,22 ± 0,02	<0,001
T5 / CCT	1.39 ± 0,07	1,24 ± 0,04	<0,001
T4 / CCT	1.21 ± 0,03	1,12 ± 0,02	<0,001
N5 / T5	1,06 ± 0,04	1,07 ± 0,03	0,152
N4 / T4	1,07 ± 0,03	1,08 ± 0,02	0,186

Tabla 4.25. Diferencias de las medidas basales obtenidas con el topógrafo Pentacam (Estudio III) y con el topógrafo Galilei (Estudio IV), en todas las relaciones estudiadas entre el centro y la periferia (N5/CCT, N4/CCT, T5/CCT, T4/CCT) y la periferia nasal y temporal (N5/T5, N4/T4). DS = desviación estándar. \*Test t Student para muestras independientes.

#### 4.3.5. Discusión

---

En la sección 4.2 se planteó un estudio que evaluara las diferencias en el edema corneal provocado por la hipoxia producida por el porte de LC de alto y bajo Dk durante un corto plazo de 40 minutos entre el centro y la periferia (eje horizontal) de la córnea. Los resultados de ese trabajo sugieren una distribución uniforme del edema corneal por toda la topografía estudiada. Sin embargo, una de las principales limitaciones del estudio fue precisamente el corto periodo de porte de las LC, que si bien ayuda a dilucidar los mecanismos de la respuesta corneal a la hipoxia durante los primeros momentos de la privación del oxígeno, no se asemeja a las condiciones habituales en las que un usuario portaría sus LC.

De esta manera, se planteó la realización de un trabajo igualmente estructurado, variando el régimen de porte de las LC con el objetivo de inducir un mayor grado de edema. En el presente trabajo (Estudio IV), se evaluó por tanto el edema y los cambios en las proporciones N5 / CCT, N4 / CCT, T5 / CCT, T4 / CCT, N5 / T5, N4 / T4 tras un porte de LC prolongado durante una semana (sin retirar las lentes durante el sueño).

Los resultados muestran que estas proporciones se han mantenido estables después de 7 días de porte prolongado de cualquiera de las dos LC (alto y bajo Dk) (tablas 4.21 y 4.22). Estos resultados coinciden con los encontrados en el Estudio III (40 minutos de porte), sugiriendo que la hipoxia inducida por el uso de LC a medio plazo (una semana) afectaría por igual al centro y periferia (eje horizontal) de la córnea.

Ambas LC (alto y bajo Dk) han mostrado la misma tendencia a inducir un engrosamiento uniforme en todas las zonas estudiadas, aunque se ha visto que las LC de bajo Dk provocan un edema significativamente superior en todas las localizaciones corneales excepto en N5, donde el edema no fue estadísticamente diferente entre las LC de alto y bajo Dk. Estas diferencias entre LC de alto y bajo Dk se atribuyen a la diferente permeabilidad al oxígeno del material de cada una de ellas. La explicación sobre cómo afecta la permeabilidad del material de la LC a la córnea se ha detallado en el apartado 2.4.1, así como los mecanismos fisiológicos de respuesta corneal que provocan el edema secundario al porte de LC (apartado 2.4.2). Además, el grupo de ojos que portó LC de bajo Dk mostró un edema significativamente mayor después de los 7 días de porte prolongado.

Estos resultados coinciden con los trabajos publicados por Sanders,<sup>168</sup> (que monitorizó el edema inducido por LCHC durante 6 semanas de porte), Lowther<sup>169</sup> (edema inducido por LCHC durante 6 meses de porte), y Martín<sup>1</sup> (edema inducido por LCHC y LCHSi durante 1 semana de porte). Estos tres estudios concluyen que el edema es similar en el centro y en la periferia de la córnea, es decir, que se reparte uniformemente por la topografía corneal.

Por el contrario, los estudios de Bonanno<sup>38,161</sup> mostraron un edema mayor en el centro corneal en LCHC tras 2, 4, 6 y 12 semanas de porte de las lentes. Las posibles explicaciones del autor para este hallazgo fueron el hecho de que la periferia recibe oxígeno de los vasos del limbo corneal, por lo que la hipoxia sufrida en la periferia corneal será menor que la de la zona central (y por tanto el edema periférico será igualmente menor). Otra posible causa son las diferencias anatómicas en la zona de unión entre la córnea y la esclera como causa de la menor edematización periférica, o quizá la mayor densidad de células endoteliales en la periferia corneal.

La única referencia encontrada en la literatura que describa un mayor edema en la periferia que en el centro corneal es el trabajo publicado por Kaluzny<sup>165</sup> quien monitorizó el edema provocado por LCHC (etafilcon A) tras 2, 4 y 6 semanas de uso. Su autor justifica este hallazgo porque en su estudio todas las LC empleadas fueron de potencia negativa, presentando un menor Dk/t en la zona periférica que en la zona central, lo que supondría un menor paso de oxígeno a las zonas más alejadas del centro corneal.

De cualquier manera, el bajo número de participantes de nuestro estudio indica tomar los resultados obtenidos con cautela, lo que se hace extensible a las conclusiones que se puedan alcanzar.

#### 4.3.5.1. Comparación Pentacam Vs Galilei

En el “*Estudio III. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a corto plazo*” se ha estudiado la respuesta corneal a la hipoxia inducida por LCH de diferente Dk durante 40 minutos de porte, evaluando la paquimetría corneal obtenida con el topógrafo de Scheimpflug Pentacam. En el “*Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo*” se ha estudiado la respuesta corneal a la hipoxia inducida por LCH de diferente Dk durante 7 días de porte, evaluando la paquimetría corneal obtenida con el topógrafo de cámara dual de Scheimpflug Galilei.

Comparando los valores de paquimetría basal obtenidos con los equipos Pentacam y Galilei en las distintas localizaciones estudiadas (CCT, N5, N4, T5 y T4) se han detectado diferencias estadísticamente significativas en todas las localizaciones periféricas (N5, N4, T5 y T4), lo que sugiere que las medidas de ambos equipos no son comparables o intercambiables para la periferia corneal. Sin embargo, la medida obtenida en el centro de la córnea (CCT), no ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre los

valores de ambos equipos. Las diferencias encontradas entre las medidas del espesor corneal en N5, N4, T5 y T4 obtenidas con el Pentacam y con el Galilei en el presente trabajo explicarían las diferencias significativas en las proporciones N5 / CCT, N4 / CCT, T5 / CCT, T4 / CCT entre ambos equipos.

Trabajos previos<sup>177-180</sup> han encontrado resultados similares, con buen acuerdo en las medidas del CCT y desacuerdo en las medidas de la paquimetría periférica entre distintos equipos.

Huang<sup>177</sup> estudió el acuerdo de las medidas en el centro y en la periferia de la córnea (1 y 2,5 mm hacia nasal, temporal, superior e inferior) obtenidas mediante topografía de Scheimpflug (Pentacam) y tomografía de coherencia óptica (Visante), concluyendo que ambos aparatos son intercambiables para las medidas del CCT; no así para las medidas del espesor periférico.

En la misma línea, Milla<sup>178</sup> evaluó el acuerdo de las medidas en el centro y en la periferia de la córnea (2,5 y 4 mm hacia nasal, temporal, superior e inferior) obtenidas mediante topografía de Scheimpflug (Sirius) y tomografía de coherencia óptica (Visante), encontrando diferencias significativamente estadísticas en todas las localizaciones (incluyendo CCT) excepto en la localización temporal a 2,5 mm del centro. Su contribución más interesante es que el rango de las diferencias entre ambos equipos no fue constante a lo largo de la topografía corneal, sino que iba en aumento según se alejaba del centro de la córnea, es decir, que cuanto más periféricas son las medidas del espesor corneal más diferían.

Bourges<sup>179</sup> estudió el acuerdo de las medidas en el centro y en la periferia de la córnea (3 mm hacia nasal superior, nasal, nasal inferior, inferior, temporal inferior, temporal, temporal superior, superior) obtenidas mediante topografía de Scheimpflug (Pentacam) y topografía de elevación (Orbscan II). El autor concluye que las medidas del CCT entre ambos equipos son intercambiables, mientras que las medidas obtenidas en la periferia no lo son.

De la misma manera, Jonuscheit<sup>180</sup> evaluó el acuerdo de las medidas en el centro y en la periferia de la córnea (3 mm hacia nasal y temporal) obtenidas mediante topografía de elevación (Orbscan II) y microscopía especular (SP-2000P), concluyendo que estos equipos no son intercambiables para medidas fuera del centro corneal.

Otros trabajos, sin llegar a encontrar diferencias estadísticamente significativas o desacuerdo en las medidas del espesor corneal periférico entre distintos equipos, sí que han reportado una clara tendencia por la que, como en el caso de Milla, las diferencias entre los equipos aumentan según los puntos de medida se alejan del centro de la córnea,<sup>181-183</sup> o la repetibilidad de las medidas en la periferia corneal es peor que en el CCT.<sup>184,185</sup>

Estos hallazgos sugieren que la precisión de los distintos equipos para obtener las medidas de la paquimetría corneal periférica es incierta, lo que pone de manifiesto el desconocimiento del verdadero espesor corneal más allá del área central. Varios autores han barajado distintas opciones como posibles razones que explicarían estas diferencias entre distintas tecnologías.

Khoramnia<sup>140</sup> postula que, en el caso de la topografía de cámara dual de Scheimpflug (Galilei), la superposición de imágenes en el centro de la

córnea es mayor que en la periferia debido a la rotación de la cámara alrededor del eje óptico, por lo que el número de puntos capturados por la cámara para la misma ubicación disminuye considerablemente de la córnea central a la periférica. Shankar<sup>186</sup> atribuye el uso de puntos de referencia inestables (como el centro de la pupila en lugar del ápex corneal) a la posible falta de acuerdo entre distintos dispositivos y baja repetibilidad de las medidas. Los trabajos de Marsich<sup>187</sup> y Huang<sup>170</sup> señalan que la exploración en el caso del meridiano vertical puede verse parcialmente afectada al estar más sujeto a los artefactos derivados de los párpados (que pueden cubrir partes de la periferia corneal superior e inferior).

#### 4.3.5.2. Puntos fuertes y limitaciones

En primer lugar, este estudio presenta un importante avance con respecto del anterior trabajo en el que se estudió la respuesta a la hipoxia inducida por el uso de LC durante 40 minutos en distintos puntos de la topografía corneal, ya que no se ha limitado a la evaluación de la respuesta inmediata de la córnea a la hipoxia sino que se han obtenido las medidas de la paquimetría corneal pasados 7 días de porte prolongado de las lentes, induciendo un mayor edema corneal. Es necesario realizar estudios en usuarios de larga duración y regímenes de uso diferentes para comprobar cómo evoluciona la respuesta corneal al porte de LC en las distintas zonas de la topografía corneal después de años de uso de LC, así como estudiar si la morfología del tejido corneal sigue manteniendo sus proporciones entre el centro y la periferia nasal y temporal o se producen cambios diferentes.

Al igual que en el Estudio III, este trabajo ha analizado la respuesta corneal no sólo en el centro de la córnea sino también en otros cuatro puntos concretos del meridiano horizontal corneal, (4 y 5 mm del ápex de la córnea hacia nasal y temporal), sin embargo las herramientas disponibles en la actualidad facilitan la información de cualquier punto deseado de la superficie

de la córnea, por lo que podría realizarse un estudio más exhaustivo del edema no sólo en 4 puntos de la periferia del meridiano horizontal sino incluyendo prácticamente el mapa completo de la córnea. Si bien la medida en el meridiano vertical presenta el inconveniente de verse afectada por los párpados, que pueden cubrir partes de la periferia corneal superior e inferior como se ha mencionado anteriormente.

Además, la metodología empleada para llevar a cabo el presente estudio difiere del resto de trabajos encontrados en la literatura, lo que supone un nuevo enfoque. En la mayoría de los trabajos realizados previamente, para conocer si la respuesta es igual en el centro que en la periferia se calcula el porcentaje de variación en el espesor corneal antes y después del porte de las LC, y se compara por zonas para establecer posibles diferencias. Otra posible manera de determinar estas diferencias es la propuesta en el presente trabajo que además de establecer las diferencias según la comparación de los edemas en cada zona, se ha determinado la variación en la proporción entre los distintos puntos estudiados, obteniendo así de forma sencilla un índice que determina de manera directa cómo de grande es esa variación en el espesor corneal.

Otra importante limitación de este trabajo es el pequeño tamaño de la muestra de estudio, que hace que el trabajo tenga una potencia estadística limitada y en consecuencia, las estimaciones sean menos generalizables. En el momento del diseño del estudio se contó con este limitado número de sujetos; al ser un trabajo enmarcado dentro del Estudio II, que fue una primera prueba de concepto donde se consideró un bajo número de sujetos para llevar a cabo el estudio de seguridad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal, cumpliendo con los requisitos legales y recomendaciones del comité ético que aprobó el protocolo.

Por último, el diseño contralateral del estudio, en el que cada sujeto portó LC en ambos ojos, también es un aspecto controvertido, ya que se ha descrito un posible efecto simpático de un ojo sobre otro en el edema corneal inducido por el uso de LC.<sup>188,189</sup>

#### 4.3.5.3. Conclusiones

En conclusión el edema corneal inducido por el uso de LC de alta (Lotrafilcon B –  $Dk = 110$ ) y baja (Etafilcon A –  $Dk = 28$ ) permeabilidad al oxígeno durante 7 días de porte prolongado presenta la misma tendencia a repartirse uniformemente entre el centro y el meridiano horizontal de la córnea, por lo que la asimetría entre las zonas nasal y temporal y éstas con el centro de la córnea no sufren variaciones significativas.

Los datos han mostrado que después de 7 días de porte prolongado, las LC de bajo  $Dk$  inducen un edema significativamente mayor que las de alto  $Dk$  en todos los puntos estudiados excepto en N5. Esta diferencia puede ser analizada en futuros trabajos.

A pesar de que el porte de las LC de bajo  $Dk$  indujo un aumento significativo del espesor corneal en CCT, N5, N4 y T4 después de 7 días de uso, las asimetrías estudiadas permanecen estables después del porte de las lentes, lo que sugiere un reparto uniforme del edema corneal.



