



Universidad de Valladolid

Departamento de Física

**MEDIDA DE LA TRANSMITANCIA EN CÓRNEAS DE CONEJOS
MEDIANTE UN ESPECTROFOTÓMETRO**

Estudio del proceso de cicatrización

TRABAJO DE FIN DE MASTER (TFM)

Para Obtener el Título de:

Máster en Física y Tecnología de los Láseres

PRESENTADO:

SERGIO MATEUS. CHILAULE

SUPERVISOR:

SANTIAGO MAR

2016

MEDIDA DE LA TRANSMITANCIA EN CÓRNEAS DE CONEJOS MEDIANTE UN ESPECTROFOTÓMETRO

Estudio del proceso de cicatrización



Universidad de Valladolid



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

2016

**“La mente que se abre a una
nueva idea, jamás volverá a
su tamaño original”**

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Para poder finalizar esta memoria hay dos cosas fundamentales destacables, primero la vida divina y la segunda es el auxilio familiar. Por esa razón, agradezco a dios por la vida y a mis padres Mateus y Carlota, y toda la familia por la fuerza, cariño, soporte y confianza que tienen depositado en mí, para que continuase con los objetivos trazados.

A ti te agradezco por ser una persona muy valiente y siempre firme en lo que haces, siempre estarás en mi corazón hasta los tiempos, “Gracias por cuidar de lo que a mí me pertenece y por soportar esta larga espera”.

Un gran agradecimiento va para mis profesores del master de la UVA y USAL, que durante las clases fueron mi fuente de inspiración en el mundo de la ciencia. A los directores del master Julio San Román y Juan Carlos. En Particular agradezco a mi tutor Santiago Mar, por la simpatía, enseñanzas y profesionalismo, principalmente por el auxilio alado que me ha proporcionado. Al grupo de biología molecular un especial agradecimiento, a María Carmen, Patricia y Elvira, por todo el trabajo hecho en el día de las mediciones. Igualmente agradezco a los profesores de la Escuela de Idiomas de Salamanca, por sus clases beneficiosas, antes solo sabía decir “hola”, en especial agradezco a Vega, por las clases alegres y extrovertidas.

Gracias a todos los compañeros de clases que siempre estuvieron conmigo en los momentos agradables y malos de mi estancia aquí en Castilla y León, fue un placer compartir todas las cosas buenas, en particular con nuestras distintas culturas.

Para finalizar agradezco al Servicio de Relaciones Internacionales de la UVA, sección ERASMUS MUNDUS por esta oportunidad única, de haberme aceptado para frecuentar un curso de pos-gradación y por este auxilio que dura ya un año, desde junio antes de venir a España, votos de una larga amistad y auxilio continuo siempre si fue necesario. Agradezco mucho al programa DREAM, coordinado por la Universidad de Porto, sin su apoyo este proyecto no sería posible. Gracias por el apoyo financiero y principalmente por este sueño “DREAM” realizado.

RESUMEN

El estudio de la transparencia corneal, ha despertado interés de numerosas investigaciones en el campo de óptica y ciencias biológicas. Desde el siglo XIX hasta hoy se han desarrollado experimentos y dispositivos mejorados para su cuantificación. Los resultados obtenidos fueron mejorando de acuerdo con el aparato y mejoras introducidas. Pero a pesar de todas esas mejoras aún no tenemos un modelo que aclare la transparencia corneal. Por otro lado, en algunos de los procedimientos de corrección de ciertas enfermedades ligadas a la transparencia corneal, ha sido probado que después de dichos procedimientos surgen procesos indeseados que agravan cada vez más la enfermedad. Considerando la importancia de esta propiedad para la humanidad, en el presente trabajo se presentan los resultados de las mediciones de la transmitancia corneal, como factor determinante de la calidad de las imágenes que se forman en la retina, acreditando que tales resultados experimentales podrán mejorar la explicación de los factores adversos a la pérdida de transparencia contribuyendo así a la creación de un modelo de transparencia corneal más completo.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
1- INTRODUCCIÓN	1
1.1-Motivación	2
1.2-Objetivos del TFM	3
1.3-Estructura del Trabajo	3
2- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN GENERAL DE LA CÓRNEA	4
2.1-Estructura de la Córnea	4
2.1.1-Epitelio	5
2.1.2-Membrana de Bowman	5
2.1.3-Estroma	6
2.1.4-Membrana de Descemet	7
2.1.5-Endotelio	7
2.2-Propiedades Biomecánicas de la Córnea	8
2.3-Parámetros la Córnea Normal	9
2.4-Errores Refractivos	10
2.4.1-Corrección de errores refractivos con cirugía Refractiva	11
2.5-Queratoconos	12
2.5.1-Tratamiento de Queratoconos	13
3- REPASO TEÓRICO DE LA TRANSMITANCIA CORNEAL	15
3.1-Transparencia corneal y Significado Teórico de la Transmitancia	15
3.1.1-Scattering Corneal	15
3.1.2-Reflexión & Absorción	17
3.2-Medida de la Transparencia Corneal	19

4- MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	22
4.1-Materiales	22
4.1.1-Animales	22
4.2-Dispositivo Experimental y Desarrollo del Experimento	23
4.2.1-Espectrofotómetro	23
4.2.3-OMA2	23
4.2.3-Cámara Corneal	25
5- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
6- CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS	37
6.1- CONCLUSIONES	37
6.2- TRABAJOS FUTUROS	38
7-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS I	42

LISTA DE FIGURAS Y DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización de las células corneales madres	4
Figura.2: Corte del epitelio corneal	5
Figure.3: Estroma Corneal.	6
Figura.4: Medición de señal del Analizador de Respuesta Ocular	9
Figura.5: Visión normal y anormal	10
Figura.6: Procedimiento de la Técnica PRK	11
Figura.7: Procedimiento de la Técnica LASIK	12
Figura.8: Córnea Normal y con queratoconos	13
Figura.9: Lentes de contacto duras	13
Figura.10: El ojo con queratoconos corneal y tras trasplante corneal	14
Figura.11: Implante de anillo	14
Figura.12: Espectro de absorción de la córnea, humor acuoso, cristalino y de la transmitancia	18
Figura.13: Transmitancia a través de la córnea humana	19
Figura.14: Transmitancia promedia en función de la longitud de onda	21
Figura.15: Procedimiento de extracción de las córneas	22
Figura.16: Dispositivo Experimental (espectrofotómetro)	23
Figura.17: Esquema interno de la cámara OMA.	24
Figura.18: portacórneas	25
Figura.19: Ilustración de otros componentes del espectrofotómetro	26
Figura.20;21;22&23: Transmitancia de CC en función de la longitud de onda	29
Figura.24;25;26&27: Transmitancia de CD en función de la longitud de onda	32
Figura.28: Comparativa entre transmitancias sanas y dañadas.	34
Figura.29: Transmitancia promedia en cada muestra de tejido corneal	35
Figura.30: Irradiancia en función de longitud de onda.	35
Figura.31: Transmitancia calculada en función de la densidad de fibras y de longitud de onda	36

LISTA DE TABLAS

Tabla.1: Densidad endotelial según la edad	7
Tabla.2: Controle de las mediciones	27
Tabla.2.1: Parámetros para medida de la transmitancia de CC	28
Tabla.2.2: Parámetros para medida de la transmitancia de CD	31
Tabla.3: Parámetros de la córnea de conejo	36

1-INTRODUCCIÓN

La aplicación de la física en ramas como la biomedicina ha permitido desarrollar nuevas técnicas para la medida de magnitudes que influyen en la calidad óptica de la córnea y del cristalino, tal desarrollo permitió un avance en el conocimiento de los mecanismos de formación de imágenes en la retina y de los elementos causadores de algunos procesos biológicos (como la acomodación, la presbicia y el envejecimiento del sistema ocular o miopía). La física ha procurado evaluar la calidad de las imágenes formadas a la retina, permitiendo la comprensión de cuestiones como: ¿cuáles son los principales factores que contribuyen a la degradación de la calidad óptica ocular, en qué condiciones se asocia tal degradación? - ¿Cómo se sistematizan los componentes ópticos oculares para optimizar la calidad de imagen y cuáles son las posibles formas de corrección de las imperfecciones oculares adversas?

Dichas imperfecciones igual a las aberraciones clasificadas, pueden producir un emborronamiento de la imagen retiniana, o sea reducen la transparencia y limitan el intervalo de frecuencias espaciales de la imagen, es decir, el grado de detalle {1}. Una de las principales magnitudes físicas asociada a la pérdida de la transparencia ocular es la transmitancia corneal, su medida en los tejidos corneales va a providenciar los datos del estado de la transparencia corneal.

Para la medida de esta magnitud, se ha desarrollado dos técnicas comúnmente usadas para la medición de la transparencia corneal ex vivo, la primera basada en lámpara de tungsteno y otra basada en láser {2}, mientras se desarrollaba también el espectrofotómetro {3}.

En la presente memoria, se empleó un aparato basado en el espectrofotómetro para la toma de medidas de las muestras de los tejidos corneales. Tal aparato fue construido para medir la transmitancia en distintas longitudes de onda, principalmente en el espectro visible.

1.1-Motivación

El máster de Física y Tecnología de los Láseres es un curso inter-universitario, coordinado por la Universidad de Valladolid (UVA) y la Universidad de Salamanca (USAL), ambas disponen de varios campos o líneas de investigación adjudicadas en su plano de formación. Eso torna factible para realización de este TFM, incluyendo mediciones de la transmitancia basado en láser en el visible y por otro lado la extensión de estas medidas en otras zonas del espectro electromagnético.

Aún no existe un acuerdo completo sobre una explicación de la transparencia de la córnea, aunque han sido desarrollados varios modelos para su explicación. Solamente para ejemplificar, de acuerdo con {4} el grosor de la córnea, la estructura del estroma, el índice de refracción y su orientación, el espaciamiento del colágeno, queratocitos y el nivel de hidratación en la córnea son considerados los factores principales que contribuyen a la luz difundida.

Segundo {5} los factores que pueden alterar la transparencia corneal están ligados con el cambio de las fibras de colágeno, incremento de la densidad de las fibras de colágeno, el cambio del índice de refracción en los componentes del estroma e incremento del grosor de la córnea.

Por lo tanto, hay necesidad de medir la transmitancia corneal para evaluar sus cambios con los factores mencionados y ver si se obtiene lo que ha sido predicho. Creyendo que estas determinaciones podrán ayudar a hacer estudios futuros de modelo más confiable que aclare la transparencia corneal, con la obtención de medidas desde el UV (ultravioleta) a IR (infrarrojo), regiones donde los valores de la transmitancia corneal aislada llegan pasaren los 90% {6}.

1.2-Objetivos del TFM

Los propósitos de este trabajo están en concordancia con el actual escenario que se observa, unido a la falta de fiabilidad en algunos procesos que explican la transparencia corneal y a los procesos indeseados que surgen tras la cirugía refractiva.

- Medir y analizar la magnitud óptica (transmitancia) en tejidos corneales, tanto en el visible especialmente en la región de 400 a 700 nm, así como en el infrarrojo y el ultravioleta cercanos.
- Identificar de los elementos determinantes de la transparencia corneal y por lo tanto de la pérdida de calidad visual.

En concreto se pretende evaluar la luz transmitida por la córnea tras los procesos de cicatrización, como los que aparecen en cirugía refractiva. Una vez determinadas estas magnitudes físicas de forma objetiva, se pretende conocer las causas que las originan, para proponer tratamientos que reduzcan los problemas asociados a esta cirugía.

1.3-Estructura del Trabajo

Este trabajo está compuesto de cinco apartados. Los capítulos 1 y 2 son correspondientes a la recopilación bibliográfica. El primero sirve para entrar con más detalles en las características de la córnea, concretamente en la estructura y función general de la córnea. El segundo es referente al repaso teórico de la transmitancia corneal (transparencia corneal, factores que la condicionan como el scattering, absorción, etc).

El Capítulo 3, es de los materiales y métodos empleados, en concreto los animales para la experimentación, el Espectrofotómetro usado como aparato de medida, desarrollo de las mediciones y el software de adquisición de los datos.

En Capítulo 4, se focalizará el análisis y su discusión y el último, capítulo 5 es de conclusiones y trabajos futuros.

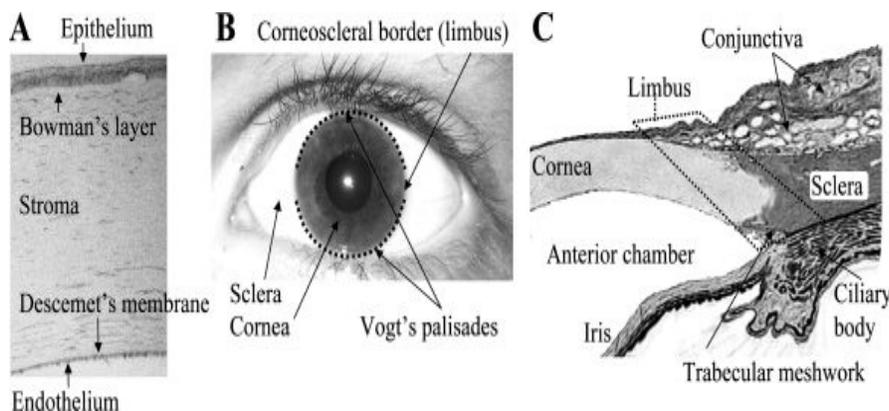
CAPITULO 1

2-ESTRUCTURA Y FUNCIÓN GENERAL DE LA CORNEA

La córnea es la parte más externa de la capa exterior del ojo y tiene una estructura transparente diferenciada, convexa y con el mayor poder refractivo del ojo humano. Como ventana sobre la parte delantera del ojo, la transparencia es una de las características más importantes de la córnea {7}. Es también una lente poderosa y suministra un poco más de 40D (dioptrías) de su poder refractivo total {8}. Debido a la falta de un suministro de sangre, el oxígeno no puede ser repartido a la córnea por los glóbulos rojos. Por lo tanto, la película lagrimal precorneal anterior absorbe el oxígeno del ambiente externo y lo proporciona a la córnea. Además, el humor acuoso protege el ojo con nutrientes esenciales. La córnea y su película lagrimal protegen el ojo de microbios, polvo y otras sustancias perjudiciales.

La estructura córnea y su función dependen de algunos factores, los más importantes están ligados con la densidad de las fibras de colágeno, el número de ellas, su diámetro, el índice refractivo de la córnea, el grosor corneal y la orientación del colágeno en la córnea {9}.

2.1-Estructura de la Córnea



De acuerdo con la referencia {10} la córnea es constituida por 5 capas, desde su superficie anterior a la posterior (Figura.1, plasmadas en A), el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio.

Figura 1. Localización de las células corneales madres. **A:** Capas de la córnea. **B:** Localización de limbo en la frontera esclera- Córnea. **C:** Sección transversal de las zonas de transición escleracorneal, en una córnea de un adulto {Lili Takács, et.al, 2009}.

2.1.1-Epitelio

El epitelio es la capa exterior y más anterior de la córnea. Es una región celular compuesta de algunas capas de células escamosas, es de alrededor de 50 micras grosor, 10 % del grosor total de la córnea {11}. La vida media de una célula epitelial es aproximadamente de diez días. Éste es el tiempo que tarda una célula de base en reproducirse y pasar a las capas superficiales. Debido a este fenómeno, el epitelio cura a menudo rápidamente si está dañado por un cuerpo extraño o después de algunas operaciones refractivas {8}.