# 5

## SÍNTESIS FINAL



## 5.1. Síntesis final

# RESUMEN GLOBAL

Las tecnologías disponibles para el estudio de la morfología de la córnea en la actualidad hacen que el proceso de evaluación corneal sea extremadamente completo además de rápido y sencillo. Sin embargo, a pesar de los importantes avances que se han producido en las últimas décadas, la carencia de herramientas para obtener una completa comprensión de la fisiología corneal es evidente.

La evaluación de la córnea con lámpara de hendidura se practica desde que Gullstrand la presentara en 1911, hace más de 100 años. Con ella se puede explorar la anatomía corneal e identificar signos clínicos necesarios para el diagnóstico de patologías o alteraciones corneales, una vez éstas se producen en la morfología del tejido como consecuencia de diferentes procesos fisiopatológicos dependiendo del caso.

En estos 100 años, se ha pasado de valorar el estado y salud general de la córnea a obtener medidas *in vivo* no invasivas de la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal, y es obvio que la tecnología continuará avanzando y desarrollando nuevos y mejores dispositivos que seguirán facilitando el examen de la córnea, proporcionando datos e

información que todavía hoy no es fácil imaginar. El final de la meta ha sido, es y será proporcionar la mejor atención a los pacientes en la práctica clínica.

Esta tesis doctoral ha querido contribuir con los avances que se están produciendo en el campo de estudio de la respuesta corneal al porte de LC, planteando un proyecto que incluyera la evaluación tanto de la respuesta fisiológica (permeabilidad del epitelio y del endotelio) como de la respuesta mecánica (cambios en el espesor) de la córnea secundarios al porte de LCH.

En el caso de la respuesta fisiológica, se evaluó en primer lugar la capacidad de la técnica de medida de la bioimpedancia corneal en un modelo animal de edema corneal inducido por el uso de LCH. Los resultados, aunque controvertidos, parecen ser biológicamente plausibles y, sobre todo, demuestran que el equipo de medida de la bioimpedancia corneal es sensible y capaz de detectar cambios inducidos por la hipoxia secundaria al uso de LCH, sin provocar lesiones ni efectos secundarios sobre el tejido corneal.

En segundo lugar, se evaluó la seguridad y capacidad de esta herramienta para estudiar *in vivo* y de manera no invasiva la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal humanos. Para ello se diseñó un estudio en el que se monitorizó la medida de la bioimpedancia epitelial y endotelial en un grupo de voluntarios que portaron LCH de diferente Dk. En resumen, aunque los resultados obtenidos no muestran cambios estadísticamente significativos en la permeabilidad de ninguna de las dos capas corneales, [que puede explicarse ya que ambas LC están aprobadas por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) para su uso prolongado (etafilcon A, hasta 7 días) y continuado (lotrafilcon B, hasta 30 días)]; los resultados pueden ayudar a identificar y explicar el adelgazamiento epitelial asociado al uso de LCH, que precisa ser aclarado con nuevas investigaciones.

El estudio de la respuesta mecánica de la córnea a la hipoxia inducida por el uso de LCH ha evaluado la distribución del edema corneal en cinco localizaciones de su topografía (CCT, N4, N5, T4 y T5), con el propósito de esclarecer si el edema secundario al porte de LCH se reparte homogéneamente entre centro y periferia corneal o por el contrario una de estas zonas presenta mayor edema.

Para ello, se analizó la respuesta corneal después de 40 minutos (respuesta a corto plazo) y de 7 días (respuesta a medio plazo) de porte de las lentes. Los resultados muestran un reparto uniforme del edema, tanto a corto como a medio plazo de uso de LC. Estos resultados pueden ayudar a dilucidar la polémica en torno a esta cuestión, que parece no tener una teoría ampliamente aceptada, sino que se defienden varias hipótesis.

En definitiva, esta tesis ha demostrado que es posible aplicar la medida de la bioimpedancia corneal para la evaluación del estado de la función barrera del epitelio y del endotelio corneal en humanos *in vivo* de manera segura y no invasiva y; además, que el edema inducido por el porte a corto y medio plazo de LCH se reparte uniformemente entre el centro y la periferia de la córnea a lo largo del meridiano horizontal.

Sin embargo, son necesarios mayores esfuerzos para mejorar el prototipo de medida de la bioimpedancia corneal utilizado en esta tesis, de tal manera que se aumente su precisión, sensibilidad y eficacia, así como disminuyendo el tiempo de exploración y uso de anestésico tópico, con el fin de implementar su uso clínico y desarrollar nuevas tecnologías que mejoren la existente y ayuden a dilucidar los cambios en la fisiología y biomecánica corneal secundarios a la hipoxia inducida por el uso de LCH, lo que facilitará la

toma de decisiones clínicas y mejorará la metodología y los conocimientos sobre la interacción entre córnea y LC.

## 5.1. Síntesis final

# RELEVANCIA CLÍNICA y perspectivas de futuro

Este trabajo ha continuado con una línea de investigación basada en avanzar en el conocimiento de la respuesta corneal al uso de LC, los mecanismos que provocan el edema corneal y la apreciación de los cambios no sólo en la morfología sino también en la fisiología de la córnea, contribuyendo al entendimiento de la interacción entre córnea y LC y a la definición de pautas y protocolos que permitan un uso más seguro de las mismas.

Los resultados obtenidos han demostrado que es posible detectar y monitorizar de forma no invasiva los cambios secundarios al porte de LCH producidos en la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal en humanos *in vivo* aplicando nuevas herramientas de medida de la bioimpedancia corneal.

La transferencia de esta técnica de medida a la práctica clínica supondría en primer lugar aportar un nuevo método de evaluación de la permeabilidad corneal en humanos *in vivo*. Actualmente, la única herramienta existente para la evaluación objetiva de este parámetro es la fluorofotometría, por lo que la implementación de la técnica de bioimpedancia no sólo aportaría un nuevo equipo de exploración de la córnea a la comunidad clínica y científica,

sino que simplificaría el método de exploración y optimizaría los resultados obtenidos con la fluorofotometría.

La medida de la bioimpedancia corneal podría aplicarse en numerosas situaciones de la práctica clínica de la optometría, contactología y oftalmología, entre ellos:

- Detección de alteraciones en la fisiología del epitelio corneal en usuarios de LC o personas con el síndrome de ojo seco antes de que sean apreciables macroscópicamente mediante la evaluación con lámpara de hendidura y/o fluoresceína.
- Detección y monitorización de los procesos de cicatrización del epitelio corneal, secundarios a abrasiones, incisiones o heridas de distinta etiología.
- Evaluación de la seguridad y eficacia de los líquidos de mantenimiento de las LC.
- Detección de alteraciones en la fisiología del endotelio corneal en usuarios de LC antes de que se produzcan cambios no aceptables en la morfología corneal.
- Detección y monitorización de las distrofias del endotelio corneal, o afecciones que cursen con afección del endotelio y edema corneal.
- Evaluación de la seguridad y eficacia de fármacos de administración por vía tópica (afección del epitelio) y vía intracameral (afección del endotelio).
- Evaluación de la idoneidad de córneas donantes y de los protocolos de mantenimiento de las mismas.

En la actualidad, se está trabajando en la mejora del equipo de medida de la bioimpedancia, disminuyendo los tiempos de medida y aumentando la consistencia de los resultados. La siguiente versión del prototipo dará lugar a nuevos estudios de validación de la técnica y valoración final de su potencial industrial y comercialización.

Los resultados encontrados en cuanto a la permeabilidad del epitelio y del endotelio en humanos, ¿pueden ser diferentes en usuarios de LC de larga duración?, ¿y en función del grado de edema inducido o del diseño de la LC? ¿Por qué la permeabilidad epitelial tiende a disminuir tras un corto o medio plazo de porte de LCH? ¿Es posible corroborar la teoría presentada en esta tesis? ¿Es comparable el comportamiento del epitelio y del endotelio corneal entre conejos y humanos, teniendo en cuenta que es uno de los modelos animales más empleados en trabajos de investigación tanto de captación de fármacos como de edema corneal producido por el uso de LC?

También este trabajo de tesis ha demostrado que es posible evaluar la distribución del edema corneal secundario al porte de LCH mediante el estudio del ratio de progresión del espesor corneal entre en distintos puntos de su topografía, contribuyendo, en la medida de lo posible, a dilucidar los mecanismos que inducen el edema corneal. De esta manera, se ha continuado con la línea de investigación que quedó abierta con la tesis del Dr. Raúl Martín Herranz; planteando nuevas preguntas que habrán de ser respondidas con futuros trabajos.

La tendencia encontrada a la distribución homogénea del edema corneal entre el centro y la periferia de la córnea a lo largo del meridiano horizontal, ¿es diferente en usuarios de LC de larga duración? ¿y en función del grado de edema inducido? ¿Qué sucede en el caso de usuarios de LC de

diferentes diseños? ¿Coincidirán estos resultados en el caso de estudiar el meridiano vertical, u otros puntos de la topografía corneal? ¿Y si se cambia de punto de referencia de análisis, y en lugar de escoger el centro geométrico de la córnea se utiliza, por ejemplo, el ápex corneal?

## 5.1. Síntesis final

# CONCLUSIONES

1. La técnica de medida de la bioimpedancia corneal es capaz de detectar cambios en la permeabilidad del epitelio corneal de conejos de raza Blanco de Nueva Zelanda inducidos por la hipoxia secundaria al porte de lentes de contacto hidrofílicas.
2. La técnica de medida de la bioimpedancia corneal es segura para su uso en la práctica clínica como técnica de evaluación de la permeabilidad epitelial y endotelial de manera no invasiva en córneas humanas in vivo.
3. La técnica de medida de la bioimpedancia corneal es capaz de detectar cambios en la permeabilidad del epitelio y del endotelio corneal humano inducidos por el porte de lentes de contacto hidrofílicas de diferente permeabilidad al oxígeno.
4. El edema corneal inducido por el uso de lentes de contacto hidrofílicas de diferente permeabilidad al oxígeno durante un corto plazo de tiempo (40 minutos) se distribuye uniformemente entre el centro y la periferia de la córnea (meridiano horizontal).

- 5.** El edema corneal inducido por el uso de lentes de contacto hidrofílicas de diferente permeabilidad al oxígeno durante un medio plazo de tiempo (7 días) se distribuye uniformemente entre el centro y la periferia de la córnea (meridiano horizontal).

# BIBLIOGRAFÍA

1. Martin R, de Juan V, Rodriguez G, et al. Contact lens-induced corneal peripheral swelling differences with extended wear. *Cornea*. 2008; 27:976–9
2. Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye* 2003;17:912–8
3. Jones RF, Maurice DM. New methods of measuring the rate of aqueous flow in man with fluorescein. *Exp Eye Res*. 1966; 5:208–20
4. Holt M, Cogan DG. The cornea; permeability of the excised cornea to ions, as determined by measurements of impedance. *Arch Ophthalmol*. 1946; 35:292–8
5. NHMRC. A guide to the development, implementation and evaluation of clinical practice guidelines. Endorsed November 1998, Canberra, Commonwealth of Australia. 1999
6. Courville CB, Smolek MK, Klyce SD. Contribution of the ocular surface to visual optics. *Exp Eye Res*. 2004; 78:417–25
7. Knupp C, Pinali C, Lewis PN, et al. The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2009; 78:25–49
8. 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
9. Efron N. Contact lens complications. 3rd Edition. Elsevier Saunders. 2012
10. Beebe DC, Masters BR. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37:1815–25
11. Hanna C, Bicknell DS, O'Brien JE. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol*. 1961; 65:695–8
12. Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, et al. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 2001; 20:639–73
13. Holden BA, Sweeney DF, Vannas A, et al. Effects of long-term extended contact lens wear on the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1985; 26:1489–501
14. Kaido M, Matsumoto Y, Shigeno Y, et al. Corneal fluorescein staining correlates with visual function in dry eye patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52:9516–22
15. Germundsson J, Karanis G, Fagerholm P, et al. Age-related thinning of Bowman's layer in the human cornea in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54:6143–9
16. Kobosova A, Azar DT, Bannikov GA, et al. Compositional differences between infant and adult human corneal basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48:4989–99

17. Lagali N, Germundsson J, Fagerholm P. The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:4192–8
18. Wilson SE, Hong J-W. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea.* 2000; 19:417–20
19. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res.* 2010; 91:326–35
20. Qazi Y, Wong G, Monson B, et al. Corneal transparency: genesis, maintenance and dysfunction. *Brain Res Bull.* 2010; 81:198–210
21. Srinivas SP. Cell signaling in regulation of the barrier integrity of the corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2012; 95:8–15
22. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003; 22:359–89
23. Leuenberger PM. Functional morphology of the cornea. *Adv Ophthalmol.* 1978; 35:94–166
24. Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2012; 95:16–23
25. Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, et al. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res.* 1985; 4:671–8
26. Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, et al. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1985; 26:443–9
27. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:1754–67
28. Srinivas SP. Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom Vis Sci.* 2010; 87:239–54
29. Sawada N. Tight junction-related human diseases. *Pathol Int.* 2013; 63:1–12
30. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007; 127:2525–32
31. Wang Y, Chen M, Wolosin JM. ZO-1 in corneal epithelium; strata distribution and synthesis induction by outer cell removal. *Exp Eye Res.* 1993; 57:283–92
32. Ormerod LD, Smith RE. Contact lens-associated microbial keratitis. *Arch Ophthalmol.* 1986; 104:79–83
33. Cavet ME, Harrington KL, VanDerMeid KR, et al. In vitro biocompatibility assessment of multipurpose contact lens solutions: effects on human corneal epithelial viability and barrier function. *Cont Lens Anterior Eye.* 2012; 35:163–70
34. Hutcheon AE, Sippel KC, Zieske JD. Examination of the restoration of epithelial barrier function following superficial keratectomy. *Exp Eye Res.* 2007; 84:32–8
35. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res.* 2012; 95:2–7
36. Noske W, Fromm B, Levarlet KM, et al. Tight junctions of the human corneal endothelium: morphological and

- electrophysiological features. *Ger J Ophthalmol.* 1994; 3:253–7
37. Blix M. Oftalmometriska studier. Upsala Läkareförenings Förhandlingar. 1880; 15:349–420
38. Bonanno JA, Polse KA. Central and peripheral corneal swelling accompanying soft lens extended wear. *Am J Optom Physiol Opt.* 1985; 62:74–81
39. Vogt A. Die Sichtbarkeit des lebenden Hornhautendothels: ein Beitrag zur Methodik der Spaltlampe-mikroskopie. *Albrecht von Graefes Klin Exp Ophthalmol.* 1920; 101:123–44
40. Maurice DM. Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye. *Experientia.* 1968; 24:1094–5
41. McCarey BE, Edelhauser HF, Lynn MJ. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices, and new intraocular drugs and solutions. *Cornea.* 2008; 27:1–16
42. Mundt GH, Hughes WF. Ultrasonics in ocular diagnosis. *Am J Ophthalmol.* 1956; 41:488–98
43. Baum G, Greenwood I. The application of ultrasonic locating techniques to ophthalmology. II. Ultrasonic slit-lamp in the ultrasonic visualization of soft tissues. *AMA Arch Ophthalmol.* 1958; 60:263–79
44. Cheng A, Rao AK, Lau S, et al. Central corneal thickness measurements by ultrasound, Orbscan II, and Visante OCT after LASIK for myopia. *J Refract Surg.* 2008; 24:361–5
45. Prospero Ponce CM, Rocha KM, Smith SD, et al. Central and peripheral corneal thickness measured with optical coherence tomography, Scheimpflug imaging, and ultrasound pachymetry in normal, keratoconus-suspect, and post-laser in situ keratomileusis eyes. *J Cataract Refract Surg.* 2009; 35:1055–62
46. Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, et al. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea.* 2000; 19:712–22
47. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2009; 37:100–17
48. Efron N. The Glenn A. Fry award lecture 2010: Ophthalmic markers of diabetic neuropathy. *Optom Vis Sci.* 2011; 88:661–83
49. Efron N. Contact lens-induced changes in the anterior eye as observed in vivo with the confocal microscope. *Prog Retin Eye Res.* 2007; 26:398–436
50. Niederer RL, McGhee CNJ. Clinical in vivo confocal microscopy of the human cornea in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2010; 29:30–58
51. Patel DV, McGhee CN. Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007; 35:71–88
52. Doors M, Berendschot TT, de Brabander J, et al. Value of optical coherence tomography for anterior segment surgery. *J Cataract Refract Surg.* 2010; 36:1213–29

53. Izatt JA, Hee M, Swanson EA, et al. Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in vivo with optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112:1584–9
54. Ramos JLB, Li Y, Huang D. Clinical and research applications of anterior segment optical coherence tomography - a review. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2009; 37:81–9
55. Martin R, Izquierdo M, Saber A. Investigation of posterior corneal curvature in CL-induced corneal swelling. *Cont Lens Anterior Eye.* 2009; 32:288–93
56. Wong A, Leung CK, Weinreb RN, et al. Quantitative assessment of lens opacities with anterior segment optical coherence tomography. *Br J Ophthalmol.* 2009; 93:61–5
57. Cairns G, McGhee CNJ. Orbscan computerized topography: attributes, applications, and limitations. *J Cataract Refract Surg.* 2005; 31:205–20
58. Oliveira CM, Ribeiro C, Franco S. Corneal imaging with slit-scanning and Scheimpflug imaging techniques. *Clin Exp Optom.* 2011; 94:33–42
59. Swartz T, Marten L, Wang M. Measuring the cornea: the latest developments in corneal topography. *Curr Opin Ophthalmol.* 2007; 18:325–33
60. González-Pérez J, González-Méjome JM, Rodríguez Ares MT, et al. Central corneal thickness measured with three optical devices and ultrasound pachometry. *Eye Contact Lens.* 2011; 37:66–70
61. Jonuscheit S, Doughty MJ. Regional repeatability measures of corneal thickness: Orbscan II and ultrasound. *Optom Vis Sci.* 2007; 84:52–8
62. Martin R, Nuñez L, Sastre J, et al. Constancy of the Orbscan acoustic factor to detect contact lens-induced corneal swelling. *Clin Exp Optom.* 2011; 94:352–60
63. Jain R, Grewal S. Pentacam: principle and clinical applications. *Current Journal of Glaucoma Practice.* 2009; 3:20–32
64. Drews RC. Depth of field in slit image photography. An optical solution using the Scheimpflug principle. *Ophthalmologica.* 1964; 148:143–50
65. Drews RC. Fundus photography by electronic flash III. A new fundus-anterior segment camera. *Am J Ophthalmol.* 1957; 44:522–5
66. Rosales P, Marcos S. Pentacam Scheimpflug quantitative imaging of the crystalline lens and intraocular lens. *J Refract Surg.* 2009; 25:421–8
67. Hashemi H, Mehravaran S. Day to day clinically relevant corneal elevation, thickness, and curvature parameters using the orbscan II scanning slit topographer and the pentacam scheimpflug imaging device. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2010; 17:44–55
68. Romanchuk KG. Fluorescein. Physicochemical factors affecting its fluorescence. *Surv Ophthalmol.* 1982; 26:269–83
69. Pfluger E. Zur ernahrung der Cornea. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1882; 20:12
70. Kim J. The use of vital dyes in corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 2000; 11:241–7

71. Davies IP, Veys J. The use of fluorescein in contact lens aftercare. *Cont Lens Anterior Eye*. 2009; 32:187–9
72. McNamara NA, Polse KA, Bonanno JA. Fluorophotometry in contact lens research: the next step. *Optom Vis Sci*. 1998; 75:316–22
73. Fischbarg J. Active and passive properties of the rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 1973; 15:615–38
74. Langley D, MacDonald RK. Clinical method of observing changes in the rate of flow of aqueous humour in the human eye. I. Normal eyes. *Br J Ophthalmol*. 1952; 36:432–7
75. Ota Y, Mishima S, Maurice DM. Endothelial permeability of the living cornea to fluorescein. *Invest Ophthalmol* 1974; 13:945–949
76. Yablonski ME, Zimmerman TJ, Waltman SR, et al. A fluorophotometric study of the effect of topical timolol on aqueous humor dynamics. *Exp Eye Res*. 1978; 27:135–42
77. Duench S, Sorbara L, Keir N, et al. Impact of silicone hydrogel lenses and solutions on corneal epithelial permeability. *Optom Vis Sci*. 2013; 90:546–56
78. Chang SW, Hu FR, Lin LL. Effects of contact lenses on corneal endothelium - a morphological and functional study. *Ophthalmologica*. 2001; 215:197–203
79. Tomlinson A, Khanal S. Assessment of tear film dynamics: quantification approach. *Ocul Surf*. 2005; 3:81-95
80. McNamara NA, Fusaro RE, Brand RJ, et al. Measurement of corneal epithelial permeability to fluorescein. A repeatability study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38:1830–9
81. Joshi A, Maurice DM, Paugh JR. A new method for determining corneal epithelial barrier to fluorescein in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:1008–16
82. Golubeva NG, Gordienko VI, Velikanov AO. Intermolecular interactions in the absorption and fluorescence spectrum of fluorescein sodium. *Zhurnal Prikladnoi Spektroskopii*. 1988; 49:940–44
83. Morgan PB, Maldonado-Codina C. Corneal staining: Do we really understand what we are seeing? *Cont Lens Anterior Eye*. 2009; 32:48-54
84. McNamara NA, Fusaro RE, Brand RJ, et al. Epithelial permeability reflects subclinical effects of contact lens wear. *Br J Ophthalmol*. 1998; 82:376-81
85. Lin MC, Graham AD, Polse KA, et al. The effects of one-hour wear of high-Dk soft contact lenses on corneal pH and epithelial permeability. *CLAO J*. 2000; 26:130–3
86. Dutt RM, Stocker EG, Wolff CH, et al. A morphologic and fluorophotometric analysis of the corneal endothelium in long-term extended wear soft contact lens wearers. *CLAO J*. 1989; 15:12–3
87. Bourne WM, Hodge DO, McLaren JW. Estimation of corneal endothelial pump function in long-term contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:603–11
88. Potts AM, Modrell RW. The transcorneal potential. *Am J Ophthalmol*. 1957; 44:284–90

89. Oksala A, Lehtinen A. Experimental and clinical studies on the ohmic resistance of the cornea and the sclera. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1960; 38:153–62
90. Klyce SD. Electrical profiles in the corneal epithelium. *J Physiol*. 1972; 226:407–29
91. Biermann H, Boden K, Reim M. Measuring electrical impedance in normal and pathologic corneas. *Fortschr Ophthalmol*. 1991; 88:17–20
92. Jurgens I, Rosell J, Riu PJ. Electrical impedance tomography of the eye: in vitro measurements of the cornea and the lens. *Physiol Meas*. 1996; 17:187–95
93. Chetoni P, Burgalassi S, Monti D, et al. Ocular toxicity of some corneal penetration enhancers evaluated by electrophysiology measurements on isolated rabbit corneas. *Toxicol In Vitro*. 2003; 17:497–504
94. Uematsu M, Kumagami T, Kusano M, et al. Acute corneal epithelial change after instillation of benzalkonium chloride evaluated using a newly developed in vivo corneal transepithelial electric resistance measurement method. *Ophthalmic Res*. 2007; 39:308–14
95. Uematsu M, Kumagami T, Shimoda M, et al. Influence of alkyl chain length of benzalkonium chloride on acute corneal epithelial toxicity. *Cornea*. 2010; 29:1296–301
96. Kusano M, Uematsu M, Kumagami T, et al. Evaluation of acute corneal barrier change induced by topically applied preservatives using corneal transepithelial electric resistance in vivo. *Cornea*. 2010; 29:80–5
97. Chen W, Hu J, Zhang Z, et al. Localization and expression of zonula occludins-1 in the rabbit corneal epithelium following exposure to benzalkonium chloride. *PLoS One*. 2012; 7:e40893
98. Rubinstein MP. Applications of contact lens devices in the management of corneal disease. *Eye (Lond)*. 2003; 17:872–6
99. Stapleton F, Keay L, Jalbert I, et al. The epidemiology of contact lens related infiltrates. *Optom Vis Sci*. 2007; 84:257–72
100. Covey M, Sweeney DF, Terry R, et al. Hypoxic effects on the anterior eye of high-Dk soft contact lens wearers are negligible. *Optom Vis Sci*. 2001; 78:95–9
101. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/HomeHealthandConsumer/ConsumerProducts/ContactLenses/ucm062319.htm> (fecha de la consulta: 03/06/2014)
102. Efron N, Brennan NA, Bright FV, et al. 2. Contact lens care and ocular surface homeostasis. *Cont Lens Anterior Eye*. 2013; 36:9–13
103. Hadassah J, Sehgal PK. A novel method to measure oxygen permeability and transmissibility of contact lenses. *Clin Exp Optom*. 2006; 89:374–80
104. Brennan NA, Efron N, Holden BA, et al. A review of the theoretical concepts, measurement systems and application of contact lens oxygen permeability. *Ophthalmic Physiol Opt*. 1987; 7:485–90
105. Morris J, Ruben M. Clinical aspects of the measurement of oxygen flux into the cornea. *Br J Ophthalmol*. 1981; 65:97–100

106. Brennan NA. Beyond flux: total corneal oxygen consumption as an index of corneal oxygenation during contact lens wear. *Optom Vis Sci.* 2005; 82:467–72
107. Holden BA. The Glenn A. Fry Award lecture 1988: The ocular response to contact lens wear. *Optom Vis Sci.* 1989;66:717–33
108. Robertson DM. The effects of silicone hydrogel lens wear on the corneal epithelium and risk for microbial keratitis. *Eye Contact Lens.* 2013; 39:67–72
109. Guimera A, Gabriel G, Plata-Cordero M, et al. A non-invasive method for an in vivo assessment of corneal epithelium permeability through tetrapolar impedance measurements. *Biosens Bioelectron.* 2012; 31:55–61
110. Guimera A, Illa X, Traver E, et al. Flexible probe for in vivo quantification of corneal epithelium permeability through non-invasive tetrapolar impedance measurements. *Biomed Microdevices.* 2013; 15:849–58
111. Handbook for the use of animals in biomedical research. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Inc; Third Edition. 2009
112. McCanna DJ, Driot JY, Hartsook R, et al. Rabbit models of contact lens—associated corneal hypoxia: a review of the literature. *Eye Contact Lens.* 2008; 34:160–5
113. Bonanno JA, Nyguen T, Biehl T, et al. Can variability in corneal metabolism explain the variability in corneal swelling? *Eye Contact Lens.* 2003; 29:7–9
114. Teranishi S, Kimura K, Kawamoto K, et al. Protection of human corneal epithelial cells from hypoxia-induced disruption of barrier function by keratinocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:2432–7
115. Kimura K, Teranishi S, Kawamoto K, et al. Protection of human corneal epithelial cells from hypoxia-induced disruption of barrier function by hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res.* 2010; 90:337–43
116. McNamara NA, Polse KA, Fukunaga SA, et al. Soft lens extended wear affects epithelial barrier function. *Ophthalmology.* 1998; 105:2330–5
117. Lin MC, Graham AD, Fusaro RE, et al. Impact of rigid gas-permeable contact lens extended wear on corneal epithelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:1019–24
118. Bandamwar KL, Garrett Q, Papas EB. Mechanisms of superficial micropunctate corneal staining with sodium fluorescein: the contribution of pooling. *Cont Lens Anterior Eye.* 2012; 35:81–4
119. Parramon D, Erill I, Guimera A, et al. In vivo detection of liver steatosis in rats base don impedance spectroscopy. *Physiol Meas.* 2007; 28:813–28
120. Genescà M, Ivorra A, Sola A, et al. Electrical bioimpedance measurement during hypothermic rat kidney preservation for assessing ischemic injury. *Biosens Bioelectron.* 2005; 20:1866–71
121. Jalbert I, Sweeney DF, Stapleton F. The effect of long-term wear of soft lenses of low and high oxygen transmissibility on the corneal epithelium. *Eye (Lond).* 2009; 23:1282–7