Esta capa tiene funciones protectoras, funcionando de barrera frente a las agresiones externas. Solamente se han descrito 5 microorganismos capaces de traspasar el epitelio intacto: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, y *Corynebacterium spp* {12}.

También sirve para mantener la transparencia y la refracción de la córnea y por otro lado, actúa como estabilizador de la lágrima a través de las microvellosidades digitiformes.



Figura.2: Corte del epitelio corneal

{medicosdofuturo.blogspot.com.es/p/distrofia-fuch.html}

2.1.2-Membrana de Bowman

Esta capa contiene fibras de colágeno desorganizadas (rico en el colágeno de tipo IV y fibras laminares que también contiene colágenos de tipo I, III, V, VII, XII y XVI). El colágeno de tipo VII suministra el soporte para la adherencia de las células. La capa de Bowman también suministra la integridad estructural a la córnea y el daño de esta capa puede modificar la forma de la córnea, produciéndose cambios refractivos {13}.

Esta capa también actúa como barrera contra invasión por tumores o patógenos y mantiene la forma de la córnea. Al contrario que el epitelio, esta capa no tiene capacidad regeneradora y si se lesiona, se forma otra capa de características similares, la nueva no alcanza el espesor de la original {14}.

2.1.3-Estroma

Ocupa aproximadamente el 90 % del grosor de la córnea, sobre 0.5 mm de espesor, esta proporciona la calidad cristalina al tejido. Es compuesta por agua 78 %, colágeno 15 %, otras proteínas 5 %, glycosaminoglycan (sulfatos de queratina 0.7 % y sulfatos de condrotina 0.3 %) y sales 1 %. Estructuralmente el estroma consiste de varias capas o lamellae, cada una paralela a la superficie tisular. Tales lamellae están constituidas por fibras de colágeno. Existen cerca de 200 y 300 lamalae en el centro de la córnea humana y alrededor de 500 cerca de limbos {7}. El estroma también contiene queratocitos (fibroblastos achatados) que están situados entre las lamellae y conectados por procesos interconectados. Esas células producen colágeno y proteoglicanos, el mayor componente de la matriz extracelular estromal.

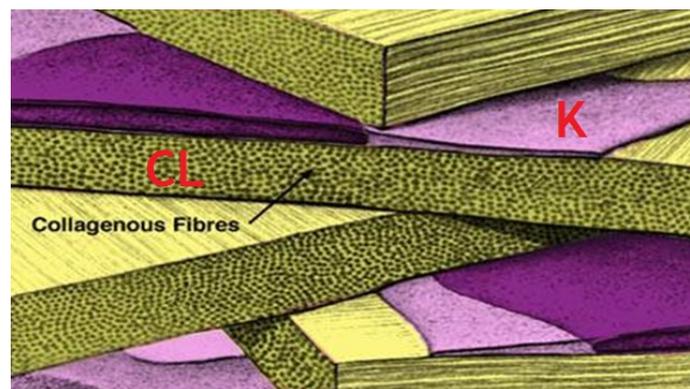


Figure.3: Estroma Corneal. Corte de lamellae corneal (CL) y de la queratocitos o keratocytes en inglés (K)
{slideshare.net/Lhacha/anatomy-and-physiology-of-cornea}

2.1.4-Membrana de Descemet

Esta capa es homogénea y fina, tiene entre 2 y 15 micras de grosor y está compuesta de colágenos de tipo IV y VII, laminina y fibronectina (que tiene el papel de fijar células a matrices celulares adicionales) {15}.

Su espesor aumenta con el paso del tiempo a un ritmo aproximado de 1 μm cada década, y su magnitud es de 3 μm al nacer hasta 8-10 μm en el adulto; creciendo más en las mujeres y llegando a casi el doble que en los hombres hacia los 70 años {14}. La membrana de Descemet provee la integridad a la córnea y mantiene la presión intraocular.

2.1.5-Endotelio

El endotelio es la capa posterior de la córnea, tiene 5 micras de espesor. Igual al epitelio esta capa tiene función en mantener la correcta hidratación del tejido. Las células epiteliales son ricas en mitocondrias. Cualquier daño de estas células, afecta la cantidad de fluido en la córnea. Una vez que el endotelio no tiene propiedades regenerativas, el daño de esta capa celular resultará en una pérdida de células activas y tendrá un impacto directo en el transporte de fluido. Con la edad hay una pérdida de la densidad endotelial (Tabla 1). Cuando una célula endotelial muere, las vecinas rellenan el espacio modificando su tamaño (polimegatismo) y forma (pleomorfismo) {16}.

Tabla 1. Densidad endotelial según la edad. Tabla adaptada de {16}.

EDAD	DENSIDAD CELULAR (células / mm^2)
Nacimiento	2,987-5.632 (Media: 4,252-4,425)
20-30 AÑOS	3,000-3,500
40-50 AÑOS	2,500-3,000
80 AÑOS	2,000-2,500
Límite funcional posterior	700-1,000

2.2-Propiedades Biomecánicas de la córnea

La medición de las propiedades biomecánicas corneales son unos de los factores fundamentales en la cirugía refractiva cuando tal medición puede detectar perturbaciones corneales. Como consecuencia de la naturaleza de viscoelástica de la córnea {17}, cualquier carga aplicada a la córnea cambiará sus propiedades de biomecánicas.

Se cree que el estroma tiene una fuerte influencia sobre las propiedades biomecánicas de la córnea humana {18}. La rigidez mecánica de las capas de estroma es más alta que las del endotelio y eso es porque el endotelio y el epitelio son estructuras esencialmente celulares {17}. Hay algunos factores de microestructura que influyen en las propiedades de la biomecánica de la córnea:

- La córnea tiene comportamiento híper- elástico porque la capa de estromal es predominante (90 % del grosor córneo en conjunto) y tiene una densidad alta de fibras de colágeno que dan a esta capa la hiperelasticidad y reducen la rigidez mecánica.
- La variación del grosor corneal entre las regiones central y periférica indica que la rigidez mecánica se incrementa fuera de la región central.
- Usar gafas de contacto por periodos largos causa hinchazón corneal, lo que produce un crecimiento del espacio entre las fibras de colágeno.
- Algunos desordenes corneales como queratoconos influyen en la biomecánica corneal. De acuerdo con estos factores cualquier alteración en la córnea puede afectar las propiedades biomecánicas de la córnea, por ejemplo, la cirugía con LASIK {20}.

Como podemos ver las propiedades biomecánicas corneal están relacionados con varios factores, por ultimo citamos un factor natural que es la edad. Debido al hecho de que el tejido corneal se pone más rígido cuando la edad aumenta, la presión intraocular aumenta {21}.

Mediante un Analizador de Respuesta Ocular (ORA- Ocular Response Analyzer) se registra dos mediciones de presión por aplanación (una cuando la córnea se mueve hacia el interior, y la otra cuando retorna). Los dos parámetros biomecánicos son la histéresis corneal (CH) y el factor de resistencia corneal (CRF).

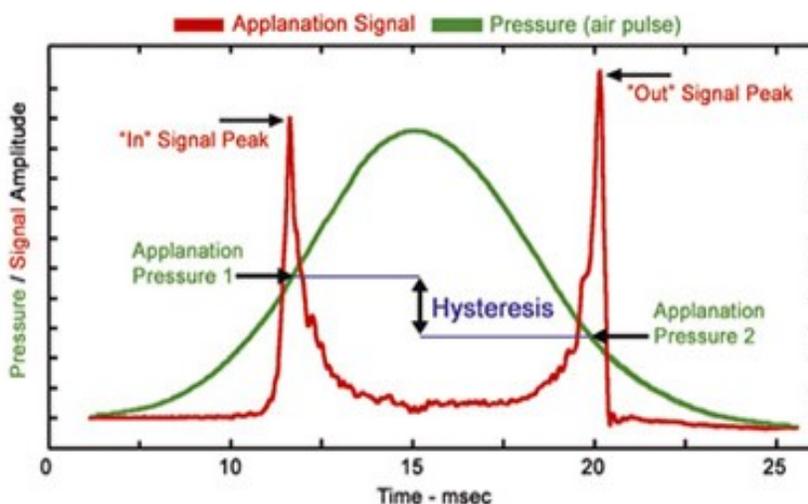


Figura.4: Medición de señal del Analizador de Respuesta Ocular
 {healio.com/ophthalmology/journals/jrs/2011-6-27-6}

2.3-Parámetros de la Córnea Normal

Antes de efectuar cualquier experimento o medición ligada a la córnea humana, es importante conocer sus parámetros. El valor medio de la curvatura anterior de la córnea para niños ha sido mostrado por la referencia {22}, es de 7.87 mm. Sin embargo, para adultos es de 7.95 mm. El diámetro de la córnea para adultos va desde 10.50 a 12.75 mm.

Por otro lado, la potencia corneal no cambia significativamente con la edad {23}. Para una córnea de un niño de 6 años la potencia corneal encontrada es 43.76D y de 14 años 43.37D. Para una córnea humana normal el grosor es alrededor de 520 micras y el rango la presión intraocular está entre 10 y 22 mmHg. La histéresis de córnea (CH) normal es de 11.19 mmHg (rango: 7.24 - 15.80 mmHg) y el factor de la resistencia corneal (CRF) es de 10.46 mmHg (rango: 5.37 - 15.74 mmHg) {24}.

2.4-Errores Refractivos

La visión normal que tiene una condición refractiva normal es llamada emetropía. En esta condición, los rayos paralelos de la luz son llevados a un enfoque sobre la retina cuando la lente está en un estado de acomodación relajado y la agudeza visual es 6/6 (en 6 metros) o mejor. Para una visión cercana, más o menos 40 cm, la lente puede acomodar para proveer una buena visión.

En contraste, si hay cualquier anomalía en la condición refractiva, el término ametropía describe una situación en que los rayos paralelos de la luz no son enfocados en la retina cuando el lente está en un estado de acomodación relajado, por lo tanto, la visión se pone poco clara. La ametropía puede ser dividida en tres categorías principales que son miopía, hipermetropía y astigmatismo. La miopía es la situación donde los rayos de la luz se concentran delante de la retina y son corregidos por una lente negativa. Hipermetropía es la situación donde los rayos de la luz se concentran detrás de la retina y son corregidos por una lente positiva. El astigmatismo es una diferencia en el grado de la refracción en meridianos diferentes donde los rayos de la luz son dispersados y no hay punto específico que la luz pueda focalizarlo, y esto es corregido por una lente cilíndrica.

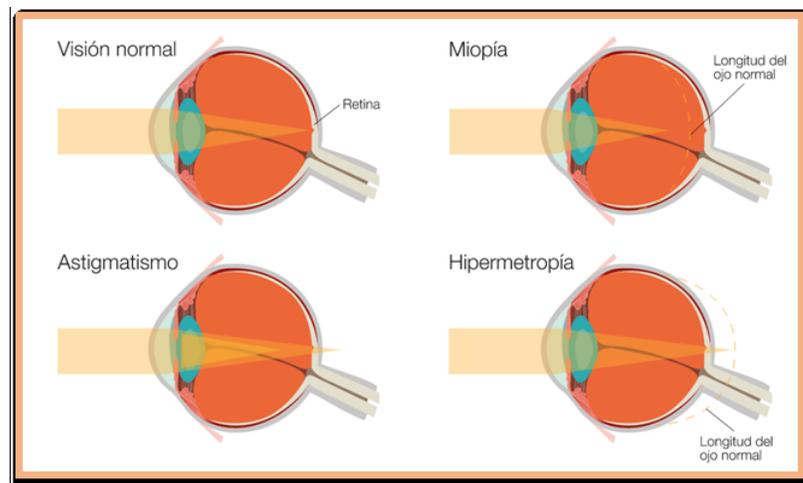


Figura.5: Visión normal y anormal

{gafasyvision.com/ametropia/}

2.4.1-Corrección de errores refractivos con cirugía Refractiva

El error refractivo como fue descrito anteriormente es una condición anormal que afecta la visión. Esta anomalía puede ser tratada en dos maneras diferentes, la no-quirúrgica (gafas o lentes de contacto- ved subtítulo 2.5.1) y la quirúrgica.

En la actualidad, la corrección quirúrgica por PRK (Photorefractive keratectomy) y LASIK (Laser-Assisted in Situ Keratomileusis) son las cirugías comunes para corregir los errores refractivos y utiliza un láser femtosegundo de excímero para alterar la curvatura de la córnea {12}.

2.4.1.1- Photorefractive keratectomy (PRK)

PRK es una técnica que usa el láser de excímero para corregir los cambios refractivos por ablación de la superficie corneal de acuerdo con la referencia {17}. Esta técnica se emplea inicialmente removiendo el epitelio, bajo anestésico local, mediante una lámina, o alcohol. Tras la retirada del epitelio, la superficie del estroma corneal es ablacionada usando un láser de excímer controlado por un ordenador para modificar la curvatura de la córnea. Después de la operación se recoloca la capa de epitelio de donde fue retirada.

A pesar de los resultados satisfactorios de PRK en la miopía baja y moderada, ha mostrado que algunas desventajas, como el desarrollo de la neblina en la córnea central, se demoran en la cicatrización de herida y la demora en la estabilización del resultado refractivo.

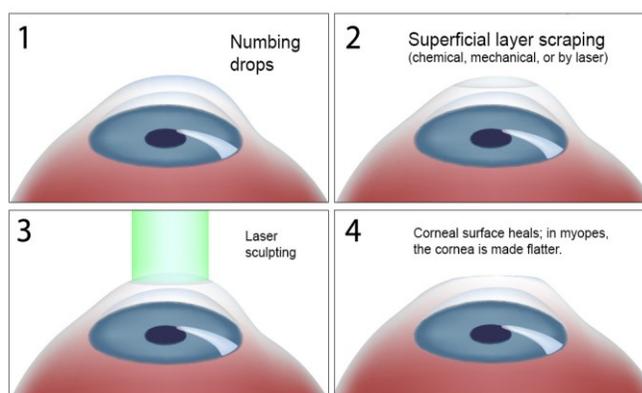


Figura.6: Procedimiento de la Técnica PRK:

{doctorawwad.com/patient_information.php?id=10&m=0}

2.4.1.2- Laser-Assisted in Situ Keratomileusis (LASIK)

La técnica LASIK es la más reciente que la de PRK, fue introducida por la primera vez en 1991 {26}. En esta técnica varias capas son levantadas, el epitelio, la membrana de Bowman y el estroma anterior, usando un microqueratoma para cortar el flap en la córnea. Por lo tanto, la ablación del estroma es llevado a cabo usando el mismo procedimiento como en LASEK {12}.

La técnica LASIK, tiene algunas ventajas sobre PRK, Incluyendo pocas molestias, neblina y regresión, recuperación visual rápida y poco tiempo de cicatrización del estroma lo que hace con que los resultados refractivos aparezcan rápidamente {25}.