122. Pérez JG, Méijome JM, Jalbert I, et al. Corneal epithelial thinning profile induced by long-term wear of hydrogel lenses. *Cornea*. 2003; 22:304–7
123. Hutchings N, Simpson TL, Hyun C, et al. Swelling of the human cornea revealed by high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010; 51:4579–84
124. Wang J, Fonn D, Simpson TL. Topographical thickness of the epithelium and total cornea after hydrogel and PMMA contact lens wear with eye closure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44:1070–4
125. Leung BK, Bonanno JA, Radke CJ. Oxygen-deficient metabolism and corneal edema. *Prog Retin Eye Res*. 2011; 30:471–92
126. Yeh TN, Green HM, Zhou Y, et al. Short-term effects of overnight orthokeratology on corneal epithelial permeability and biomechanical properties. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54:3902–11
127. Declaración de Helsinki. 2008
128. Efron N. Grading scales for contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt*. 1998; 18:182–6
129. Efron N, Morgan PB, Katsara SS. Validation of grading scales for contact lens complications. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2001; 21:17–29
130. Lin MC, Soliman GN, Song MJ, et al. Soft contact lens extended wear affects corneal epithelial permeability: hypoxic or mechanical etiology? *Cont Lens Anterior Eye*. 2003; 26:11–6
131. Carlson KH, Bourne WM, Brubaker RF. Effect of long-term contact lens wear on corneal endothelial cell morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988; 29:185–93
132. Sanchis-Gimeno JA, Palanca-Sanfrancisco JM, García-Lázaro S, et al. The effect of anesthetic eye drop instillation on the distribution of corneal thickness. *Cornea*. 2013; 32:102–5
133. Ogbuehi KC. Corneal biomechanical parameters and intraocular pressure: the effect of topical anesthesia. *Clin Ophthalmol*. 2012; 6:871–8
134. Ogbuehi KC, Chijuka JC, Osuagwu UL. Changes in central corneal thickness values after instillation of oxybuprocaine hydrochloride 0.4%. *Cont Lens Anterior Eye*. 2012; 35:199–202
135. Rosa N, De Bernardo M, Borrelli M, et al. Effect of oxybuprocaine eye drops on corneal volumen and thickness measurements. *Optom Vis Sci*. 2011; 88:640–4
136. Díaz-Rey JA, Giráldez MJ, García-Resúa C, et al. Effect of double anaesthetic Colicursi (tetracaine 0,1% and oxybuprocaine 0,4%) on central and paracentral corneal thickness. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2009; 84:23–30
137. Asensio I, Rahhal SM, Alonso L, et al. Corneal thickness values before and after oxybuprocaine 0,4% eye drops. *Cornea*. 2003; 22:527–32
138. Stolwijk TR, van Best JA, Boor JP, et al. Corneal epithelial barrier function after oxybuprocaine provocation in diabetics. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990; 31:436–9
139. Ramselaar JA, Boot JP, van Haeringen NJ, et al. Corneal epithelial permeability after instillation of

- ophthalmic solutions containing local anaesthetics and preservatives. *Curr Eye Res.* 1988; 7:947–50
140. Khoramnia R, Rabsilber TM, Auffarth GU. Central and peripheral pachymetry measurements according to age using the Pentacam rotating Scheimpflug camera. *J Cataract Refract Surg.* 2007; 33:830–6
141. Jonuscheit S, Doughty MJ. Evidence for a relative thinning of the peripheral cornea with age in white European subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:4121–8
142. Plugfelder SC, Liu Z, Feuer W, et al. Corneal thickness indices discriminate between keratoconus and contact lens-induced corneal thinning. *Ophthalmology.* 2002; 109:2336–41
143. Serup L, Serup J, Hagdrup HK. Increased central cornea thickness in systemic sclerosis. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1984; 62:69–74
144. Tabery HM. Early epithelial changes in recurrent herpes simplex virus keratitis: a non-contact photomicrographic study in vivo in the human cornea. *Acta Ophthalmol Scand.* 1998; 76:349–52
145. Hamilton K. Midperipheral corneal thickness affects noncontact tonometry. *J Glaucoma.* 2009; 18:623–7
146. Fares U, Otri AM, Al-Aqaba MA, et al. Correlation of central and peripheral corneal thickness in healthy corneas. *Cont Lens Anterior Eye.* 2012; 35:39–45
147. Rüfer F, Schröder A, Bader C, et al. Age-related changes in central and peripheral corneal thickness: determination of normal values with the Orbscan II topography system. *Cornea.* 2007; 26:1–5
148. Koller T, Schumacher S, Fankhauser F 2nd, et al. Riboflavin/ultraviolet a crosslinking of the paracentral cornea. *Cornea.* 2013; 32:165–8
149. Read SA, Collins MJ, Carney LG, et al. The topography of the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:1404–15
150. He J, Bazan NG, Bazan HE. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp Eye Res.* 2010; 91:513–23
151. Mondino BJ. Inflammatory diseases of the peripheral cornea. *Ophthalmology.* 1988; 95:463–72
152. Ang LP, Tan DT. Ocular surface stem cells and disease: current concepts and clinical applications. *Ann Acad Med Singapore.* 2004; 33:576–80
153. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol.* 2000; 44:415–25
154. Moller-Pedersen T, Ehlers N. A three-dimensional study of the human corneal keratocyte density. *Curr Eye Res.* 1995; 14:459–64
155. Henriksson JT, Bron AJ, Bergmanson JP. An explanation for the central to peripheral thickness variation in the mouse cornea. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2012; 40:174–81
156. Edelhauser HF. The resiliency of the corneal endothelium to refractive and intraocular surgery. *Cornea.* 2000; 19:263–73
157. Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K. Different characteristics of endothelial cells

- from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998; 34:149–53
158. Mandell RB, Polse KA. Corneal thickness changes accompanying central corneal clouding. *Am J Optom Arch Am Acad Optom.* 1971; 48:129–32
159. Carney LG. Hydrophilic lens effects on central and peripheral corneal thickness and corneal topography. *Am J Optom Physiol Opt.* 1975; 52:521–3
160. Holden B, McNally J, Mertz G, et al. Topographical corneal oedema. *Acta Ophthalmol.* 1985; 63:684–91
161. Bonanno JA, Polse KA, Goldmann MM. Effect of soft lens power on peripheral corneal edema. *Am J Optom Physiol Opt.* 1986; 63:520–6
162. Erickson P, Comstock TL, Zantos SG. Effects of hydrogel lens transmissibility profiles on local corneal swelling during eye closure. *Optom Vis Sci.* 1996; 73:169–77
163. Moezzi AM, Fonn D, Simpson TL, et al. Contact lens-induced corneal swelling and surface changes measured with the Orbscan II corneal topographer. *Optom Vis Sci.* 2004; 81:189–93
164. Tyagi G, Collins M, Read S, et al. Corneal changes following short-term rigid contact lens wear. *Cont Lens Anterior Eye.* 2012; 35:129–36
165. Kaluzny JJ, Orzalkiewicz A, Czajkowski G. Changes of corneal thickness in patients wearing frequent-replacement contact lenses. *Eye Contact Lens.* 2003; 29:23–6
166. Tyagi G, Collins M, Read S, et al. Regional changes in corneal thickness and shape with soft contact lenses. *Optom Vis Sci.* 2010; 87:567–75
167. Mandell RB. Why don't we find keratometer changes and spectacle blur in gel lens wearers? *Internat Contact Lens Clinic.* 1974; 1:34–5
168. Sanders TL, Polse KA, Sarver MD, et al. Central and peripheral corneal swelling accompanying the wearing of Bausch and Lomb SOFLENS contact lenses. *Am J Optom Physiol Opt.* 1975; 52:393–7
169. Lowther GE, Tomlinson A. Clinical study of corneal response to the wear of low water content soft lenses. *Am J Optom Physiol Opt.* 1979; 56:674–80
170. Huang J, Ding X, Savini G, et al. A Comparison between Scheimpflug Imaging and Optical Coherence Tomography in Measuring Corneal Thickness. *Ophthalmology.* 2013; 120:1951–8
171. Miranda MA, Radhakrishnan H, O'Donnell C. Repeatability of corneal thickness measured using an Oculus Pentacam. *Optom Vis Sci.* 2009; 86:266–72
172. Shankar H, Taranath D, Santhirathelagan CT, et al. Anterior segment biometry with the Pentacam: comprehensive assessment of repeatability of automated measurements. *J Cataract Refract Surg.* 2008; 34:103–13
173. Zantos SG, Holden BA. Transient endothelial changes soon after wearing soft contact lenses. *Am J Optom Physiol Opt.* 1977; 54:856–8
174. Brennan NA, Coles ML, Connor HR, et al. Short-term corneal endothelial response to wear of silicone-hydrogel contact lenses in

- east asian eyes. *Eye Contact Lens*. 2008; 34:317–21
175. Aramberri J, Araiz L, Garcia A, et al. Dual versus single Scheimpflug camera for anterior segment analysis: Precision and agreement. *J Cataract Refract Surg*. 2012; 38:1934–49
176. Jahadi Hosseini HR, Katbab A, Khalili MR, et al. Comparison of corneal thickness measurements using Galilei, HR Pentacam, and ultrasound. *Cornea*. 2010; 29:1091–5
177. Huang JH, Ge LN, Wen DZ, et al. Repeatability and agreement of corneal thickness measurement with Pentacam Scheimpflug photography and Visante optical coherence tomography. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2013; 49:250–6
178. Milla M, Piñero DP, Amparo F, et al. Pachymetric measurements with a new Scheimpflug photography-based system: intraobserver repeatability and agreement with optical coherence tomography pachymetry. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37:310–6
179. Bourges JL, Alfonsi N, Laliberté JF, et al. Average 3-dimensional models for the comparison of Orbscan II and Pentacam pachymetry maps in normal corneas. *Ophthalmology*. 2009; 116:2064–71
180. Jonuscheit S, Doughty MJ. Discrepancy between central and midperipheral corneal thickness measurements obtained with slit-scanning pachymetry and noncontact specular microscopy. *J Cataract Refract Surg*. 2009; 35:2127–35
181. Buehl W, Stojanac D, Sacu S, et al. Comparison of three methods of measuring corneal thickness and anterior chamber depth. *Am J Ophthalmol*. 2006; 141:7–12
182. González-Méijome JM, Cerviño A, Yebra-Pimentel E, et al. Central and peripheral corneal thickness measurement with Orbscan II and topographical ultrasound pachymetry. *J Cataract Refract Surg*. 2003; 29:125–32
183. Martin R, de Juan V, Rodriguez G, et al. Contact lens-induced corneal peripheral swelling: Orbscan repeatability. *Optom Vis Sci*. 2009; 86:340–9
184. Cho P, Cheung SW. Central and peripheral corneal thickness measured with the TOPCON specular microscope SP-2000P. *Curr Eye Res*. 2000; 21:799–807
185. Rabsilber TM, Becker KA, Auffarth GU. Reliability of Orbscan II topography measurements in relation to refractive status. *J Cataract Refract Surg*. 2005; 31:1607–13
186. Shankar H, Pesudovs K. Reliability of peripheral corneal pachymetry with the Oculus Pentacam. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34:7
187. Marsich MW, Bullimore MA. The repeatability of corneal thickness measures. *Cornea*. 2000; 19:792–5
188. Fonn D, Toit R, Simpson TL, et al. Sympathetic swelling response of the control eye to soft lenses in the other eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999; 40:3116–21
189. Guzey M, Satici A, Kilic A, et al. Oedematous corneal response of the fellow control eye to lotrafilcon a and vifilcon a hydrogel contact lenses in the rabbit. *Ophthalmologica*. 2002; 216:139–43



# ANEXOS

## Anexo I

Patente internacional número WO 2011/107645 PCT/ES2011/070131: *“Sensor no invasivo para determinar características funcionales de la córnea, dispositivo que incluye dicho sensor y su uso”*



**SENSOR NO INVASIVO PARA DETERMINAR CARACTERÍSTICAS  
FUNCIONALES DE LA CÓRNEA, DISPOSITIVO QUE INCLUYE DICHO  
SENSOR Y SU USO**

**DESCRIPCIÓN**

**5 OBJETO DE LA INVENCION**

El objeto de la presente invención se refiere a un sensor y a un dispositivo que incorpora dicho sensor para la obtención de forma no invasiva, de datos útiles para el diagnóstico del estado de la córnea.

Más concretamente se trata de un dispositivo que permite medir la  
10 impedancia de la córnea a diferentes frecuencias para establecer una correlación entre la impedancia y la permeabilidad del endotelio y del epitelio y el nivel de hidratación del estroma, para de esta forma determinar las características funcionales de la córnea.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

15 La córnea es la estructura hemisférica transparente localizada al frente del órgano ocular, que permite el paso de la luz y que protege al iris y cristalino. Tiene forma de casquete esférico con un diámetro medio en el humano de 11,5 mm y posee propiedades ópticas de refracción significativas, aportando aproximadamente un 70% de la capacidad total de enfoque del ojo.

20 La córnea consta de tres capas; la más externa es el epitelio corneal, compuesto por epitelio pluriestratificado no queratinizado con gran potencial regenerativo; la media es el estroma, la capa más ancha de las tres; y la más interna es el endotelio monoestratificado que consta de una sola capa de células. Se distinguen dos membranas que separan el estroma de las otras dos capas  
25 corneales: la membrana de Descemet, que separa el estroma del endotelio, y la membrana de Bowman, que separa el estroma del epitelio.

El epitelio representa el 10 % del grosor total de la córnea (550  $\mu\text{m}$

aproximadamente en el humano) y está formado por varias capas celulares que actúan de barrera protectora a agentes externos. El transporte de iones a través de las células de la capa epitelial es uno de los responsables de regular la funcionalidad corneal.

5 El estroma está formado en humanos por unas 200 – 250 láminas de fibras de colágeno dispuestas de forma paralela a la superficie corneal. El estroma es el responsable final de las propiedades biomecánicas de la córnea, así como de su curvatura y de su transparencia. Para mantener su transparencia no dispone de capilares para nutrirla, de modo que los nutrientes se suministran a través del  
10 epitelio y del endotelio. Por otro lado, el grado de hidratación del estroma está directamente relacionado con la transparencia de la córnea, permaneciendo en un continuo estado de deshidratación.