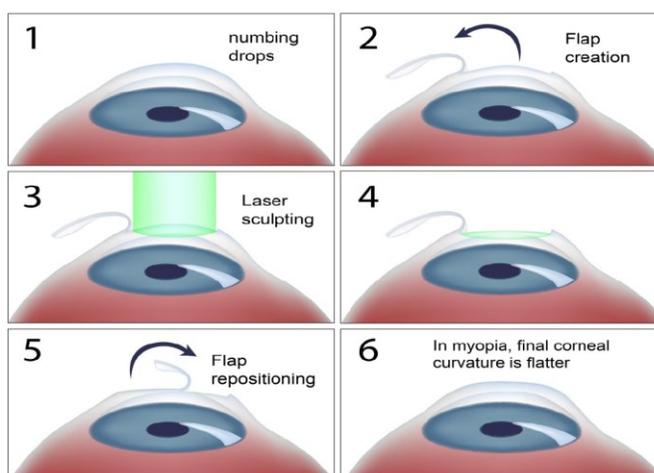


Figura.7: Procedimiento de la Técnica LASIK

{doctorawwad.com/patient_information.php?id=12&m=0}

2.5-Keratoconus

El término keratoconus (queratoconos), puede ser dividido en dos partes, kerato significa córnea y conus significa cónico o coniforme, juntos quieren decir córnea en forma de cono. Keratoconus es una condición no-inflamatoria degenerativa que es caracterizada por delgadez o reducción del estroma corneal y un incremento en su curvatura hacia una forma más cónica que normal {27}.

La keratoconus afecta cerca de 50 a 230 personas en un numero de 100,000 {28}. Cuando hay reducción del grosor de la córnea resulta en una miopía y un astigmatismo corneal irregular. La protrusión afecta a la calidad de la visión.



Figura.8: Córnea Normal y con keratoconus

{eyecarelondon.com/treatments/keratoconus}

Uno de los asuntos relevantes es que las personas que tiene esta enfermedad no quedan totalmente ciegas {29}. Generalmente, es un trastorno progresivo que afecta ambos ojos, pero inicialmente solamente un ojo es afectado {10}.

Esta enfermedad es común en personas que tiene debilidad en el tejido corneal por un desequilibrio de enzimas dentro de la córnea. También puede estar relacionado con la sobreexposición a los rayos ultravioleta solares, la irritación crónica del ojo y la fricción excesiva en el ojo.

2.5.1-Tratamiento de Keratoconus

Anteojos podrían ser suficientes en las etapas tempranas de keratoconus, pero las lentes de contacto son necesarias cuando la córnea se pone tan deforme que los anteojos no son eficaces para corregir la visión, es decir que el tratamiento depende del estado de la enfermedad, por eso hay varios métodos para el tratamiento de Keratoconus.



Figura.9: Lentes de contacto duras
{quradia.com/contact-lenses-hard-or-soft/}

Como había referido, las lentes son consideradas una solución temporal para esta enfermedad. En general las lentes de contacto rígidas son la mejor opción para esta enfermedad y son usadas en aproximadamente 90 % de pacientes {18}.

El uso de las lentes de contacto para algunas personas puede ser inapropiado debido al estado avanzado de keratoconus, que disminuye la eficacia de estas lentes en los enfermos. En este caso el trasplante corneal se torna la mejor opción {28}. Debido a la cicatriz en el eje visual, entre 10 y 20 % de personas que tiene esta enfermedad necesitan de un trasplante corneal {27}.

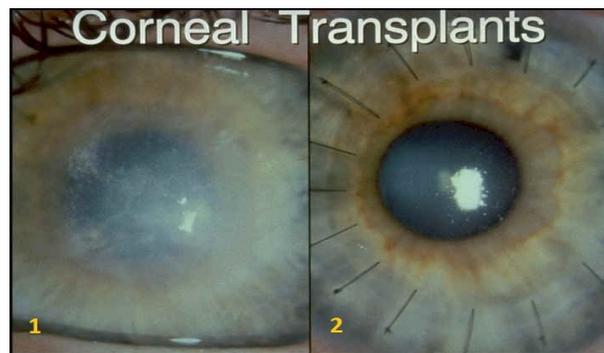


Figura.10: En 1, representa el ojo con keratoconus corneal y el 2, mismo ojo tras trasplante corneal
{eyesbyklein.com/types-of-treatments/corneal-transplant/}

El otro tratamiento de keratoconus es el uso de implantes de anillo, la idea principal de esta operación es el empleo de dos suplementos de plástico en la córnea para reducir la curvatura de tejido corneal queratocónico y hacer este tejido más plano.



Figura.11: Implante de anillo
{eyesonheads.co.nz/keratoconus.html}

CAPÍTULO 2

3-REPASO TEÓRICO DE LA TRANSMITANCIA CORNEAL

(TRANSPARENCIA CORNEAL, FACTORES QUE LA CONDICIONAN Y SU MEDIDA)

3.1-Transparencia corneal y Significado Teórico de la Transmitancia

La transparencia del estroma corneal ha sido estudiada desde el siglo XIX y el conceso general fue que la córnea necesitaba de ser ópticamente homogénea para que sea transparente {29}. La sugestión fue que las fibras de colágeno necesitaban de tener el mismo índice de refracción. Aún de acuerdo con {29}, estas ideas persistieron hasta la primera mitad del siglo XX, pero las medidas de los índices de refracción del colágeno corneal eventualmente demostraron diferencias significativas entre el colágeno y la matriz intersticial {30}.

La transmitancia (T) es definida como la proporción entre la irradiancia o intensidad de la luz transmitida a través del material y la irradiancia de la luz incidente sobre el mismo.

$$T = \frac{I_t}{I_o} = e^{-\rho k(\lambda)g} \quad (1)$$

g es el grosor de la córnea, ρ el número de densidad de fibras en la lamela típica y k constante de scattering. La transparencia corneal esta correlacionada al Scattering {31}, en seguida se muestra el comportamiento teórico del Scattering por colágeno de las fibras.

3.1.1-Scattering Corneal

Dada la estructura de la córnea, hay dos casos a ser considerados y distinguidos por un plano de polarización de la onda incidente. Si el vector campo eléctrico es paralelo al eje de la fibra, la luz es difundida uniformemente a todos los ángulos del eje y su amplitud a una distancia d es dado por:

$$E_{||} = \frac{1}{2} E \left(\frac{\lambda_0}{4d} \right)^2 \left(\frac{2\pi R}{\lambda_0} \right)^2 (n_c^2 - n_i^2), \quad (2) \text{ Donde } E \text{ es la amplitud de la luz incidente}$$

en el estroma, λ_0 la longitud de onda en el vacío, R radios de la fibra, n_c & n_i son índices de refracción de dos medios, fibras de colágeno y de sustancia o matriz extrafibrilla (fundamental).

Si el vector de campo eléctrico es perpendicular al eje de la fibra, la amplitud de la luz difundida a un ángulo \varnothing en dirección de la onda incidente es

$$E_{\perp} = \frac{1}{2} E \left(\frac{\lambda_0}{4d} \right)^2 \left(\frac{2\pi R}{\lambda_0} \right)^2 \left(\frac{n_c^2 - n_i^2}{n_c^2 + n_i^2} \right) \cos \varphi \quad (3)$$

De este modo también, definimos la energía difundida por cada longitud l , cuando la luz no polarizada incide sobre ella:

$$\zeta = \int_{-\pi}^{+\pi} \left[\frac{n_s c (E_{||}^2 + E_{\perp}^2)}{4\pi} \right] l d\varphi = \frac{n_s c E^2}{4\pi} \frac{\pi \lambda_0}{8} \left(\frac{2\pi R}{\lambda_0} \right)^4 (n_c^2 - n_i^2)^2 \left[1 + \frac{2}{(n_c^2 + n_i^2)^2} \right], \quad (4)$$

Donde c es la velocidad de la luz en el vacío, n_s índice de refracción del estroma. La luz difundida estará confinada dentro de dos planos pasando por la longitud perpendicularmente a la fibra. Dividendo la expresión (4) por la cantidad de la energía en el rayo incidente $\frac{n_s c E^2}{4\pi} l x$ por cada plano de polarización y multiplicándola por número de fibras $\frac{v_c \Delta g}{\pi R^2}$, la fracción de intensidad de la luz difundida es, entonces:

$$\Delta I = \frac{v_c \pi R^2}{\lambda_0^3} \left[1 + \frac{2}{(n_c^2 + n_i^2)^2} \right] (n_c^2 - n_i^2)^2 \Delta g \quad (5) \text{ Y definimos } k \text{ como la contante de}$$

scattering, dado por $k = \frac{v_c \pi R^2}{\lambda_0^3} \left[1 + \frac{2}{(n_c^2 + n_i^2)^2} \right] (n_c^2 - n_i^2)^2$, (6) entonces $\Delta I = k \Delta g$ (7).

I_x en la cantidad de energía es la área, el v_c es la fracción volumétrica del colágeno.

Para el grosor total de la córnea g , la fracción incidente de la luz difundida será:

$$I = 1 - e^{-\rho k g} \quad (8)$$

Conjugando la expresión (6) y (8), atendiendo que la constante de scattering $K > 1$, [7] encontró 94 % de la fracción I , la córnea deberá sufrir más scattering.

En la expresión (5) muestra que el estroma corneal podrá ser transparente si cualquier de los valores de R o $n_c - n_i$ fueren muy pequeños.

La luz difundida aparece por las fluctuaciones del índice de refracción. El tamaño de éstas debe ser mayor que la semilongitud de onda de la luz en el medio. Las fluctuaciones del índice pueden ser producidas por alteraciones microestructurales, organización irregular de la matriz extracelular o por las propias células del tejido [32].

3.1.2-Reflexión & Absorción

En el interior del ojo, pueden producirse reflexiones de la luz allí donde el índice de refracción cambie bruscamente, aumentando además con el ángulo de incidencia. La mayor diferencia del índice de refracción ocurre en el paso aire-córnea, luego será en esta superficie donde mayores pérdidas por reflexión se producirán. También ocurren reflexiones, aunque de mucha menor importancia, en la superficie posterior de la córnea, el cristalino y la retina, produciendo todo ello una disminución de la luz que llega a los fotorreceptores (conos y bastones).

La **absorción** de la radiación por los diferentes medios oculares, determina las longitudes de onda que alcanzan la retina. La córnea, absorbe esencialmente toda la radiación de longitud de onda inferior a 290 nm en la región ultravioleta, transmitiendo prácticamente toda la radiación visible (Figura.12C) y es un filtro muy importante para el infrarrojo, donde absorbe casi completamente toda la radiación a partir de 2 micras (figura.12D).

El cristalino es el principal responsable de las pérdidas de luz por absorción en el visible. Su absorción es más importante en el azul que en el amarillo y varía con la edad. En el ultravioleta, absorbe entre los 300 y 400 nm, siendo el filtro que evita que el UVA llegue a la retina. Por esta razón, en el caso de extracción del cristalino, podrá llegar a la retina del afáquico mucha más cantidad de UVA. En la región del infrarrojo, el cristalino transmite prácticamente toda la radiación (Figuras 12B y 12D)

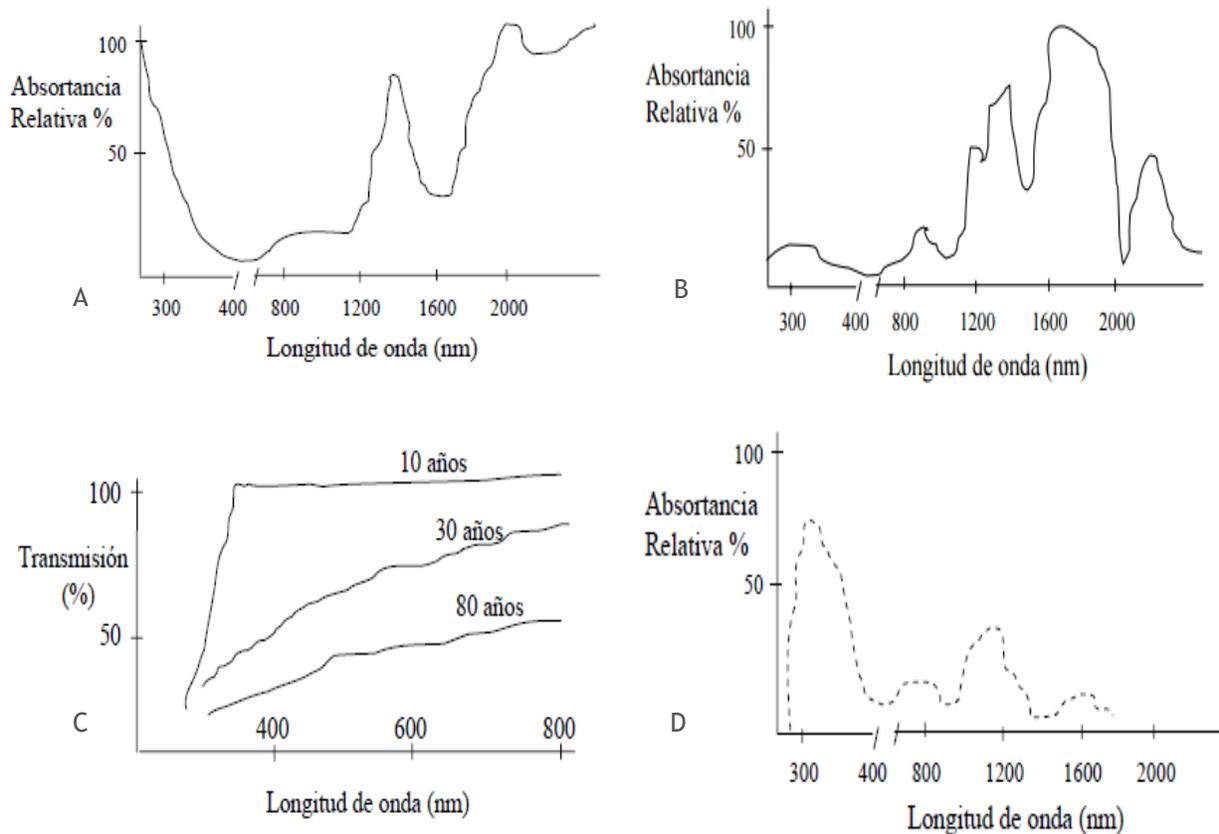


Figura.12: A) Espectro de absorción de la córnea, B) Espectro de absorción del humor acuoso; C) Transmisión espectral del cristalino en la región visible del espectro electromagnético para diferentes edades y D) Espectro de absorción del cristalino

{uv.es/artigas/Opt%20Oftal%20II/Tema%20V-Resumen.pdf}

3.2-Medida de la Transparencia Corneal

La luz difundida en la córnea puede ser evaluada usando un microscopio confocal, sin embargo, el espectrofotómetro es considerado un método más común y más usado frecuentemente para determinar la transparencia corneal. La tomografía de coherencia óptica (OCT) se puede también emplear para medir la transmitancia corneal central, pero no puede medir la región periférica de la córnea. Fue demostrado que la córnea humana es 94% transparente usando una fuente láser de argón Azul-Verde, por otro lado, la larga contribución de la luz difundida puede afectar las mediciones cuando el detector está montado dentro de la cámara anterior {32;33}.

De acuerdo con la referencia {34} la retención del fluido, que causa hinchazón en la córnea es factor influyente en la pérdida de la transparencia corneal. También ha sido demostrado clínicamente que el hinchazón corneal causa la visión borrosa.