El endotelio consta de una monocapa de células cuboideas que forman un mosaico hexagonal y mantiene la transparencia del tejido controlando la  
15 hidratación del estroma. Por un lado, existe un flujo por difusión entre las células del endotelio controlado por las uniones entre éstas (tight junctions). Por otro lado, las células del endotelio están especializadas en bombear agua del estroma al humor acuoso, creando un flujo activo mediante la bomba fluídica y asegurando la homeostasis de la córnea. Una característica del endotelio corneal, a diferencia del  
20 epitelio, es su incapacidad para la renovación celular. Esto origina una pérdida de población celular con la edad, así como una disminución de su grosor al estar obligadas las células a cubrir toda la superficie corneal posterior, produciéndose como consecuencia una pérdida de su capacidad para controlar el nivel de hidratación del estroma. Este envejecimiento puede darse de forma exagerada en  
25 distrofias y como consecuencia de patología, cirugía ocular o uso de fármacos oftalmológicos.

La Figura 1 muestra las diferentes capas que componen la córnea, así como los mecanismos principales de control del nivel de hidratación del estroma: difusión a través del epitelio, difusión y bombeo a través del endotelio. Aunque el  
30 estudio de la permeabilidad de estas capas es de gran interés clínico, hasta ahora sólo se han realizado estudios basados en medidas in-vitro, generalmente con

tejidos extirpados y colocados en un dispositivo sensor específico. También existen algunos estudios que toman medidas “in vivo” en animales, pero utilizando métodos muy invasivos, lo que generalmente comporta la inutilización del tejido para estudios posteriores y imposibilidad de hacerlo en una clínica con pacientes.

- 5 En la práctica clínica se suele usar la medida del grosor de la córnea (paquimetría) como medida indirecta de la disfunción corneal.

El estudio de las propiedades eléctricas pasivas de las diferentes capas de la córnea, se utiliza habitualmente en estudios in-vitro para evaluar la permeabilidad de éstas. Pero los métodos utilizados en estos estudios no son  
10 aplicables a las medidas in-vivo. Los medios celulares y acelulares presentan un comportamiento diferente frente a la corriente eléctrica. En general, los tejidos están compuestos por células embebidas en un medio extracelular. A bajas frecuencias,  $< 1$  kHz, la corriente se distribuye por el medio extracelular (fundamentalmente una solución iónica con comportamiento resistivo), mientras  
15 que a frecuencias más altas,  $> 100$  kHz, la corriente es capaz de atravesar las paredes celulares y el medio intracelular (el comportamiento de las membranas es capacitivo y el medio intracelular es resistivo). La Fig. 2 representa gráficamente esta diferencia de comportamiento en función de la frecuencia. En base a este comportamiento de los tejidos biológicos se puede analizar el estado de las  
20 diferentes capas de la córnea utilizando medidas basadas en las propiedades eléctricas pasivas de esta, como es el caso de las medidas de impedancia.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

25 La presente invención proporciona un sensor de medida de la impedancia útil para determinar las características funcionales de la córnea, así como un dispositivo que comprende dicho sensor.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un sensor de medida de la impedancia que comprende  $n$  microelectrodos, estando  $n$  comprendido entre 4 y  
30 30, dispuestos sobre un sustrato, siendo el tamaño y disposición de los microelectrodos adecuados para que hagan simultáneamente contacto con una córnea, y donde los microelectrodos se seleccionan para realizar la medida en

grupos de 4 a modo de 2 microelectrodos externos y 2 microelectrodos internos.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo de medida de la impedancia que comprende un sensor según se ha descrito anteriormente y un equipo de medida de impedancias multifrecuencia conectado  
5 bien sea físicamente por cables o bien sea por telemetría a dicho sensor.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un sensor o de un dispositivo que comprende dicho sensor según se ha descrito anteriormente para la medida de la impedancia para determinar las características funcionales de la córnea.

10 El término "microelectrodos" hace referencia a microelectrodos que únicamente requieren el contacto con la superficie de la córnea para efectuar la medida de impedancia. Por otro lado, la expresión "tamaño y configuración adecuados para que hagan simultáneamente contacto con una córnea" se refiere a que, para poder realizar correctamente la medida de la impedancia, todos los  
15 microelectrodos utilizados deben hacer contacto eléctrico con la córnea, lo cual implica limitaciones de tamaño y disposición relativa de los microelectrodos.

Para realizar una medida, se conecta el sensor de la invención al equipo de medida de impedancias. Estos equipos funcionan inyectando una corriente eléctrica en el medio cuya impedancia se desea medir a través de los  
20 microelectrodos, obteniéndose simultáneamente el potencial eléctrico resultante a través de otros microelectrodos. A partir de estos datos, se calcula la impedancia del tejido.

Se ha probado que aumentos de permeabilidad de las capas endotelial y epitelial, que son celulares, se deben normalmente al aumento de los espacios  
25 intercelulares o a la disminución del número de células, lo cual provoca una disminución de la impedancia. Este aumento de la permeabilidad de las capas endotelial y epitelial provoca a su vez un aumento de la hidratación del estroma, lo que también tiene como consecuencia una disminución de la impedancia debido a un aumento de la concentración iónica.

El equipo de medida de impedancias incorpora medios para inyectar una corriente eléctrica de frecuencia variable en la córnea y medios para la lectura simultánea del potencial resultante, obteniendo así datos de la impedancia del tejido para una medida multifrecuencial en el rango de 10 Hz a 1 MHz.

5 Las medidas efectuadas en distintos rangos de frecuencias y con los microelectrodos adecuados dan lugar a unos valores de impedancias que permiten obtener conclusiones acerca del estado funcional de las distintas capas de la córnea.

10 Se ha observado que en el caso de frecuencia  $< 1$  KHz la conductividad medida depende básicamente de la conductividad de la capa epitelial. Debido a su baja conductividad a bajas frecuencias, la cantidad de corriente eléctrica que puede atravesarla es prácticamente nula, de forma que la caída de tensión registrada depende de la conductividad del epitelio corneal.

15 En el rango de  $1$  KHz  $<$  frecuencia  $<$   $100$  KHz, el análisis de la medida de la impedancia resulta más complejo, ya que intervienen varios factores. La conductividad de las capas celulares (epitelio y endotelio) es dos órdenes de magnitud mayor que la del resto de capas, permitiendo el paso de una cantidad de corriente significativa a las capas acelulares (estroma y humor acuoso). Por otro lado, la conductividad del humor acuoso es más elevada que la del estroma, por lo  
20 que la corriente eléctrica tenderá a circular por esta capa. La cantidad de corriente que puede atravesar el endotelio y circular con el humor acuoso se relaciona directamente con la conductividad del endotelio, y a su vez con su permeabilidad. En consecuencia, si aumenta la corriente que circula por el humor acuoso, la impedancia registrada baja, lo cual indica un aumento de la permeabilidad del  
25 endotelio.

En el rango de frecuencia  $>$   $100$  KHz la corriente eléctrica es capaz de atravesar células, de modo que la medida de la impedancia depende de la conductividad del estroma y del humor acuoso, por ser las capas de mayor tamaño. La conductividad del humor acuoso se puede considerar constante, de  
30 modo que las variaciones en la impedancia medida se relacionan con las

variaciones de la conductividad del estroma, y éstas a su vez con su grado de hidratación.

En una realización particular de la invención, los microelectrodos están dispuestos de forma planar sobre el sustrato.

5 En otra realización particular de la invención, el sensor comprende 10 microelectrodos.

Los microelectrodos conductores pueden ser de material metálico o no metálico, preferentemente de un material biocompatible.

10 En una realización particular de la invención, los microelectrodos son de material metálico seleccionado entre oro, platino, níquel, aluminio, titanio, nitruro de titanio, cromo y posibles aleaciones de los mismos;

En otra realización particular de la invención, los microelectrodos son de material no metálico seleccionado entre nanotubos de carbono, grafeno y polímeros conductores.

15 Estos microelectrodos pueden ser modificados mediante procesos que mejoran sus prestaciones. Así por ejemplo, se pueden depositar nanotubos de carbono o electro-depositar platino negro u oro para mejorar el contacto con el tejido y se pueden depositar hidrogeles como el polihidroximetilmetacrilato(pHEMA) para estabilizar los procesos anteriores.

20 En otra realización particular de la invención, dichos microelectrodos tienen forma alargada y están dispuestos en paralelo según su lado más largo, estando configurados los microelectrodos bien para inyectar una corriente eléctrica o bien para medir un potencial.

25 Por otra parte, el sustrato sobre el que están dispuestos los microelectrodos está constituido por un material biocompatible y puede ser rígido o flexible, preferentemente transparente, lo cual permite a la persona que realiza la medida

observar si los microelectrodos están haciendo contacto con la superficie de la córnea. Asimismo, un sustrato rígido puede ser esencialmente plano o presentar un ángulo de curvatura que permita su adaptación sobre la superficie de la córnea. En el caso de un sustrato rígido, el material se selecciona entre silicio, carburo de silicio, vidrio y PCB (printed circuit board, RF4). En el caso de un sustrato flexible, el material se selecciona entre polímeros como pueden ser: SU8, polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetilsiloxano (PDMS), poliimida, polietileno naftalato (PEN), polietilentereftalato (PET), poliestireno, polímero de cicloolefina (COP) y policarbonato.

10           En una realización particular de la invención, el sustrato es rígido y los microelectrodos tienen una longitud de 2 mm y una anchura de 0,3 mm.

En otra realización particular de la invención, el sustrato es flexible y los microelectrodos tienen una longitud de 1 mm y una anchura de 0,3 mm

15           La Figura 3A muestra un esquema de las diferentes capas que definen el sensor, el sustrato y los microelectrodos.

El sensor podrá ser adaptado de diferentes maneras para su puesta en práctica para la realización de las medidas de impedancia. Se contempla la posibilidad de la fabricación del sensor en forma de lentilla, la adaptación del sensor a un soporte o a un recipiente que pueda contener córneas aisladas.

20           Asimismo se ha probado que los valores de la impedancia medidos dependen de la geometría de los microelectrodos utilizados. De la misma forma la contribución de las propiedades eléctricas de cada capa de la córnea a la impedancia total medida es diferente. Se puede decir que las capas más cercanas a los microelectrodos tienen una sensibilidad mayor, de forma que una variación  
25           en sus propiedades eléctricas provocará una variación mayor en la impedancia total. De esta forma, la profundidad de la medida realizada depende de la distancia relativa entre los microelectrodos.

El sensor de la presente invención presenta la ventaja de que la medición

de la impedancia de la córnea a diferentes frecuencias para establecer una correlación entre la impedancia y la permeabilidad del endotelio y del epitelio y el nivel de hidratación del estroma, se puede determinar con el uso del mismo sensor descrito anteriormente combinando convenientemente cuatro microelectrodos de los varios presentes en el sensor, ya que permite modular la amplitud de la distancia relativa entre ellos. Así, en la Figura 3B se observa como el uso de diferentes microelectrodos permite determinar la permeabilidad de las diferentes capas de la córnea. El diseño y uso de los microelectrodos cumple con unos determinados parámetros.

A continuación se indican los valores máximos y mínimos de los parámetros que definen la geometría de los microelectrodos, y se facilitan los valores óptimos para que el sensor detecte las alteraciones en las tres capas principales de la córnea. La Fig. 4 esquematiza estos parámetros en un sensor formado por diez microelectrodos. En este caso los microelectrodos son de igual longitud y anchura y se encuentran dispuestos paralelos con 2 microelectrodos externos (I+, I-) y 2 microelectrodos internos (V+, V-), pudiendo ser también factible la disposición de los microelectrodos como externos (V+, V-) y 2 microelectrodos internos (I+, I-), ver Fig. 5.

Los parámetros son:

**We** es la anchura de cada electrodo y está comprendida entre 0,03 mm y 1mm, siendo preferentemente 0,3 mm,

**Le** es la longitud del electrodo, y está comprendida entre 0,03 mm y 11mm, siendo preferentemente 1mm o 2 mm,

**Ws** es la anchura del conjunto de electrodos seleccionados para realizar la medida o distancia entre las líneas medias de los microelectrodos externos, y está comprendida entre 0,2 mm y 11mm. El valor preferente de este parámetro depende de la capa de la que se desea obtener información, siendo 5 mm para el caso de la capa endotelial, 1 mm para el caso del epitelio y 1,8 mm para el caso del estroma.

**Nre** es la relación de la separación entre microelectrodos donde **Nre = Sei/Se**, en el que **Sei** es la distancia entre las líneas medias de los microelectrodos internos y **Se** es la distancia entre las líneas medias de un electrodo interno y el

electrodo externo más próximo, y está comprendida entre 20 y 0,1, siendo preferentemente 3.

Por otra parte se ha comprobado que variando la anchura del sensor **Ws** varía la sensibilidad del sensor a una determinada capa, ya que este parámetro determina la profundidad de la medida. Al variar la anchura del sensor los rangos de frecuencia detallados con anterioridad se alteran ligeramente, desplazándose a frecuencias más altas al reducir la anchura del sensor.

Para sensores de anchura  $W_s > 3$  mm se pueden detectar variaciones en las tres capas de la córnea.

10 Para sensores de anchura  $1,5 \text{ mm} < W_s < 3$  mm se pueden detectar variaciones en el estroma y el epitelio, siendo el rango óptimo para detectar alteraciones en la conductividad del estroma.

Para sensores de anchura  $W_s < 1,5$  mm sólo se pueden detectar variaciones en la capa epitelial.

15 Como se ha detallado con anterioridad, el estado funcional de cada capa de la córnea se correlaciona con la medida de la impedancia de la córnea en función de la anchura del conjunto de electrodos seleccionado ( $W_s$ ) y de la frecuencia a la que se realiza la medida. Así, la siguiente tabla resume los valores de estos dos parámetros para el caso de cada capa de la córnea.

20

	Epitelio	Endotelio	Estroma
$W_s$	$W_s < 1,5 \text{ mm}$	$W_s > 3 \text{ mm}$	$1,5 \text{ mm} < W_s < 3 \text{ mm}$
Frecuencia	Freq < 1 kHz	1 kHz < Freq < 100 kHz	Freq > 100 kHz

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

25

La Figura 1 muestra esquemáticamente las diferentes capas que forman la córnea (la lágrima, el epitelio celular, el estroma acelular, el endotelio celular y el

humor acuoso) y los principales mecanismos de control del nivel de hidratación del estroma. En línea continua se muestra el flujo por difusión del humor acuoso al estroma a través del endotelio, en línea discontinua se muestra el flujo por bombeo del estroma al humor acuoso a través del endotelio y en línea semidiscontinua se muestra el flujo por difusión de la lágrima al estroma a través del epitelio.

La Figura 2 muestra esquemáticamente el comportamiento de la corriente eléctrica a diferentes frecuencias al atravesar capas celulares. En línea discontinua se representan las bajas frecuencias,  $< 1$  kHz, y se observa que la corriente se distribuye por el medio extracelular. En línea continua se muestran las altas frecuencias,  $> 100$  kHz, y se observa que la corriente atraviesa la pared celular y el medio intracelular.

La Figura 3A muestra un esquema de las diferentes capas que definen el sensor, el sustrato y los microelectrodos. La Figura 3B ejemplifica cómo el uso del mismo sensor combinando convenientemente microelectrodos de los varios presentes en el sensor, permite la penetración de la corriente a las diferentes capas de la córnea.

La Figura 4 muestra el ejemplo de un sensor con 10 microelectrodos, donde se definen los diferentes parámetros de la geometría del sensor:  $W_e$ , anchura del microelectrodo;  $L_e$ ; longitud del microelectrodo;  $W_s$ , anchura del conjunto de microelectrodos seleccionados para realizar la medida;  $S_e$ , distancia entre las líneas medias de un microelectrodo interno y el microelectrodo externo más próximo;  $S_{ei}$ , distancia entre las líneas medias de los microelectrodos internos.

La Figura 5 muestra un ejemplo de un sensor formado por cuatro microelectrodos dispuestos sobre un sustrato, detallando los dos microelectrodos externos ( $I+$ ,  $I-$ ) y los dos microelectrodos internos ( $V+$ ,  $V-$ ) para realizar una medida de impedancia a cuatro puntas.

## **DESCRIPCIÓN DE UNA REALIZACIÓN PREFERENTE**

Se describe a continuación una realización preferente del dispositivo objeto

de la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas.

En este ejemplo se usó un sensor con 10 microelectrodos de oro depositado sobre un sustrato de vidrio. Para evitar que las pistas hicieran contacto eléctrico con la córnea, éstas se cubrieron mediante una capa aislante de SiO<sub>2</sub>-  
5 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (300 nm + 700 nm). La forma de los microelectrodos y de la capa aislante se realizaron mediante procesos de fotolitografía estándares en procesos de microtecnología.

La correlación entre las medidas de la impedancia de la córnea y la funcionalidad de las diferentes capas de la córnea se validaron mediante pruebas  
10 experimentales en conejos. De esta forma, se indujeron alteraciones funcionales en la córnea mediante la administración de cloruro de benzalconio (BAC) diluido al 0.05% en volumen. Este compuesto altera las uniones entre las células provocando un aumento de la permeabilidad de las capas corneales.

Para detectar alteraciones en la capa epitelial se seleccionó una  
15 configuración de microelectrodos con una Ws de 1 mm y una Nre de 3. El equipo de impedancia inyectó una corriente de 10 uA a 100 Hz entre los microelectrodos externos y registró la caída de potencial en los microelectrodos internos, obteniéndose la medida de la impedancia de la córnea. La medida obtenida a 100 Hz fue de 10 K $\Omega$   $\pm$  2 K $\Omega$  en el caso de una córnea sana y de 4 K $\Omega$   $\pm$  1 K $\Omega$  en el  
20 caso de una córnea con la capa epitelial alterada. Repitiendo el mismo procedimiento, para detectar alteraciones en la capa endotelial se seleccionó una configuración de microelectrodos con una Ws de 5 mm y una Nre de 3, obteniéndose una medida a 10 kHz de 2 K $\Omega$   $\pm$  0.5 K $\Omega$  para una córnea sana y una medida de 200  $\Omega$   $\pm$  100  $\Omega$  para una córnea con la capa endotelial alterada.  
25 Siguiendo el mismo procedimiento experimental se midió el aumento de la hidratación del estroma debido al aumento de la permeabilidad endotelio corneal. Para ello, se seleccionó una configuración de microelectrodos con una Ws de 1.8 mm y una Nre de 3, obteniéndose una medida a 1 MHz de 250  $\Omega$   $\pm$  20  $\Omega$  para una córnea sana y una medida de 80  $\Omega$   $\pm$  20  $\Omega$  para una córnea con la capa estromal  
30 alterada.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Sensor de medida de la impedancia que comprende n microelectrodos, donde n está comprendido entre 4 y 30, dispuestos sobre un sustrato, siendo el tamaño y disposición de los microelectrodos adecuados para que hagan simultáneamente  
5 contacto con una córnea, y donde los microelectrodos se seleccionan para realizar la medida en grupos de 4 a modo de 2 microelectrodos externos y 2 microelectrodos internos.
- 2.-Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 1, donde los microelectrodos están dispuestos de forma planar sobre el sustrato.
- 10 3.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el sensor comprende 10 microelectrodos.
- 4.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los microelectrodos son de material metálico seleccionado entre oro, platino, níquel, aluminio, titanio, nitruro de titanio, cromo y aleaciones de los  
15 mismos.
- 5.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde los microelectrodos son de material no metálico seleccionado entre nanotubos de carbono, grafeno y polímeros conductores.
- 6.-Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1  
20 a 5, donde los microelectrodos tienen una forma alargada y están dispuestos en paralelo según su lado más largo.
7. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la anchura de cada electrodo We está comprendida entre 0,03 mm y 1mm.
- 25 8. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 7, donde la anchura de cada electrodo We es 0,3 mm.

9. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la longitud del electrodo  $L_e$  está comprendida entre 0,03 mm y 11mm.
10. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 9, donde la longitud del electrodo  $L_e$  es 1mm o 2 mm.
- 5 11. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados para realizar la medida o distancia entre las líneas medias de los microelectrodos externos  $W_s$  está comprendida entre 0,2 mm y 11mm.
12. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 11, donde la  
10 anchura del conjunto de electrodos seleccionados para realizar la medida o distancia entre las líneas medias de los microelectrodos externos  $W_s$  es 1 mm para el caso del epitelio, 1,8 mm para el caso del estroma y 5 mm para el caso de la capa endotelial.
13. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1  
15 a 12, donde la relación de la separación entre microelectrodos  $N_{re} = S_{ei}/S_e$ , en el que  $S_{ei}$  es la distancia entre las líneas medias de los microelectrodos internos y  $S_e$  es la distancia entre las líneas medias de un electrodo interno y el electrodo externo más próximo, está comprendida entre 0,1 y 20.
14. Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 13, donde la  
20 relación de la separación entre microelectrodos  $N_{re}$  es 3.
15. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el sustrato sobre el que están dispuestos los microelectrodos es de un material rígido seleccionado entre silicio, carburo de silicio, vidrio y PCB (printed circuit board, RF4).
- 25 16 Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 15, donde los microelectrodos tienen una longitud de 2 mm y una anchura de 0,3 mm.
17. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1

a 14, donde el sustrato sobre el que están dispuestos los microelectrodos es de un material flexible seleccionado entre SU8, polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetilsiloxano (PDMS), poliimida, polietileno naftalato (PEN), polietilentereftalato (PET), poliestireno, polímero de cicloolefina (COP) y polycarbonato.

18 Sensor de medida de la impedancia según la reivindicación 17, donde los microelectrodos tienen una longitud de 1 mm y una anchura de 0,3 mm

19. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, donde el sustrato es transparente.

10 20. Sensor de medida de la impedancia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, donde el sensor se realiza en forma de lentilla, adaptado a un soporte o adaptado a un recipiente que pueda contener córneas aisladas.

15 21. Dispositivo de medida de la impedancia que comprende un sensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 y un equipo de medida de impedancias multifrecuencia.

22. Dispositivo de medida de la impedancia según la reivindicación 21 donde el sensor y el equipo de medida de impedancias multifrecuencia están conectados mediante cables.

20 23. Dispositivo de medida de la impedancia según la reivindicación 21 donde el sensor y el equipo de medida de impedancias multifrecuencia están conectados por telemetría.

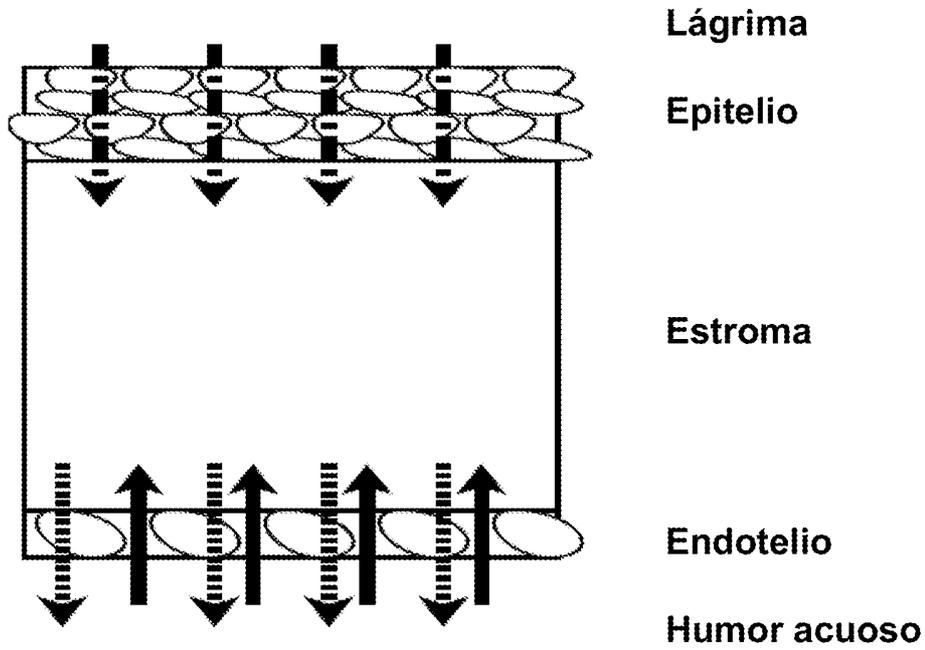
25 24. Uso de un sensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 o de un dispositivo que comprende dicho sensor definido en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, para la medida de la impedancia para determinar las características funcionales de la córnea.

25. Uso de un sensor según la reivindicación 24 para determinar las características

funcionales del epitelio donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados  $W_s$  es menor de 1,5 mm y la frecuencia a la que se realiza la medida es menor de 1 kHz.

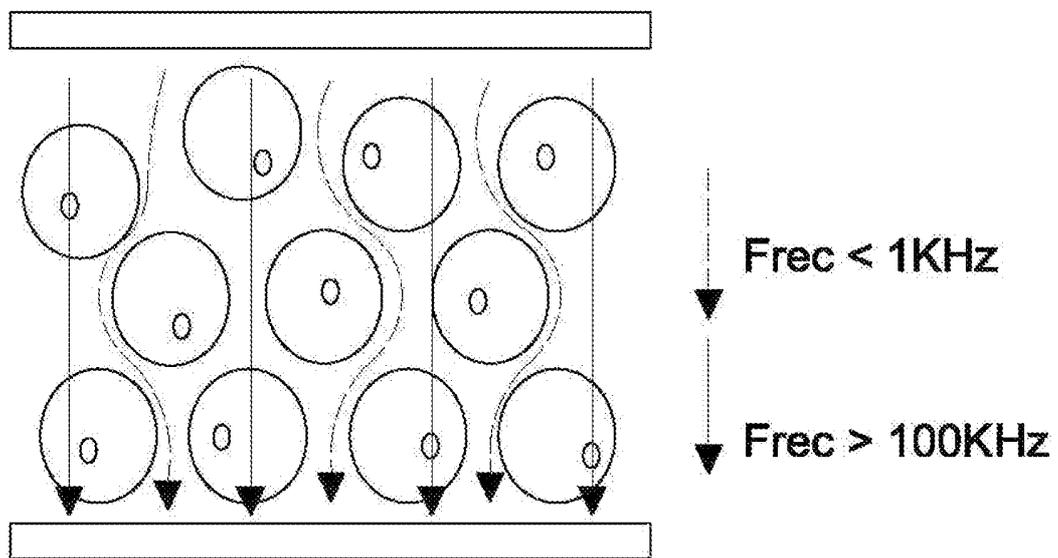
26. Uso de un sensor según la reivindicación 24 para determinar las características  
5 funcionales del endotelio donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados  $W_s$  es mayor de 3 mm y la frecuencia a la que se realiza la medida está comprendida entre 1 kHz y 100 kHz.

27. Uso de un sensor según la reivindicación 24 para determinar las características  
10 funcionales del estroma donde la anchura del conjunto de electrodos seleccionados  $W_s$  está comprendida entre 1,5 mm y 3 mm y la frecuencia a la que se realiza la medida es mayor de 100 kHz.



-  Flujo por difusión a través del epitelio.
-  Flujo por difusión a través del endotelio.
-  Flujo por bombeo a través de las células endotelio.