Uno de los primeros intentos en medir la transparencia de córneas humanas aisladas fue llevado por {6} usando espectrofotómetro. Examinaron la transmitancia desde los 220 nm en la región ultravioleta (UV) hasta 2800 nm en la región infrarroja (Figura.13).

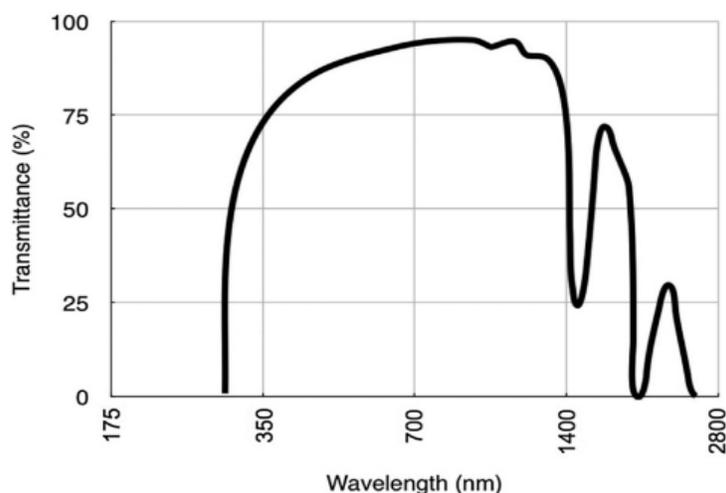


Figura.13: Transmitancia a través de la córnea humana en función de la longitud de onda. Boettner and Wolter (1962) y reproducido por Keith M. Meek*, Carlo Knupp (2015)

La transmitancia en UVB y UVC a través de la Córnea es muy poca porque el epitelio y el estroma contienen proteínas y vitaminas que pasan a absorber gran parte de la radiación y por lo tanto, protegen la córnea y los contenidos interiores del ojo. De acuerdo con Kolozsvari et al. (2002) y Boettner and Wolter (1962) ocurre más absorción de UV en las capas de córneas anteriores donde la transmitancia corneal aumentó rápidamente de 300 nm, llegando a 80 % en 380 nm y más de 90 % entre 500 nm y 1300 nm. Dos caídas de la intensidad transmitida en el infrarrojo fueron notadas en 1430 nm y 1950 nm que son causadas por la absorción de agua.

Van Best et al. (1988), usaron una fuente de lámpara de xenón y un detector fotodiodo, para medir la transmitancia en ambos ojos humanos y encontraron que la transmitancia en el centro de la región visible era independiente de la edad. Mismo experimento fue extendido a la región infrarroja, y una vez más, las diferencias de la edad no fueron notadas, {6} en la región de 600 nm y 1000 nm, el valor de la transmitancia era por cima de 95%.

Recientemente {12} midieron la transmitancia fuera del eje óptico, usando espectrofotómetro, demostrando que dentro de espectro visible, la transmitancia disminuye fuera del centro de la córnea.

McCally et al. (2007), observaron que la luz difundida en córneas dañadas de conejos a pesar de un largo tiempo de cicatrización persistía. En la gráfica 14 se puede notar que el scattering en las cicatrices no es uniforme, tres córneas modernamente transparentes (Grupo 1), cinco poco transparentes (Grupo 2) y una córnea opaca (Grupo 3). Esto está relacionado con la distribución de fibras desordenadas, mayor población significativa de las fibras y una posible contribución celular no se puede descartar.

Los espesores medios de las cicatrices y la córnea adyacente fueron respectivamente $0,26 \pm 0,04$ mm y $0,40 \pm 0,04$ mm y las heridas eran planas.

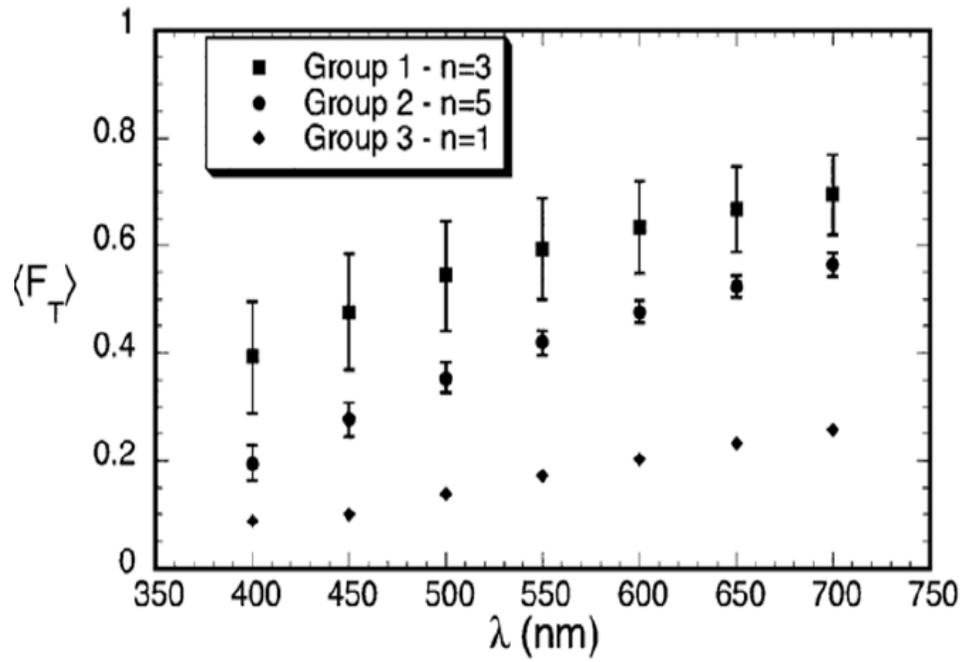


Figura.14: Transmitancia promedio en función de la longitud de onda para los grupos 1,2&3, con el espesor medio de las cicatrices de 0,26 mm.

{McCally et al. (2007)}

CAPÍTULO 3

4-MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

En este capítulo describiremos los materiales y métodos empleados durante el proceso de mediciones.

4.1-Materiales

4.1.1-Animales

Si dispone de 8 córneas de Conejos albinos (Nueva Zelandia), de 3 kg de peso y 4 meses de edad como animales de experimentación. Las córneas de los animales fueron divididas en 2 grupos: córnea de control (CC) sin herida y sin tratar; (CD) córnea dañada o con herida y sin tratar. En las CD, las heridas fueron realizadas mediante quemadura con una concentración de sosa (NaOH) de 0.5 Normal durante 60 s, en el ojo izquierdo, correspondiendo a una cicatrización de 1 mes. Los animales fueron sacrificados con inyección intracardiaca de Dolethal (pentobarbital) 1 ml bajo anestesia general. Para cada animal fue asignado un número de registro, para mejor control a la hora de emplearlos (tablas 2.1 y 2.2).

Las córneas fueron extraídas usando instrumental quirúrgico y prontamente colocadas en la cámara corneal, un proceso de unos 5 min aproximadamente. Las mediciones fueron realizadas mediante un espectrofotómetro disponible en el laboratorio de Óptica del Departamento Física Teórica, Atómica y Óptica de la Universidad de Valladolid.

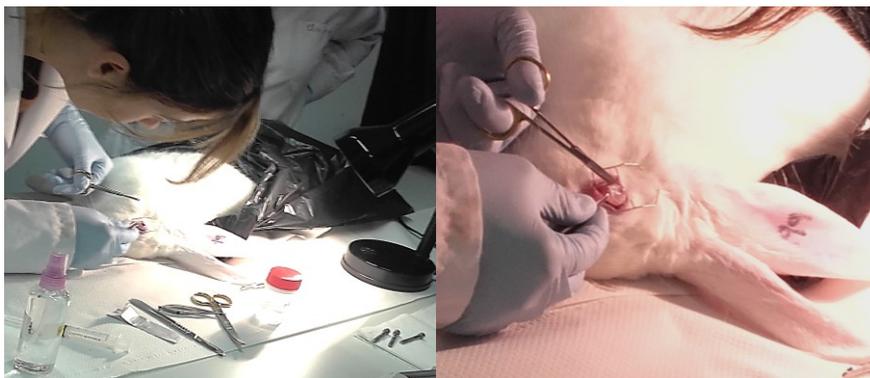


Figura.15: Procedimiento de extracción de las córneas

4.2-Dispositivo Experimental y Desarrollo del Experimento

4.2.1-Espectrofotómetro

En la figura.15 se presenta el esquema del dispositivo experimental, en esencia es un aparato donde esta acoplado el OMA2 (detector), el monocromador HR1500 y la cámara de córnea (figura.18), también incluye un obturador, un diafragma y una fuente de luz que proviene de lámpara blanca operando a 4 A de corriente. La lámpara emite luz con longitudes de onda del visible y infrarrojo cercano (400-1000 nm), que es conducida hacia la cámara que contiene la muestra a medir.

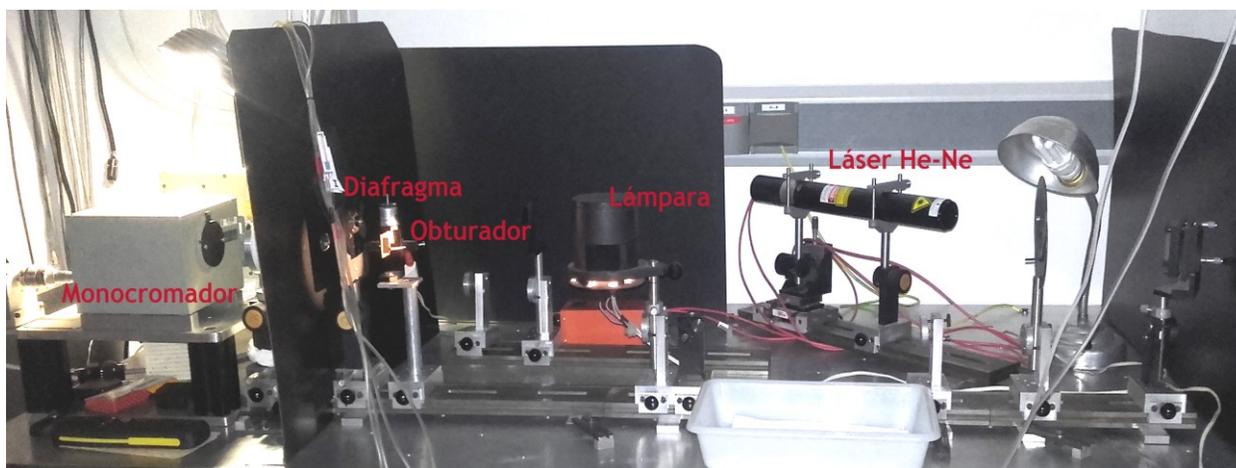


Figura.16: Dispositivo Experimental (Espectrofotómetro)

4.2.3-OMA2

Es una cámara que está formada por una matriz de 512 fotodiodos y un intensificador que consta de un fotocátodo, una placa microcanal (MCP), y una pantalla de fósforo. Cuando incide una radiación sobre el fotocátodo polarizado, se producen electrones o fotoelectrones, que son acelerados por una diferencia de potencial de 200 V, hasta la primera cara del MCP. El MCP consiste en un cilindro de 18 mm de diámetro y aproximadamente 1 mm de anchura, cuyas bases se encuentran metalizadas con el fin de que actúen como electrodos del intensificador. Unos microcanales de unos 10 mm de diámetro cruzan el cilindro, de tal forma que los electrones que salen del fotocátodo son acelerados debido a la diferencia de potencial de 1 KV que hay entre los electrodos. Los electrones una vez acelerados

chocan contra las paredes de los tubos, se arrancan nuevos electrones que también a vez repiten mismo proceso y provocando de esta forma un efecto avalancha.

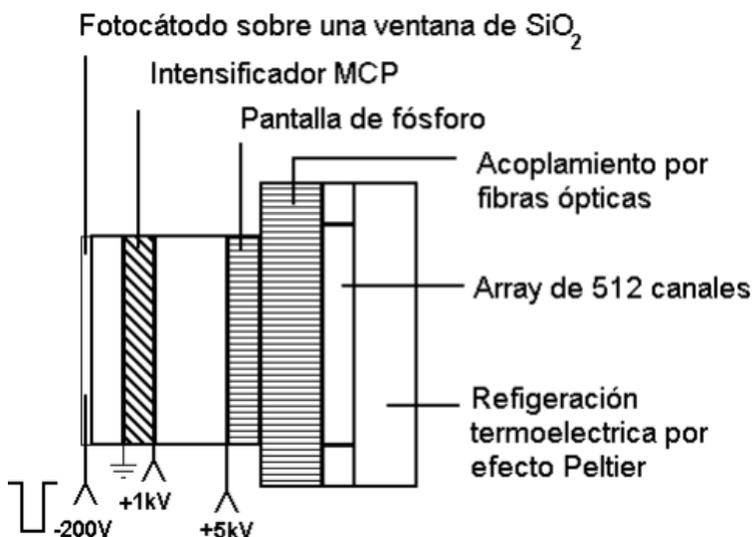


Figura.17: Esquema interno de la cámara OMA.

{Ramón Peláez de Fuentes, Estudio de las Regularidades en el Ensanchamiento Stark de los gases nobles una vez ionizados, tesis doctoral, UVA, 2008}

En la pantalla de fósforo los electrones son transformados en fotones debido a los impactos electrónicos dando lugar al efecto intensificador deseado. Una conexión entre el intensificador y el detector es asegurada por medio de fibras ópticas, de tal forma que los fotones que salen de la pantalla de fósforo sean detectados por una matriz lineal de 512 fotodiodos que tienen una anchura típica 25 micras. La señal producida por los fotodiodos es posteriormente recogida por un sistema amplificador.

El refrigerador termoeléctrico por efecto Peltier reduce el ruido térmico, de modo que la temperatura normal de trabajo es de unos $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Debido a estas bajas temperaturas, la superficie detectora está sometida a un flujo continuo de nitrógeno seco de 2.36 l/min , con el fin de evitar una posible condensación de vapor de agua que provocasen chispas que deteriorasen el detector durante su polarización.

El detector tiene dos posibles modos de funcionamiento: pulsado y continuo. El modo pulsado es utilizado en la captura de los espectros emitidos por el plasma. El modo continuo de adquisición consiste en una exposición de 15 ms de duración (aplicado para estas medidas).

4.2.3-Cámara Corneal

Consiste en una portacórneas y con cobertura en acero inoxidable, posee en sus extremos ventanas paralelas de vidrio Pyrex de diámetro ~1 cm. Dependiendo del índice de refracción del líquido que contiene la cámara, el máximo ángulo de difusión medible en el interior es de 54° . Sin embargo, la geometría del portacórneas impone un límite en 38° . Un líquido de mantenimiento termostatzado que generalmente suele ser suero fisiológico, circula permanentemente por el interior de la cámara.

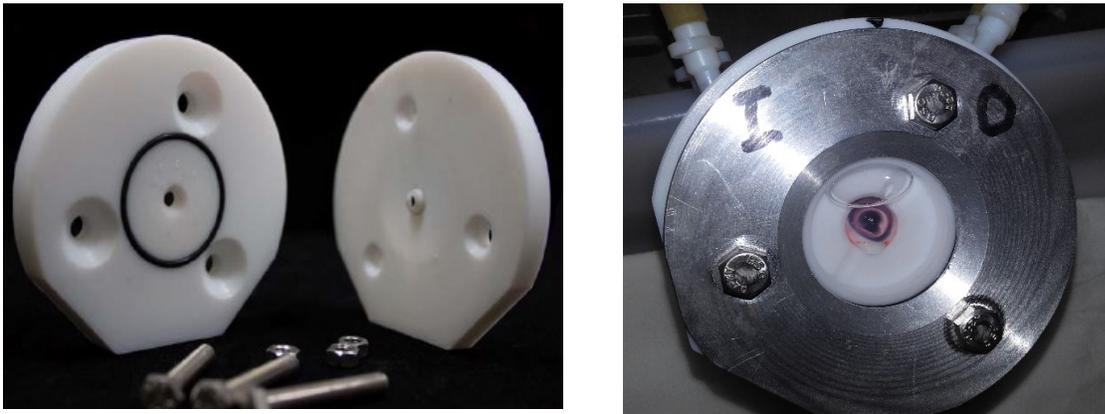


Figura.18: portacórneas

La córnea es colocada en la porta córnea con auxilio de pinzas en un tallado que posee misma curvatura que la córnea, con un agujero en el centro para permitir el pasaje de la luz. Una solución líquida (suero fisiológico) con una presión intraocular de 13 mmHg es introducida por medio de conectores a la cámara corneal, controlando las entradas y salidas, por forma a evitar burbujas que influirían en las medidas. Tras eso, cerrase las entradas y colocase la cámara corneal a una distancia de 550 mm a la entrada del obturador.

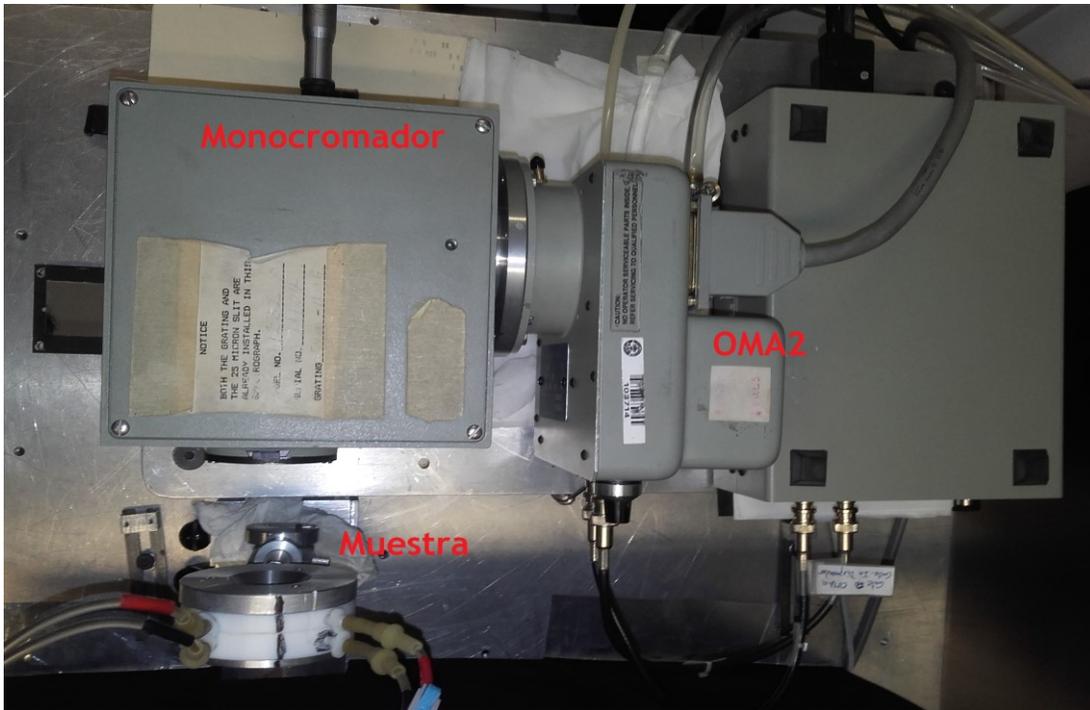


Figura.19: Ilustración de otros componentes del espectrofotómetro (cámara corneal, monocromador y OMA2)

El monocromador consiste de un grating que filtra la luz hacia al detector y posee también un par de espejos, un para colimar la luz y otro de focalización. El obturador permite seleccionar la luz de medida. Todo el sistema está controlado por ordenador, de modo que cada medida se puede programar con facilidad.

El proceso completo dura unos pocos minutos lo que evita que la córnea se deteriore. Con auxilio del programa LABOCALI, se configura los parámetros de calibración a través de funciones OMA2, calibrando la Ganancia, el rango de longitudes de onda (nuestro caso: 400 a 700 nm), el tiempo de exposición de 15 ms y el modo de operación (nuestro caso: continuo), Con estas medidas se obtienen información de la luz registrada en cada canal y de esta forma la transmitancia en función del canal y de la longitud de onda.

$$T(\lambda, canal) = T_{L.Blanca}(\lambda, canal) = C_{L.Blanca} \frac{I^d(\lambda, canal)}{I_{L.Blanca}^e(\lambda)} \quad (9), \text{ donde } C_{L.Blanca} \text{ es la constante,}$$

$I_{L.Blanca}^e(\lambda)$ y $I^d(\lambda, canal)$ ilustran la irradiancia relativa emitida y la información registrada en el canal, respectivamente.

Antes de efectuar cualquieras mediadas era imperioso alinear el sistema, para esto fue usado un láser de He-Ne (633 nm). Una vez alineado correctamente el sistema, se capturan los diferentes espectros sintonizando el monocromador entre los 400 y los 700 nm para la lámpara blanca, en pasos o incrementos de ± 5 nm. Las mediciones de la transmitancia fueron efectuadas en diferentes córneas, con duración mínima de unos 12 min por córnea, la descripción general en la tabla.2.

Tabla. 2: Controle de las mediciones

Grupo-Corneal	Situación	Nr. Córneas	Tipo de fuente	Ganancia	Incremento [nm]	Longitud de onda [nm]	OBS.
Control (CC)	sin herida o sana	4	Lámpara Blanca	400	± 5	400-700 700-400	Ved la Tabla.2.1
Dañada (CD)	con herida quemada	4	Lámpara Blanca	540	± 5	400-700 700-400	& Tabla.2.2

La anatomía ocular del conejo a pesar de no poseer la membrana de bowman, se asemeja a la de los humanos, tanto en sus capas corneales y así como en el espesor del estroma, por otro lado, el daño corneal y cicatrización se producen de forma más rápida en el conejo, siendo que su empleo para estudios es un factor de conversión a los humanos (más información en Anexos I).

CAPÍTULO 4

5- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para mejor identificación las córneas fueron divididas en córneas de control (CC) y córneas dañadas (CD) de acuerdo con la tabla.2.

Los datos fueron obtenidos en forma de irradiancia (I) en función de la longitud de onda (λ), de acuerdo con la expresión (1) fueron encontradas las transmitancias correspondientes a cada longitud de onda. Con auxilio de Matlab fueron dibujadas las respectivas gráficas en función de longitud de onda.

Tabla.2.1. Parámetros para medida de la transmitancia de CC

Grupo-Corneal	Situación	Tipo de fuente	Ganancia	Incremento (nm)	Longitud de onda	Figura
CC199D	sin herida y sin tratar	Lámpara Blanca	400	+5	400-700	20
CC200D	sin herida y sin tratar	Lámpara Blanca	400	-5	700-400	21
CC201D	sin herida y sin tratar	Lámpara Blanca	400	-5	700-400	22
CC202D	sin herida y sin tratar	Lámpara Blanca	400	-5	700-400	23

* CC199D- Córnea de Control número 199 del ojo derecho.

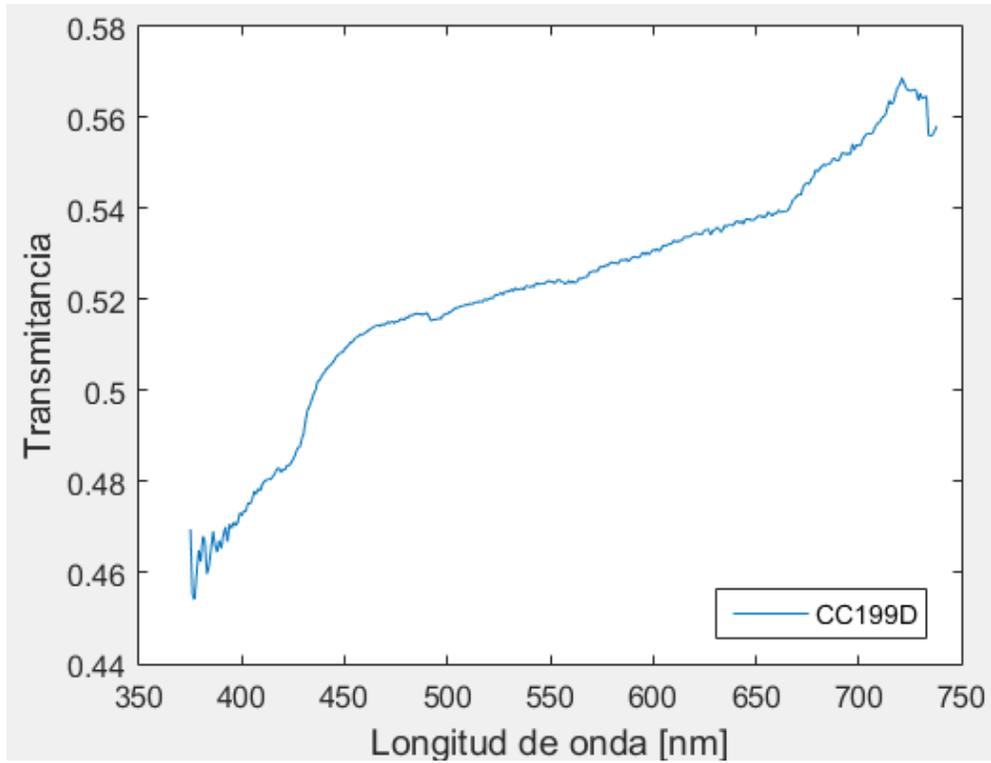


Figura.20: Transmitancia de la córnea de control 199 en función de la longitud de onda

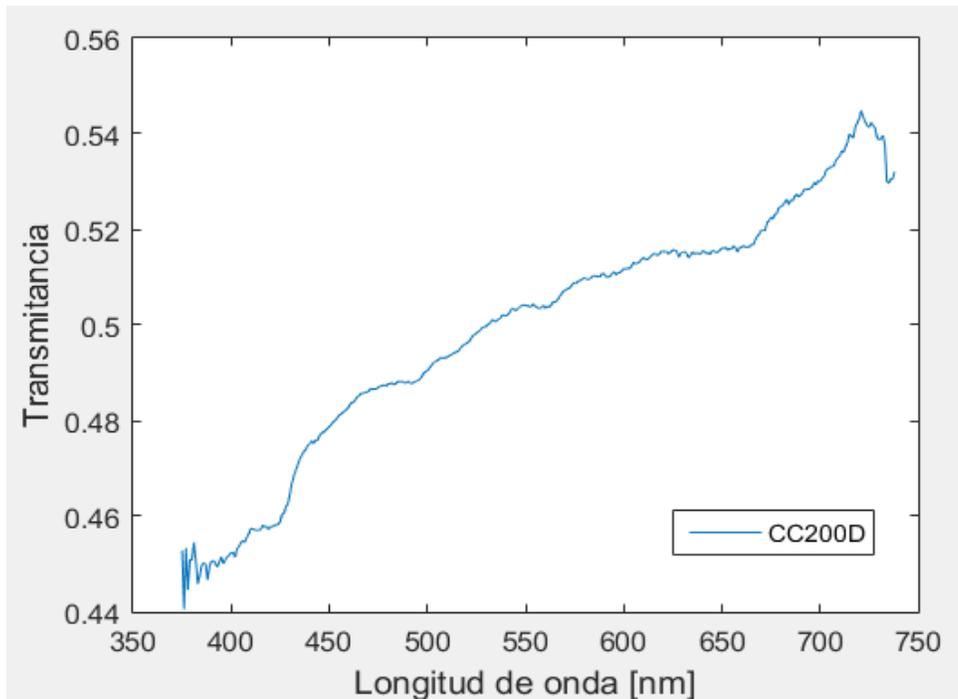


Figura.21: Transmitancia de la córnea de control 200 en función de la longitud de onda

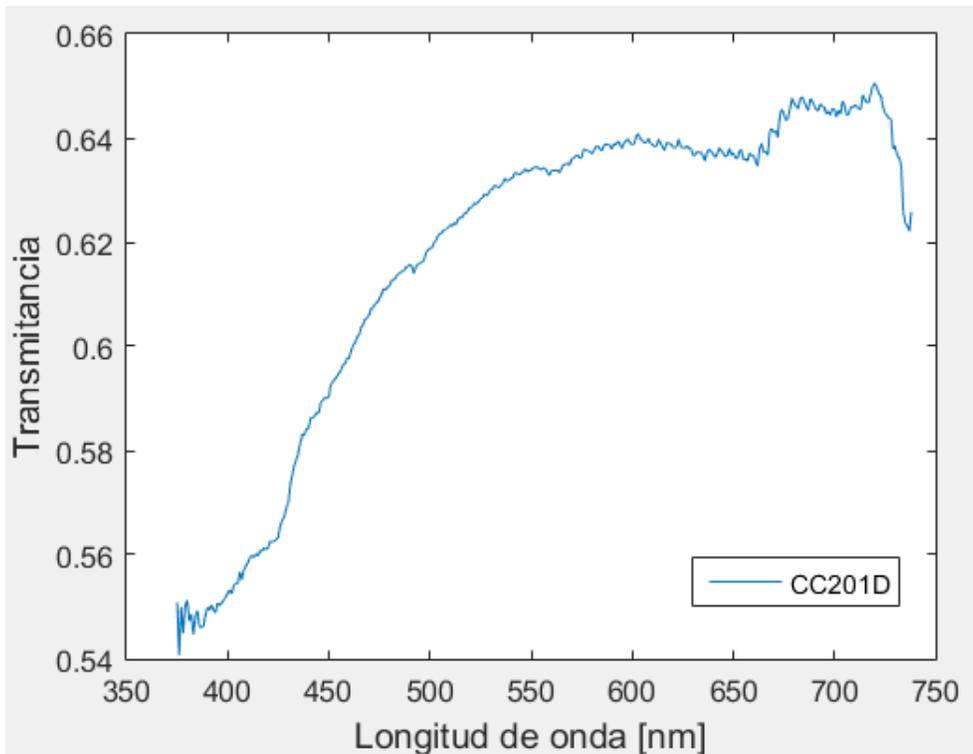


Figura.22: Transmitancia de la córnea de control 201 en función de la longitud de onda