**Fig. 1**



**Fig. 2**



Fig. 3A

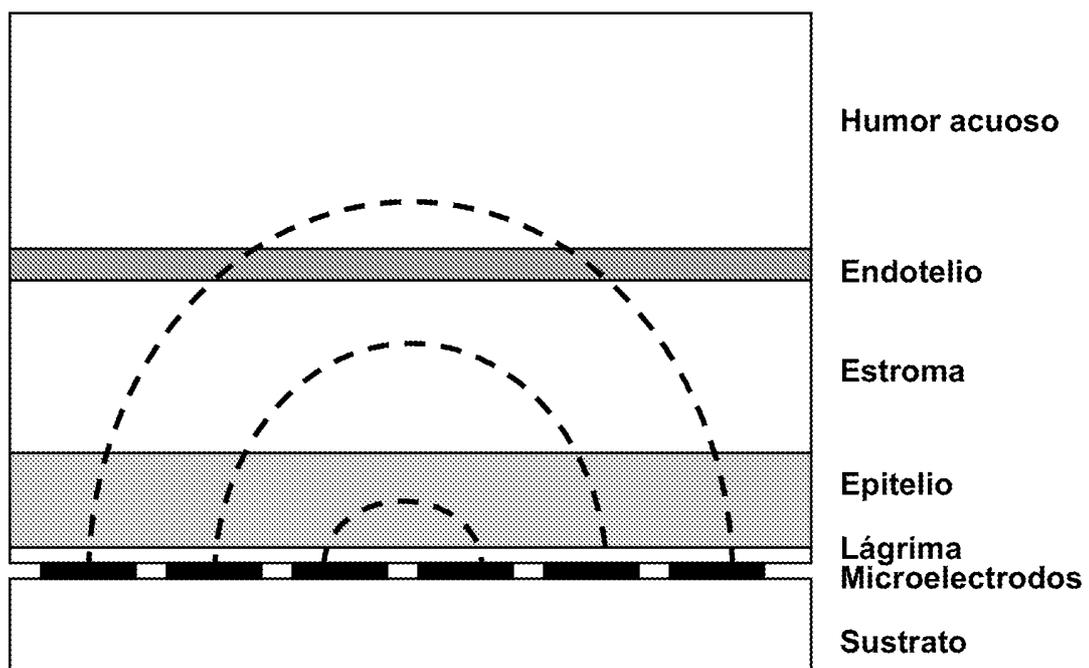
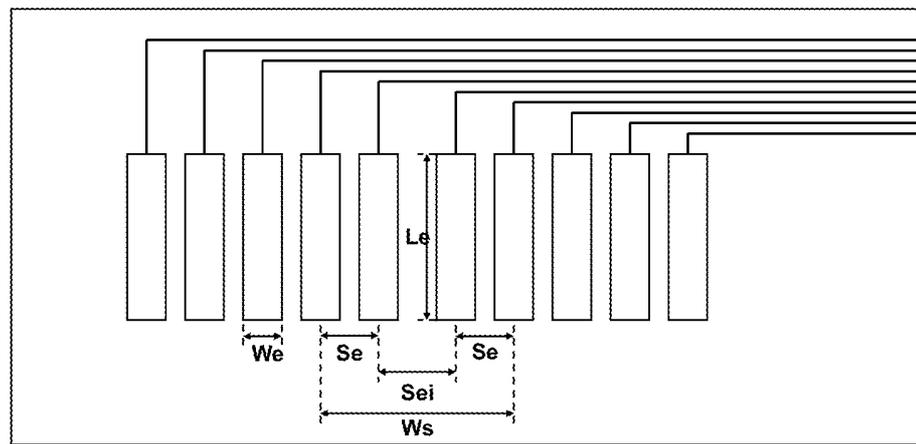
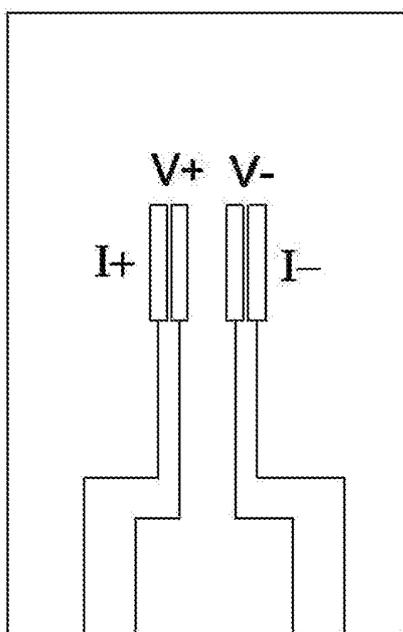


Fig. 3B

Fig. 4





**Fig. 5**

## **Anexo II**

Manual de usuario CORBI



## Manual de Usuario

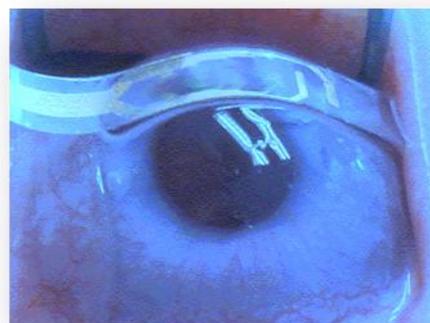
---

### ¿Que es CORBI?

Es un equipo en fase de investigación y de ensayo clínico que aporta datos del **grado de permeabilidad de la córnea** basándose en un análisis de medidas de la impedancia mediante un microsensor colocado en la superficie corneal.

Su principal ventaja frente a otros métodos es la rapidez de los resultados y no ser invasivo. Se aplica con la misma simplicidad que una tonometría. Ello permite que pueda llegar a generalizarse en visitas de oftalmología.

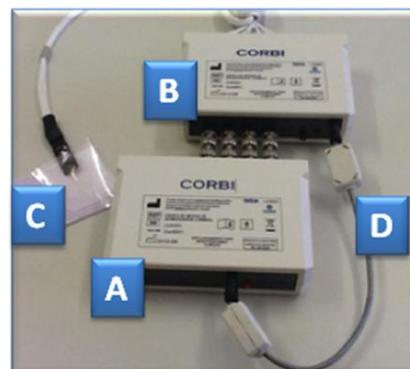
El ensayo clínico pretende validar el método y dispositivo en pacientes y principalmente para su uso en el diagnóstico y seguimiento de pacientes que son portadores de lentes de contacto o a los que se les va a realizar cirugía para corrección de cataratas. El ensayo está financiado por los laboratorios SALVAT SA.



### Descripción del equipo

El equipo completo consta de tres elementos

1. Un Dispositivo electrónico
2. Un sensor corneal
3. Un PC opcional



#### 1

El equipo electrónico consta de dos módulos unidos, A y B en la foto superior, que permiten tomar y almacenar datos de forma automática. Estos datos posteriormente serán enviados a un PC para su análisis posterior. Ambos están unidos por un cable, D en la foto superior.

#### 2

El sensor corneal, C en la foto superior, está realizado con tecnologías microelectrónicas. Consta de varios microelectrodos de oro distribuidos sobre una superficie polimérica flexible que permite su adaptación perfecta a la curvatura corneal. Dicho sensor está unido a un cabezal para su correcta manipulación y conexión al equipo electrónico. Dicho sensor y cabezal estarán desinfectados y en bolsas precintadas y será de un solo uso.

#### 3

Finalmente, un PC que contiene un programa específico que permite analizar los datos.

## Modo de Funcionamiento

Antes de utilizarlo comprobar que se tiene todos los elementos: Sensores esterilizados  
Dispositivo electrónico y hojas de protocolo.

### Los pasos de funcionamiento son:

**1.- CONEXIÓN SENSOR.** Sacar el sensor del blíster estéril. Unir el cabezal del sensor (1) al cable conector del dispositivo CORBI. Vigilar que coincidan los puntos rojos al mismo lado.

Tener cuidado en no tocar partes estériles, es decir la zona flexible (2), que irán en contacto con el ojo.

La parte sensora flexible ha sido previamente desinfectada y protegida en blíster especiales.

El punto rojo del sensor (2) sirve además para colocar el lado correcto de la zona sensora en la superficie ocular.

El oftalmólogo ha de visualizar siempre el punto rojo!

**2.- ENCENDIDO.** Encender ambos módulos electrónicos (B y A) apretando los botones de encendido respectivos. Se encenderá en el botón una luz verde en el módulo B y una roja en el A.

**3.- TEST.** Hacer una medida Test. Una vez puesto el sensor a utilizar en el extremo del cable colocarlo inmerso en un recipiente con suero fisiológico.

Apretar el botón de test que es negro. Se encenderán las luces o LEDs de control ambas mientras se esta automáticamente realizando la medida de test.

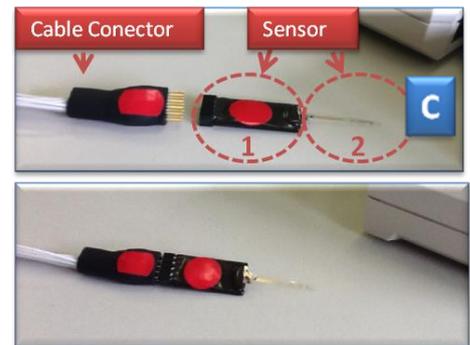
Si la medida es buena quedara solamente la luz verde. Si la medida no es correcta quedara encendida solamente la luz roja.

En este caso repetir la medida y si repite el error proceder a cambiar el sensor y volver a hacer el test.

**4.-MEDIDA.** Colocar el sensor flexible en la superficie corneal de forma centrada con el ojo abierto y viendo la marca roja por el examinador. Cuando toda la superficie del sensor contacta con la cornea iniciar la medida.

Apretar el botón rojo de medida. Se volverán a encender las dos luces o LEDs, al acabar de medir permanecerá encendida solo una, verde si la medida es correcta y rojo en el caso de que haya un error en la medida.

Comprobar que las luces de control tras la estabilización se queda el color verde. Sino repetir el proceso.



Los datos quedarán almacenados para un posterior análisis. Estos datos se almacenan de forma automática registrándose el día y la hora de realización. El dispositivo puede llegar a almacenar 2000 datos sin necesidad de volcarlos a un PC.

**5.- PROTOCOLO.** Completar la Hoja de Protocolo CORBI. Es fundamental anotar en las hojas la fecha, hora y número de medidas totales.



**6.- ANÁLISIS DE DATOS.** Los datos se volcarán posteriormente a un PC que con el software CORBI permitirá analizar los resultados. En el módulo A parpadeará una luz verde que indica que hay conexión al PC.

**NO UTILIZAR ESTE EQUIPO EN CASO DE:**

- **Infección, inflamación o enfermedad de la cámara anterior y la superficie anterior de ojo (conjuntiva, córnea y anejos oculares) tales como defectos epiteliales recurrentes, queratocono, conjuntivitis papilar gigante, blefaritis (activa de grado 2 o más) u ojo seco severo.**
- **Sujetos que presenten cualquier tipo de complicación tras una cirugía Intraocular reciente.**
- **Enfermedades sistémicas como diabetes, artritis e hiper o hipotiroidismo y síndromes de ojo seco.**
- **Cualquier otra patología ocular o sistémica que contraindique el uso de lentes de contacto o la cirugía intraocular.**
- **Embarazo.**
- **Alergias oculares.**



Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Instituto de Microelectrónica de Barcelona (IMB-CNM)

Campus Universidad Autónoma de Barcelona

08193 Bellaterra Barcelona - España





## **Anexo III**

Inocuidad del sensor flexible R5868-O2 en experimentales realizados en conejos de experimentación

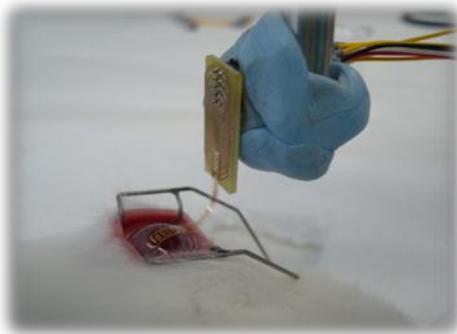


## ***Inocuidad del sensor flexible R5868-O2 en experimentales realizados en conejos de experimentación***

### **Introducción**

Dentro del marco del proyecto *“Desarrollo de un nuevo método de diagnóstico no invasivo de la córnea basado en medidas de bioimpedancia usando micro-nano tecnologías”*, se han realizado números experimentos invivo para determinar y mejorar, en función de los resultados, las características del sensor flexible R5868-O2. Uno de los objetivos principales de estos trabajos ha sido, entre muchos otros, determinar la seguridad del mismo al realizar mediciones invivo en córnea de conejo.

Cabe destacar que todos los procedimientos que implicasen el uso de animales de experimentación en este proyecto, han sido previamente evaluados y aprobados por el Comité Ético en Experimentación y Bienestar Animal (CEEBA) de la Universidad de Valladolid.

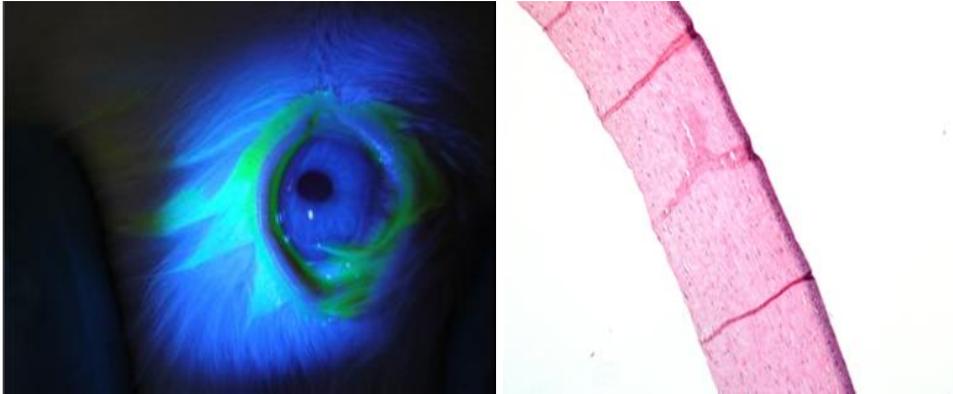


Las imágenes que a continuación se muestran han sido recogidas como representación de un alto porcentaje de animales que recibieron solamente la instilación de suero salino fisiológico inocuo, seguido de la aplicación del sensor de impedancia. Por un lado, se muestran las imágenes tomadas durante las observaciones con lámpara de hendidura (Kowa SL-15®, Kowa; Düsseldorf, Alemania) bajo la iluminación azul cobalto, necesaria para evidenciar la tinción fluoresceínica en aquellos casos en los que el epitelio corneal se encontrase ausente. Por otro lado, se muestran las imágenes correspondientes a la córnea del mismo animal postmortem, procesadas para microscopía óptica o microscopía electrónica de barrido.

En todas ellas, puede observarse la inocuidad del sensor en el momento de su aplicación, al no existir tinción fluoresceínica en ningún caso, ni lesión microscópica corneal representativa.