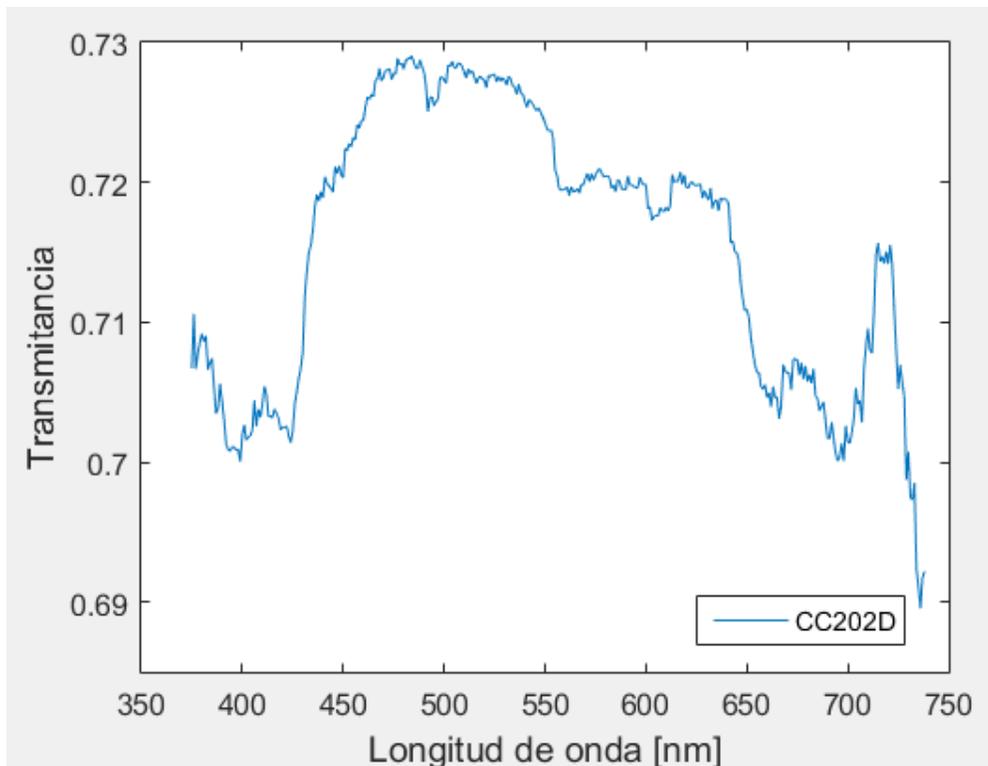


Figura.23: Transmitancia de la córnea de control 202 en función de la longitud de onda

En estas características gráficas fue empleada una ganancia de 400, una vez que una amplificación mayor redundaba en mediciones defectuosas, con mucho ruido y además el proceso se saturaba. Una ganancia menor que 400, para este tipo de córnea proporcionaba datos despreciables. Para las medidas en córneas dañadas se requería mayor amplificación, mayor herida corneal presupone mayor ganancia aplicada para una mayor eficacia de los datos, ejemplo de córneas obtenidas del matadero la ganancia aceptable estaba alrededor de los 740.

Las córneas de control 199, 200 y 201 son menos transparentes en la región de los azules y más transparentes en la región de los 717 nm con transmitancias máximas de 56.7%, 54.2% y 64.7% de respectivamente. Un comportamiento distinto de la CC202D, que es más transparente a los 484 nm con 72.8%. Tal comportamiento se esperaba una vez que la irradiancia o la porción transmitida a través de estas córneas es superior que las en dañadas, y además las CC absorben menos en casi todo el rango de mediciones.

Tabla.2.2. Parámetros para medida de la transmitancia de CD

Grupo-Corneal	Situación	Tipo de fuente	Ganancia	Incremento (nm)	Longitud de onda	Figura
CD199I	con herida y sin tratar	Lámpara Blanca	540	+5	400-700	24
CD200I	con herida y sin tratar	Lámpara Blanca	540	+5	400-700	25
CD201I	con herida y sin tratar	Lámpara Blanca	540	-5	700-400	26
CD202I	con herida y sin tratar	Lámpara Blanca	540	+5	400-700	27

** CD199I- Córnea dañada número 199 del ojo izquierdo.

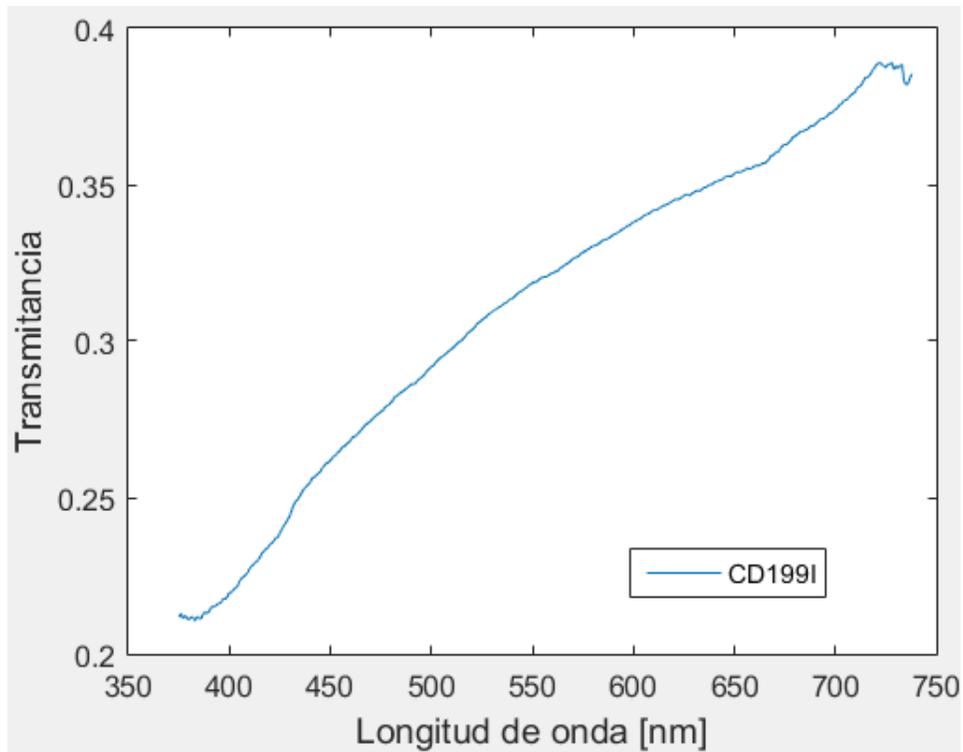


Figura.24: Transmitancia de la córnea dañada 199 en función de la longitud de onda

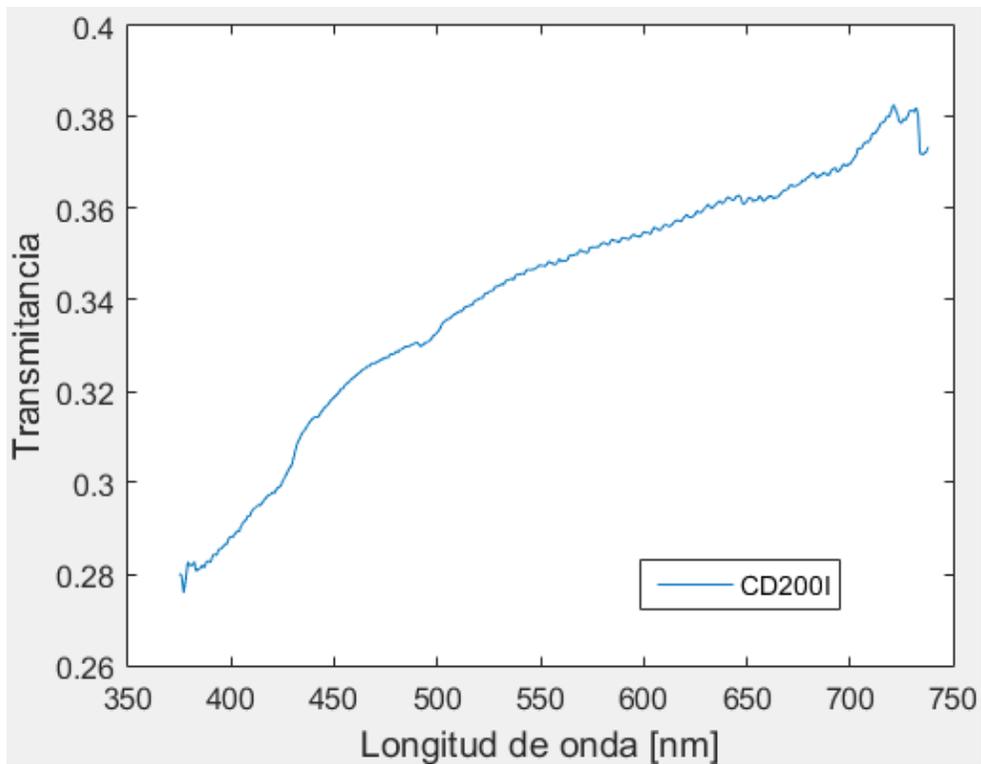


Figura.25: Transmitancia de la córnea dañada 200 en función de la longitud de onda

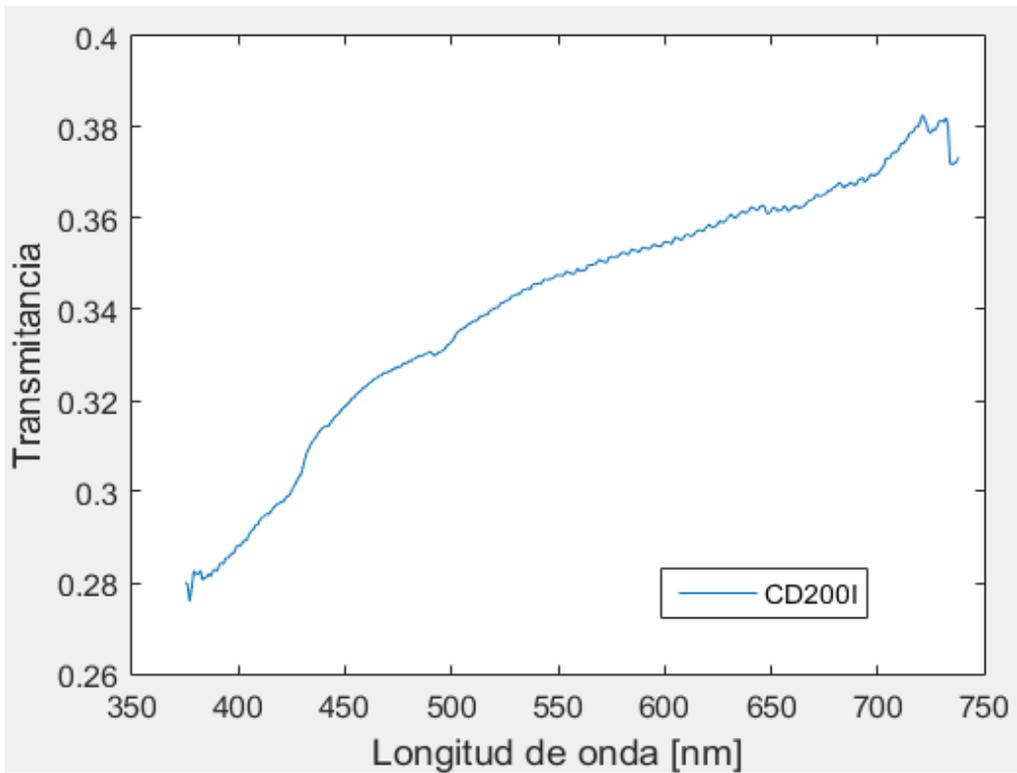


Figura.26: Transmitancia de la córnea dañada 201 en función de la longitud de onda

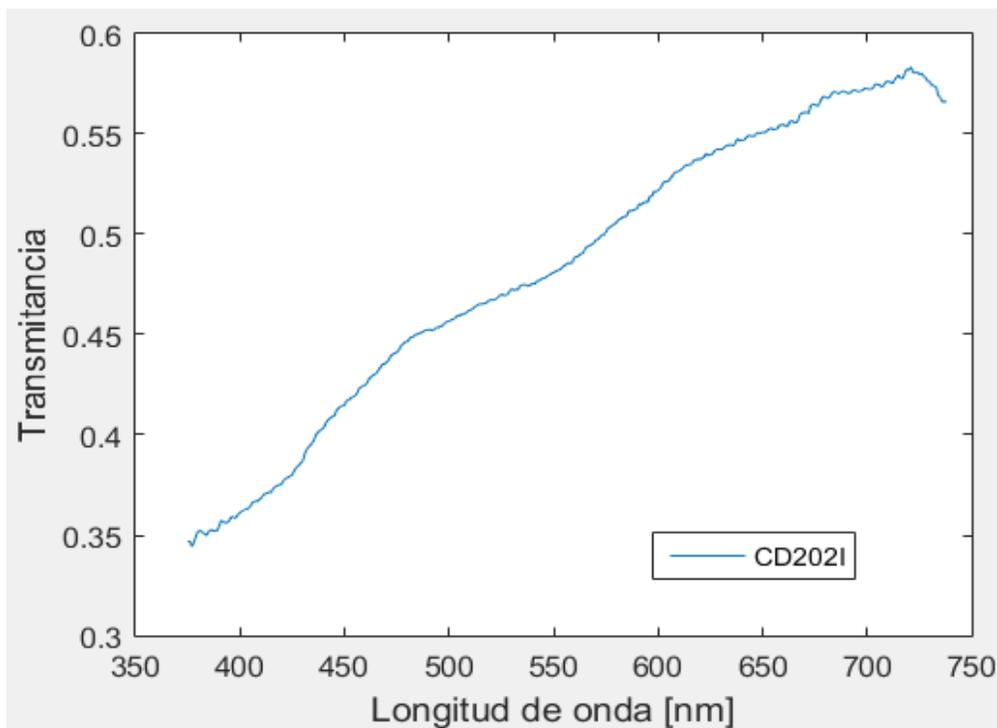


Figura.27: Transmitancia de la córnea dañada 202 en función de la longitud de onda

Las córneas dañadas 199, 200, 201 y 202, son las menos transparentes en los azules, con transmitancia mínima de ~21.3 % para la córnea dañada 199 y en general los valores más altos de la transmitancia fueron registrados en la región de los 722 nm, con 38.9%, 38.2%, 46.6% y 58.3% respectivamente. La córnea 202 tiene un comportamiento curioso a partir de 580 nm y 610 nm superando las CC 199 y 200, con menos transmitancia a partir de esta región, eso puede estar ligado a varios factores, córnea colocada adecuadamente y ausencia de burbujas en la cámara corneal, la herida provocada era ligeramente fuerte de entre otros.

En la región ultravioleta (~380 nm) la absorción es significativa y la luz transmitida es menor debido a existencia de proteínas que absorben fuertemente en esta región, factor normal para córneas fisiológicamente hidratadas. Una vez que la córnea de conejo no dispone de la capa de Bowman, el mayor porcentaje de esta absorción es proveniente del estroma y el resto del epitelio.

En general la absorción en el visible es poca y por cuenta de eso el scattering debería ser mínimo. La transmitancia es alta o crecente en la región de los 600 - 700 nm y poca para regiones ≥ 500 nm, siendo que esta va disminuyendo en la zona corneal periférica, eso es probablemente debido al incremento del diámetro de las fibras y de las fluctuaciones del índice de refracción entre las fibras y la substancia extrafibrilla.

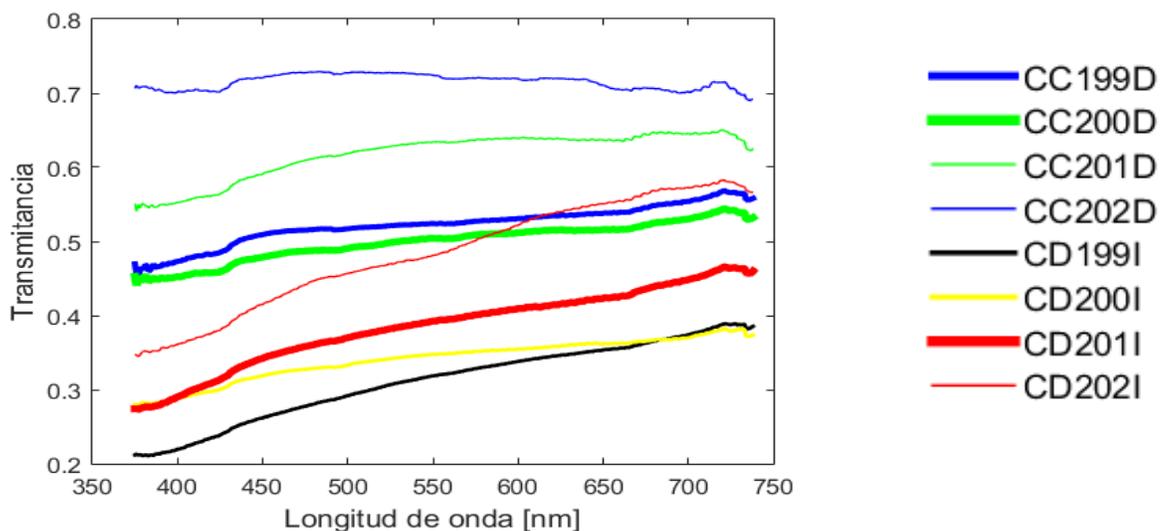


Figura.28: Ilustra una comparativa de las transmitancias sanas con las dañadas. Las córneas sanas tienen transmitancias entre 50% a un poco más de 70% siendo las más transparentes, y la dañadas poseen transmitancias menores que 50% por lo tanto las menos transparentes.

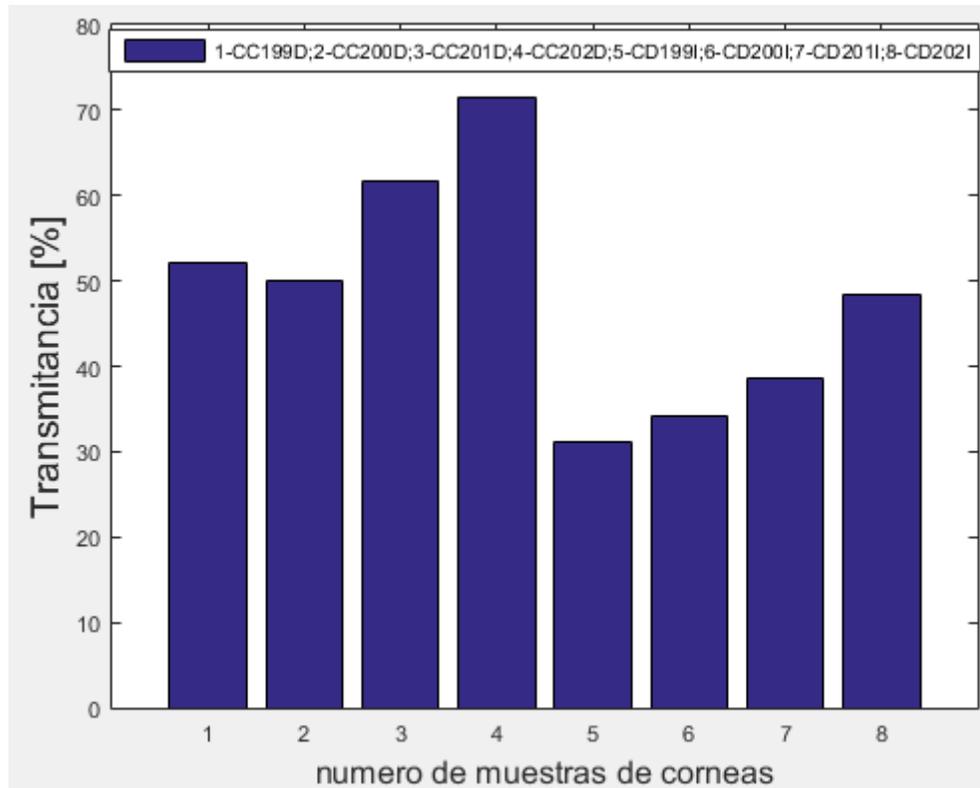


Figura.29: Transmitancia promedio en cada muestra de tejido corneal, la córnea de control 202D presenta mayor porcentaje de 72.8% y la córnea dañada 199I, menos transparente con 31.1%. La córnea dañada 202I tiene un comportamiento casi similar a la de control 200D

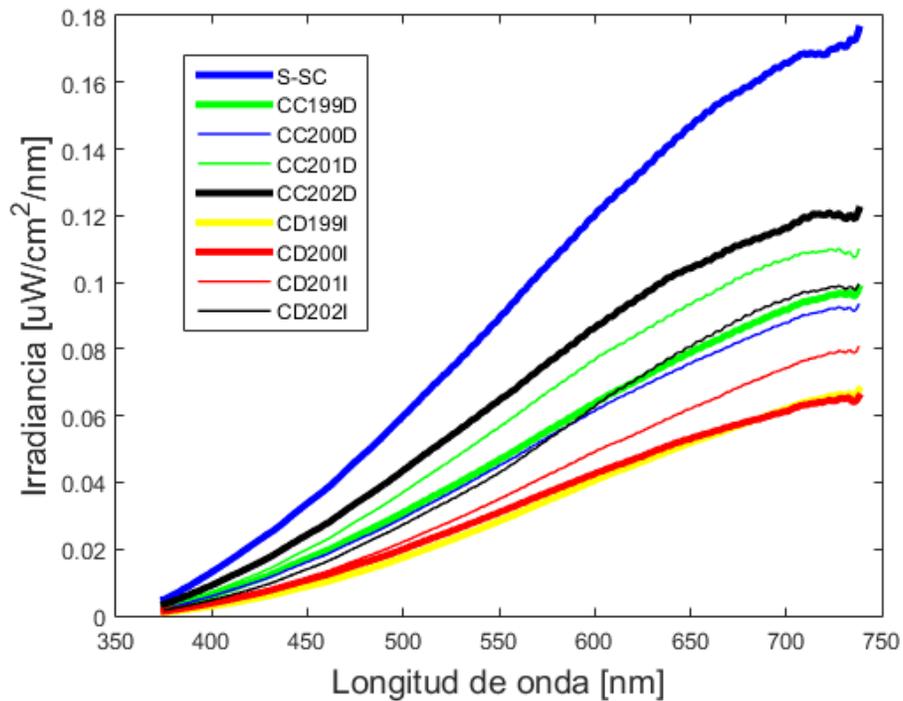


Figura.30: Irradiancia en función de longitud de onda. La irradiancia de soporte-sin córnea (s-sc) es mayor en relación a las de CC y CD

El perfil de las gráficas comparativas, demuestra que cuanto mayor es la herida corneal, más desorganizado es el tejido y además un numero grande de elementos van contribuyendo para el scattering y de esta forma para la disminución de la transmitancia. En esta comparación el valor alto observado de la transmitancia fue 72.8%, que revela que la absorción, el backscattering y la reflexión están contribuyendo en 27.2%.

Las expresiones (1) y (6) pueden ser analizadas considerando los parámetros de la córnea de la tabla.3 y un $k \leq 1$, mediante un programa en mathematica calculando la transmitancia del conejo en función de la longitud de onda y de la densidad de fibras.

Tabla.3: Parámetros de la córnea de conejo

PARAMETRO	VALOR
ÍNDICE DE REFRACCIÓN CórNEA	1.38
ÍNDICE DE REFRACCIÓN COLAGENO	1.416
ÍNDICE DE REFRACCIÓN SUBSTANCIA EXTRAFIBRILLA	1.365
ÍNDICE DE REFRACCIÓN ESTROMA	1.375
DENSIDAD DE FIBRAS [μm^2]	292 ± 70
DIÁMETRO DE FIBRAS [NM]	30.8
DIÁMETRO DE CórNEA [MM]	0.45

La transmitancia corneal es menor para mayores densidades de fibra y relativamente mayor para mayores longitudes de onda, la luz difundida en la córnea incrementa con el aumento del diámetro de fibras, por el incremento de la densidad de fibras y con las fluctuaciones del índice de refracción entre las fibras hidratadas y el de la matriz extrafibrilla.

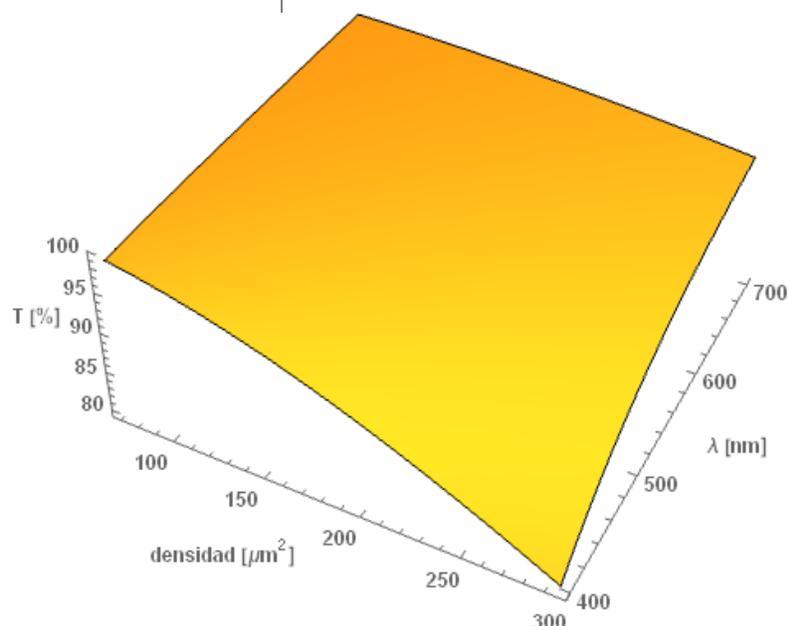


Figura.31: Transmitancia calculada en función de la densidad de fibras y de longitud de onda

CAPÍTULO 5

6-CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

6.1- CONCLUSIONES

Del estudio hecho en los dos grupos (CC y CD), con relación la transparencia corneal se obtienen las siguientes conclusiones:

Las córneas dañadas en general son menos transparentes en la región de los azules, siendo que la transmitancia mínima obtenida fue de 21.3% en la región de los 380 nm de la CD199I. Este comportamiento es aceptable una vez que la porción transmitida es inferior que difundida, facto también relacionado con el cambio del índice de refracción debido a los procesos indeseados que aparecen durante el proceso de cicatrización.

La CD202I tiene un comportamiento curioso en la región de 716 nm con ~ 58% siendo más transparente que las córneas de control 199D y 200D. Este comportamiento es razonable en córneas sanas o con pocas lesiones, sin embargo, se conserva en córneas con lesiones poco severas. Eso permite que las córneas con opacidad altas aún conserven una cierta capacidad de formar imágenes en la retina.

La córnea de control 202D es la más transparente en regiones de color azul y verde, 480 nm y 512 nm respectivamente, facto impresionante con ~73%. Eso ocurre porque la absorción, el backscattering y la reflexión están contribuyendo con ~27%.

De acuerdo con los resultados obtenidos, también podemos concluir que las córneas de conejos en general son menos transparentes, principalmente en las regiones de los azules donde la córnea absorbe más la luz, eso puede estar relacionados también a varios factores; aspectos estructurales, la geometría y disposición de la cámara corneal, el rango de medidas y el aparato empleado, usando espectrofotómetro dentro del espectro visible, la transmitancia disminuye fuera del centro de la córnea.

6.2- TRABAJOS FUTUROS

En este trabajo de fin de master quedamos con ideas de lo sucede en córneas sanas y dañadas sobre punto de vista de su transparencia y del estado de cicatrización. Para un diagnostico corneal más efectivo hay necesidad de considerar las líneas de investigaciones siguientes:

- Un factor de suceso, seria evaluar la transmitancia corneal envolviendo animales con distintas opacidades de forma masiva y principalmente tras tratamiento con distintos fármacos o con procedimientos quirúrgicos por forma a observar los distintos cambios y también para valorización de los resultados obtenidos.
- Extensión de las mediciones de la transmitancia corneal desde el UVA hasta la región de infrarrojo cercano, para una mayor profundidad del estudio.

7- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- {1} Study Group Ocular component data in schoolchildren as a function of age and gender. *Optom Vis Sci.* 80(3):226-36, 2003.
- {2} Boote C. et.al. Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties. *Journal of Structural Biology.* 149:1-6, 2005.
- {3} Buzard KA. Introduction to bio-mechanics of the cornea. *Refractive & Corneal Surgery.* 8:127-138, 1992.
- {4} Freund DE et. al. Effects of fibril orientations on light scattering in the cornea. *J Opt Soc Am A.* 3(11):1970-82, 1986.
- {5} Boote, C et.al. Quantification of collagen ultrastructure after penetrating keratoplasty e implications for corneal biomechanics. *PLoS One* 8 (7), 2013.
- {6} Boettner & Wolter. Transmission of the ocular media. *Invest.Ophthalmol. Vis. Sci.* 1, 776e783, 1962.
- {7} Maurice DM. The transparency of the corneal stroma. *Vision Res.* 10(1):107-8, 1970.
- {8} Newsome DA et al. Detection of Specific Collagen Types in Normal and Keratoconus Corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,1981.
- {9} Maurice DM and Monroe F. Cohesive strength of corneal lamellae. *Exp Eye Res.* 50:59, 1990.
- {10} Lee LR, Hirst LW and Readshaw G. Clinical detection of unilateral keratoconus. *Aust N Z J Ophthalmol* 23: 129-133, 1995.
- {11} Hennighausen H, et.al. Anterior-posterior strain variation in normally hydrated and swollen rabbit cornea. *IOVS.* 39:253-262, 1998.
- {12} Bansal AK and Veenashree MP. Laser refractive surgery: technological advance and tissue response. *Biosci Rep* 21: 491-512, 2001.
- {13} Farrell RA, et.al. Wave-length dependencies of light scattering in normal and cold swollen rabbit corneas and their structural implications. *J Physiol.* 233(3):589-612, 1973.
- {14} Arffa R C. Grayson. *Enfermedades de la Córnea.* Tomo 1. Anatomía. 4ª edición. Harcourt Brace, 1999.