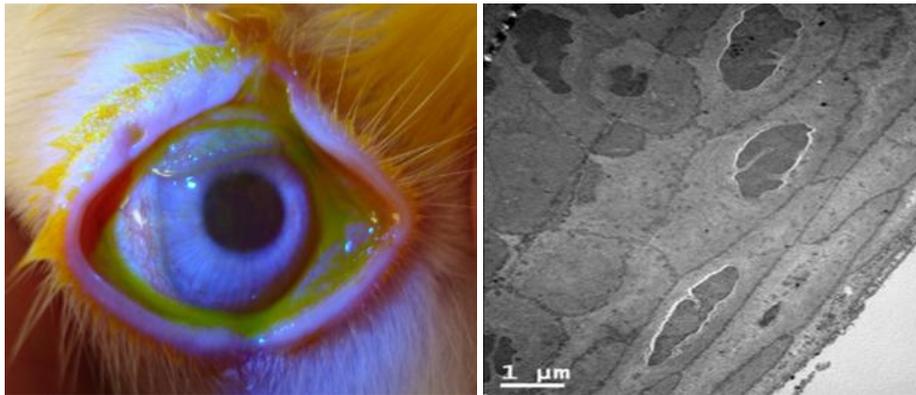
## Imágenes representativas

*Sujeto 1:*



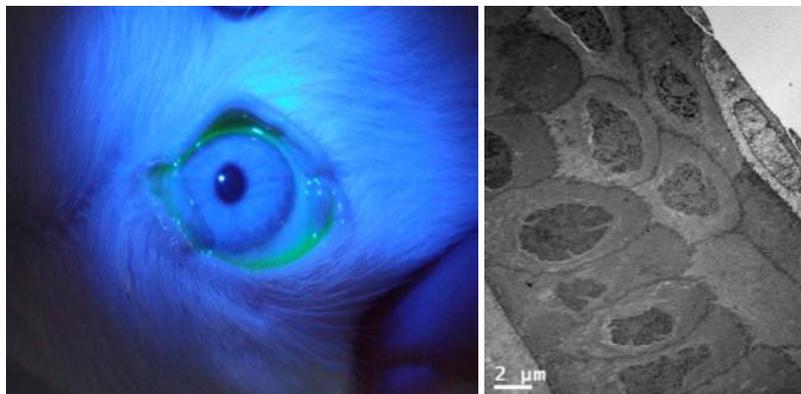
Imágenes correlativas (fluoresceína y microscopía óptica) de la córnea de un mismo individuo. No se observan cambios patológicos debidos a la aplicación del sensor en ninguna de las dos imágenes.

*Sujeto 2:*



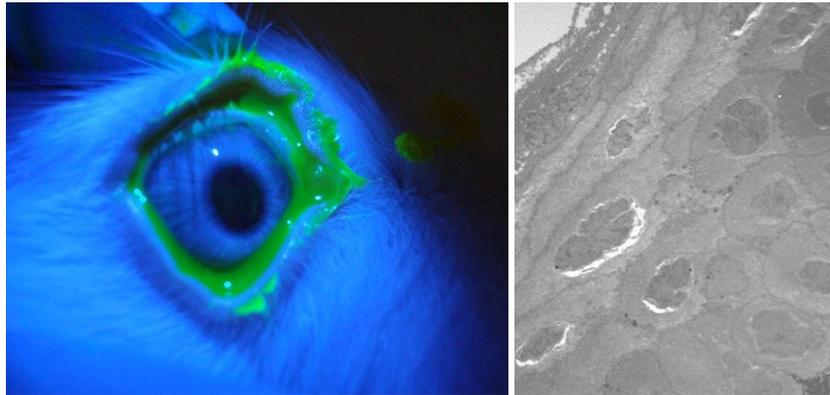
Imágenes correlativas (fluoresceína y microscopía electrónica) de la córnea de un mismo individuo en la que no se observan cambios patológicos después de efectuar las mediciones de impedancia.

*Sujeto 3:*



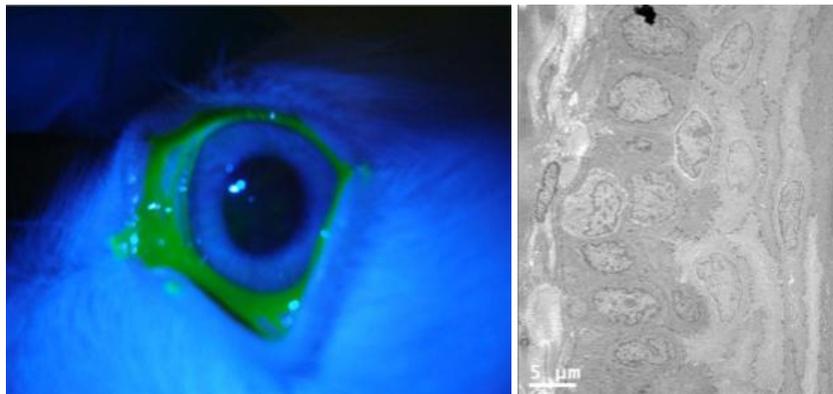
Imágenes correlativas (fluoresceína y microscopía electrónica) de la córnea de un mismo individuo. No se observan cambios patológicos tanto a nivel macroscópico como microscópico.

*Sujeto 4:*



Imágenes correlativas (fluoresceína y microscopía electrónica) de la córnea de un mismo individuo en la que no se observan cambios patológicos después de efectuar las mediciones de impedancia.

*Sujeto 5:*



Imágenes correlativas (fluoresceína y microscopía óptica) de la córnea de un mismo individuo. No se observan cambios patológicos debidos a la aplicación del sensor en ninguna de las dos imágenes.



## **Anexo IV**

Hoja de información para el sujeto para el estudio *“Evaluación de la sensibilidad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal (dispositivo CORBI)”*



**HOJA DE INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA  
TITULADO “EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL DISPOSITIVO DE MEDIDA DE LA  
BIOIMPEDANCIA CORNEAL”**

En la práctica clínica diaria en el campo de la optometría, oftalmología y contactología se utilizan diferentes técnicas para la evaluación del estado de la córnea de los pacientes. Actualmente uno de los retos de la biomedicina es conseguir utilizar técnicas de evaluación diagnóstica no invasiva, lo que siempre supone un gran avance y mejora de la calidad de la atención al paciente en las consultas, en este caso de optometría, oftalmología y contactología.

A lo largo de los últimos años se ha desarrollado con éxito una técnica de diagnóstico no invasivo basada en la medida de la bioimpedancia de los tejidos, formando parte a día de hoy de las consultas de cardiología, urología, unidades de trasplante de órganos, etc. entre otros. Desde hace unos meses se ha conseguido además desarrollar un terminal que pueda servir para su aplicación en el ojo humano, y de este modo poder obtener los datos de la bioimpedancia del mismo, consiguiendo una nueva técnica de evaluación diagnóstica no invasiva para las consultas de optometría, oftalmología y contactología.

Esta novedosa técnica se ha empleado ya con éxito en ojos de conejos, siendo ahora preciso comprobar la seguridad y la validez de este método en ojos humanos, y éste es el propósito de presente investigación clínica.

La aplicación del terminal del dispositivo que mide la bioimpedancia en el ojo puede provocar molestias y efectos secundarios. Entre estos efectos destacan reacciones de inflamación de la córnea o de la conjuntiva, úlceras y más gravemente y excepcional es el caso de infección corneal, si bien es muy improbable que estas puedan aparecer en un grado significativo. Pero en el caso hipotético de que Ud. presentara alguna complicación ésta sería tratada en el IOBA según los protocolos clínicos adecuados.

Para conseguir los objetivos del estudio es necesario que Ud. siga las pautas establecidas por su optometrista (en el caso de usuarios de lentes de contacto) o por su oftalmólogo (en el caso de pacientes que vayan a ser sometidos a cirugía intraocular). La medida de la bioimpedancia se incluirá en las pruebas de rutina que se realizan en la exploración optométrica/oftalmológica, no afectando en ningún momento en ningún aspecto a su vida cotidiana.

En cualquier momento podrá abandonar el estudio, con o sin motivo, sin necesidad de dar ningún tipo de explicación y sin que esto repercuta en el nivel de calidad asistencial que el IOBA le dispensará en el momento actual y futuro.

Si quiere efectuarnos alguna duda o pregunta no dude en consultar con cualquier miembro del equipo.

Muchas gracias por su colaboración.

Dr. Miguel Maldonado y Dr. Raúl Martín

Responsables del proyecto



## **Anexo V**

Consentimiento informado para el estudio *“Evaluación de la sensibilidad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal (dispositivo CORBI)”*



**Consentimiento informado para el estudio “Evaluación de la sensibilidad del dispositivo de medida de la bioimpedancia corneal”.**

D/Dña \_\_\_\_\_ con DNI \_\_\_\_\_ edad \_\_\_\_\_ años, con domicilio en \_\_\_\_\_ provincia de \_\_\_\_\_ manifiesto que he sido informado/a por \_\_\_\_\_ sobre los siguientes aspectos en cuanto a mi participación en el estudio arriba mencionado.

1. He leído la hoja de información que se me ha entregado.
2. Mi participación en este estudio es de forma voluntaria.
3. Acepto que se me realicen las exploraciones oftalmológicas y optométricas necesarias para el desarrollo del estudio.
4. Conozco y asumo los efectos secundarios que se puedan derivar de este estudio y que me han explicado los investigadores.
5. He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el estudio.
6. He hablado con el equipo investigador abajo firmante.

Por lo que declaro que todas mis dudas y preguntas han sido aclaradas, que he comprendido que mi participación es voluntaria y que comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Por ello doy mi consentimiento para participar en el estudio.

En Valladolid, a.....de.....de 2011

Firma del paciente

Firma del Testigo

Firma del Investigador

Estoy de acuerdo en que mis datos personales relativos a este trabajo sean almacenados, procesados electrónicamente y transmitidos, con propósitos de análisis de los datos derivados de este estudio. Doy mi consentimiento para que el personal autorizado del IOBA o las autoridades sanitarias revisen que el estudio se está llevando a cabo de manera correcta e inspeccionen mi historial referente a mi colaboración en el mismo.

Así mismo autorizo a mi investigador a que revele la información necesaria recogida en el estudio para que pueda ser procesada, sin que se revele mi identidad.

Fecha



## **Anexo VI**

Hoja de información para el sujeto para el estudio *“Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo”*



## Hoja de información para el sujeto

El uso de lentes de contacto para corregir defectos de refracción es un método seguro, cómodo y muy extendido en todo el mundo, calculándose que más de 40 millones de personas utilizan lentes de contacto todos los días. Durante el año 2010, el 91% de las lentes de contacto que se adaptaron en España fueron lentes de contacto hidrofílicas (también conocidas como lentes de contacto blandas). Su seguridad ha sido probada en numerosos estudios que las coloca a la cabeza como primera elección para la adaptación de lentes de contacto.

Es conocido que el uso de lentes de contacto afecta de diferente manera a la fisiología de la córnea dependiendo de cada persona y del tipo de lente de contacto. Ese efecto se puede medir con diferentes técnicas que son utilizadas en las consultas de Optometría y Oftalmología. Sin embargo, se han propuesto nuevos equipos útiles para la medida no invasiva de diferentes características de la córnea que apenas se emplean en la práctica habitual. Entre estas técnicas destacan nuevos equipos de microscopía especular que permiten captar una fotografía del endotelio (capa de células de la córnea más interna), la tomografía de coherencia óptica (OCT) que permite una visualización transversal de la córnea y la topografía de elevación (Orbscan) y Scheimpflug (Pentacam) que permiten estudiar los cambios en la topografía de las caras anterior y posterior de la córnea. Todas son técnicas no invasivas, sin efectos secundarios y seguras para la exploración ocular.

El propósito de este estudio es el de valorar el uso de las técnicas no invasivas de imagen anteriormente mencionadas para medir las variaciones que provocan el uso de lentes de contacto sobre las diferentes capas de la córnea y con ello mejorar las técnicas de adaptación de lentes de contacto.

Las lentes de contacto se utilizarán durante un breve periodo de tiempo (40 minutos), tras el cual serán retiradas. La superficie ocular y la córnea serán evaluadas mediante SP-3000p, 3D-OCT, Orbscan II y Pentacam para valorar la capacidad de estos aparatos de detectar los cambios tempranos provocados por el uso de lentes de contacto. También se emplearán las pruebas habituales para la exploración y adaptación de lentes de contacto, garantizando la seguridad de sus ojos.

Las posibles complicaciones de este estudio pueden ser las mismas que se derivan del uso de lentes de contacto como queratitis, conjuntivitis, úlceras y más grave y excepcionalmente el caso de infección corneal, si bien es muy improbable que estas puedan aparecer en grado significativo. Pero, en el caso hipotético de que Ud. presentara alguna complicación ésta será tratada en el IOBA según los protocolos clínicos adecuados.

Si quiere consultarnos alguna duda o pregunta no dude en consultar con cualquier miembro del equipo. Muchas gracias por su colaboración.

Raúl Martín Herranz



## **Anexo VII**

Consentimiento informado para el estudio *“Estudio IV. Asimetría del espesor corneal. Porte de LC a medio plazo”*



## Consentimiento informado

para el estudio *“Aplicación de la microscopía especular para evaluar la respuesta inmediata del endotelio corneal al uso de lentes de contacto”*

D/Dña \_\_\_\_\_ con DNI \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_ años de edad residente en \_\_\_\_\_ provincia de \_\_\_\_\_ manifiesto que he sido informado/a por \_\_\_\_\_ sobre los siguientes aspectos en cuanto a mi participación en el estudio arriba mencionado.

1. He leído la hoja de información que se me ha entregado.
2. Mi participación en este estudio es de forma voluntaria.
3. Acepto que se me realicen las exploraciones oftalmológicas y optométricas necesarias para el desarrollo del estudio.
4. Conozco y asumo los efectos secundarios que se puedan derivar de este estudio y que me han explicado los investigadores.
5. He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el estudio.
6. He hablado con el equipo investigador abajo firmante.

Por lo que declaro que todas mis dudas y preguntas han sido aclaradas, que he comprendido que mi participación es voluntaria y que comprendo que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos. Por ello doy mi consentimiento para participar en el estudio.

En Valladolid, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011

Firma del sujeto

Firma del Testigo

Firma del Investigador

Estoy de acuerdo en que mis datos personales relativos a este trabajo sean almacenados, procesados electrónicamente y transmitidos, con propósitos de análisis de los datos derivados de este estudio. Doy mi consentimiento para que el personal autorizado del IOBA o las autoridades sanitarias revisen que el estudio se está llevando a cabo de manera correcta e inspeccionen mi historial referente a mi colaboración en el mismo.

Así mismo autorizo a mi investigador a que revele la información necesaria recogida en el estudio para que pueda ser procesada, sin que se revele mi identidad.

Fecha