- {15} Maurice DM. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 136: 263-2, 1957.
- {16} Marshall J, et.al. A comparative study of corneal incisions induced by diamond and steel knives and two ultraviolet radiations from an excimer laser. *Br.J Ophthalmol* 70: 482-501, 1986.
- {17} Buxton JN, Keares RH and Hoefle FB. The contact lens correction of keratoconus. Orlando: Grune & Stratton; pp.1-55. 1984.
- {18} Boote C, et.al. Lamellar orientation in human cornea in relation to mechanical properties. *Journal of Structural Biology*. 149:1-6, 2005.
- {19} Patel S, et.al. Refractive index change in bovine and human corneal stroma before and after LASIK. *IOVS*. 45(10), 3523-3530, 2004.
- {20} Djoyan GP, et.al. An Analytically Solvable Model for Biomechanical Response of the Cornea to Refractive Surgery. *J. Refract. Surg.* 123, pp. 440-445, 2001.
- {21} Elsheikh A, et.al. Experimental assessment of human corneal hysteresis. *Curr Eye Res* 33: 205-213, 2008.
- {22} Dubbelman M, et.al. Radius and asphericity of the posterior corneal surface determined by corrected Scheimpflug photography. 80(4):379-83, 2002.
- {23} Ucakhan O.O, et.al. In vivo confocal microscopy findings in keratoconus. *Eye Contact Lens* 32: 183-191, 2006.
- {24} Luce D.A. Determining in vivo biomechanical properties of the cornea with an ocular response analyzer. *J Cataract Refract Surg* 31: 156-162, 2005.
- {25} Gimbel HV, et.al. Incidence and management of intraoperative and early postoperative complications in 1000 consecutive laser in situ keratomileusis cases. *Ophthalmology* 105: 1839-1847, 1998.
- {26} Pallikaris IG, et.al. A corneal flap technique for laser in situ keratomileusis. Human studies. *Arch Ophthalmol* 109: 1699-1702, 1991.
- {27} Saelens IE, et al. Manual trephination of mushroom keratoplasty in advanced keratoconus. *Cornea* 27: 650-655, 2008.
- {28} Tuft SJ, Moodaley LC, et al. Prognostic factors for the progression of keratoconus. *Ophthalmology* 101: 439-447, 1994.
- {29} Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol* 42: 297-319, 1998.

- {30} Aurell G. & Holmgren H. On the metachromatic staining of the corneal tissue and some observations on its transparency. *Acta Ophthalmol.* 31, 1e27, 1953.
- {31} S. Mar, et al. Measurement of correlation between transmission and scattering during wound healing in hen corneas, 2009.
- {32} Best JA, et.al. Corneal transmission in whole human eyes. *Exp Eye Res.* 46(5):765-8, 1988.
- {33} Beems EM and Best JA. Light transmission of the cornea in whole human eyes. *Exp Eye Res.* 50(4):393-5, 1990.
- {34} Freund DE, et.al. Ultrastructure in anterior and posterior stroma of perfused human and rabbit corneas. Relation to transparency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 36(8):1508, 1995.

ANEXOS I

I.1. Revisión de la anatomía de la córnea de Conejo

La córnea de conejo ocupa aproximadamente 30 % del globo ocular y tiene un aspecto elíptico, mide 15 mm y 14 mm, horizontal y vertical respectivamente.

El epitelio tiene un grosor de 30 a 40 micras. Siendo que la funcionalidad son las mismas del humano. El estroma es la capa más gruesa, con mismo grosor del humano (450-550 micras), está compuesta por fibras paralelas del colágeno. la orientación de las fibras de colágeno es un factor determinante para las propiedades biomecánicas de la córnea, estas se organizan en fibras llamadas lamellae, con grosor de pocas micras. El colágeno de tipo I es la mayor macromolécula constituyente del estroma corneal. La membrana de descemet, tiene un espesor de ~ 8 micras que va variando constantemente, de forma que a los conejos adultos llega a ~ 15 micras. Asegura la transparencia corneal a través del auxilio fisiológico. Esta membrana corresponde la capa más resistente de la córnea que también sirve para dar soporte a las células endoteliales. Y cuanto al endotelio, este proporciona el mantenimiento de la transparencia corneal. La densidad celular igual en la de los humanos va disminuyendo con la edad, en conejos de 1 y 2 meses es de ~ 41,000 células/mm² de valor promedio, con 2 años decrece para 2000 células/mm².

I.2. Perfil de la irradiancia con respecto a longitud de onda

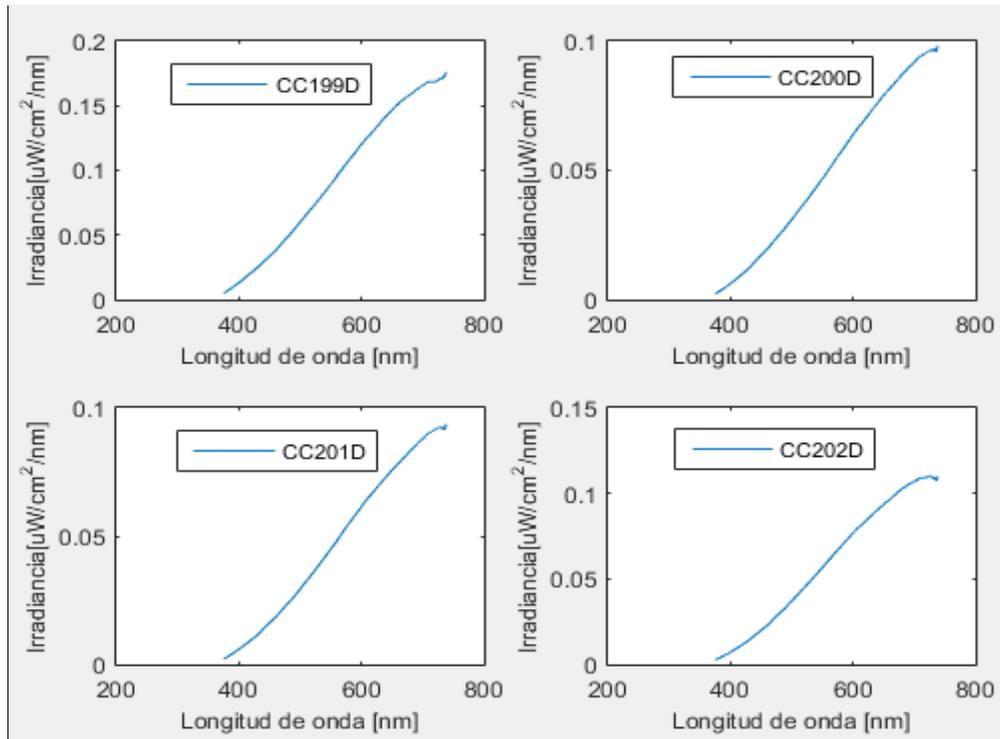


Figura.I.1: Irradiancia de córneas dañadas en función de la longitud de onda

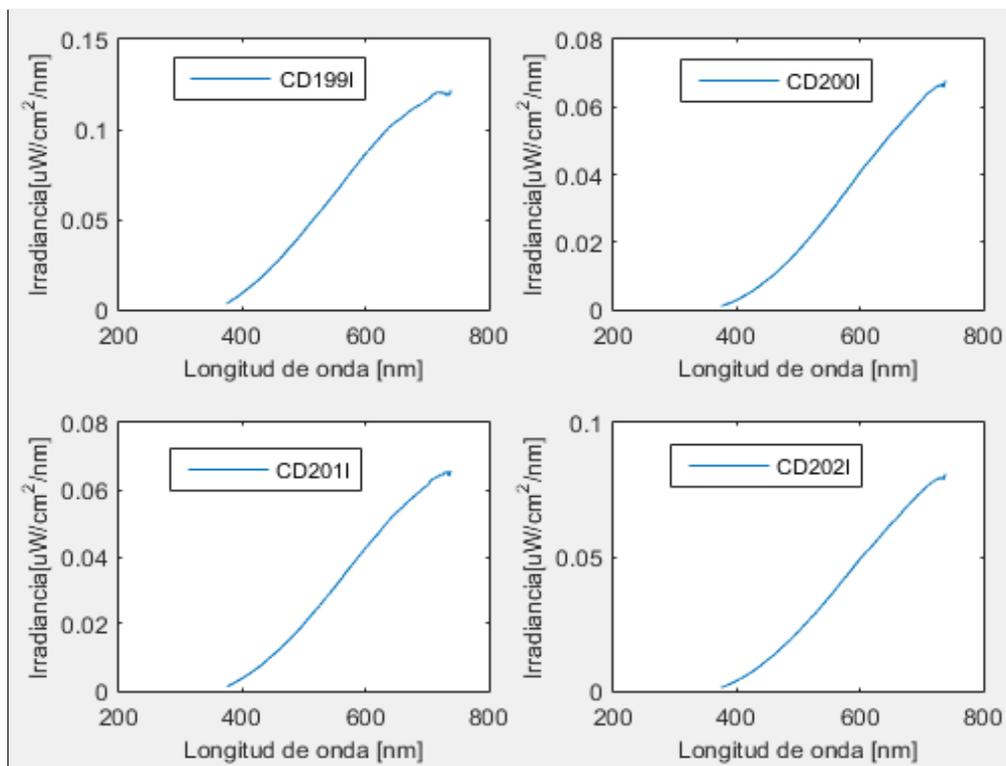


Figura.I.2: Irradiancia de córneas de control en función de la longitud de onda

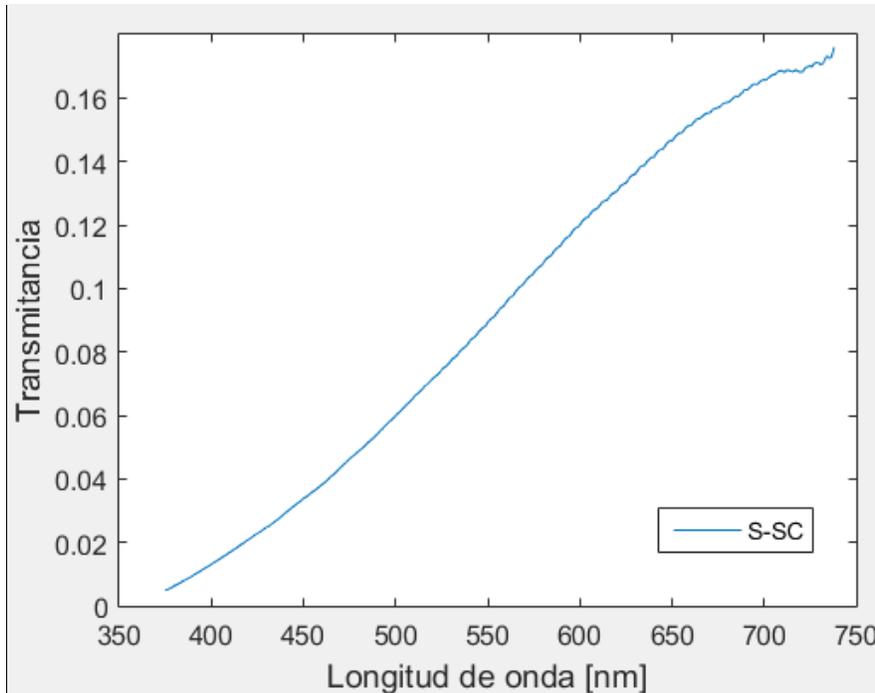


Figura.I.3: Irradiancia de soporte en función de la longitud de onda

El perfil de estas graficas ilustran que la proporción de la irradiancia transmitida a través de la muestra del tejido corneal es relativamente menor que $0.18 \text{ uW/cm}^2/\text{nm}$ generalmente, y particularmente en las córneas dañadas esta proporción es más baja, lo que redunda en incremento de reflexión, Scattering y absorción, que contribuyen para la disminución de la transmitancia. Por otro lado, la porción incidente en la región ultravioleta y verde, favorece al incremento de la transparencia a partir de esta región, caso de la CC202D.

I.3. Análisis de la transmitancia en córneas obtenidas del Matadero

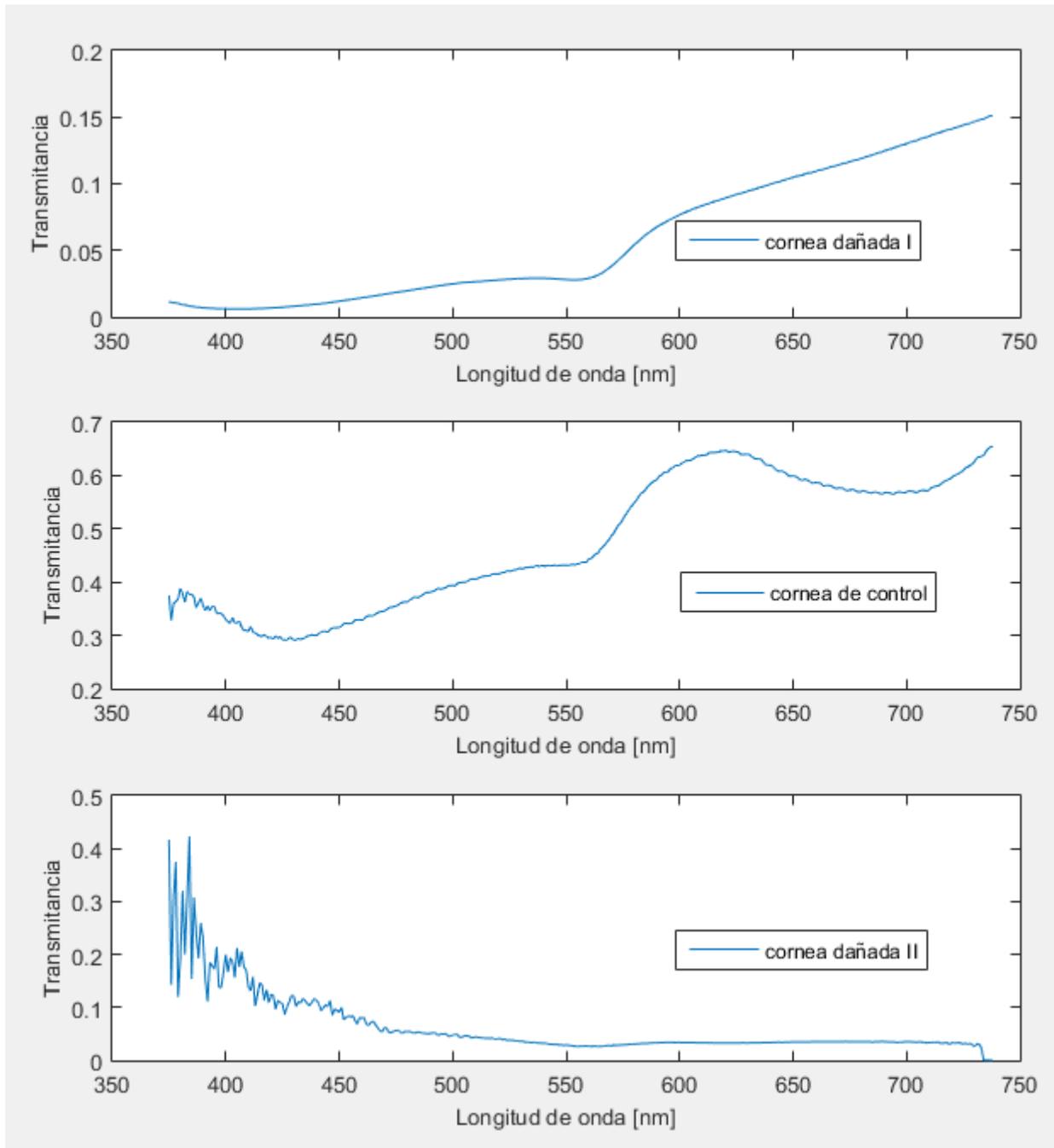


Figura.II.1: Perfil de la transmitancia en función de la longitud de onda en córneas obtenidas del Matadero.

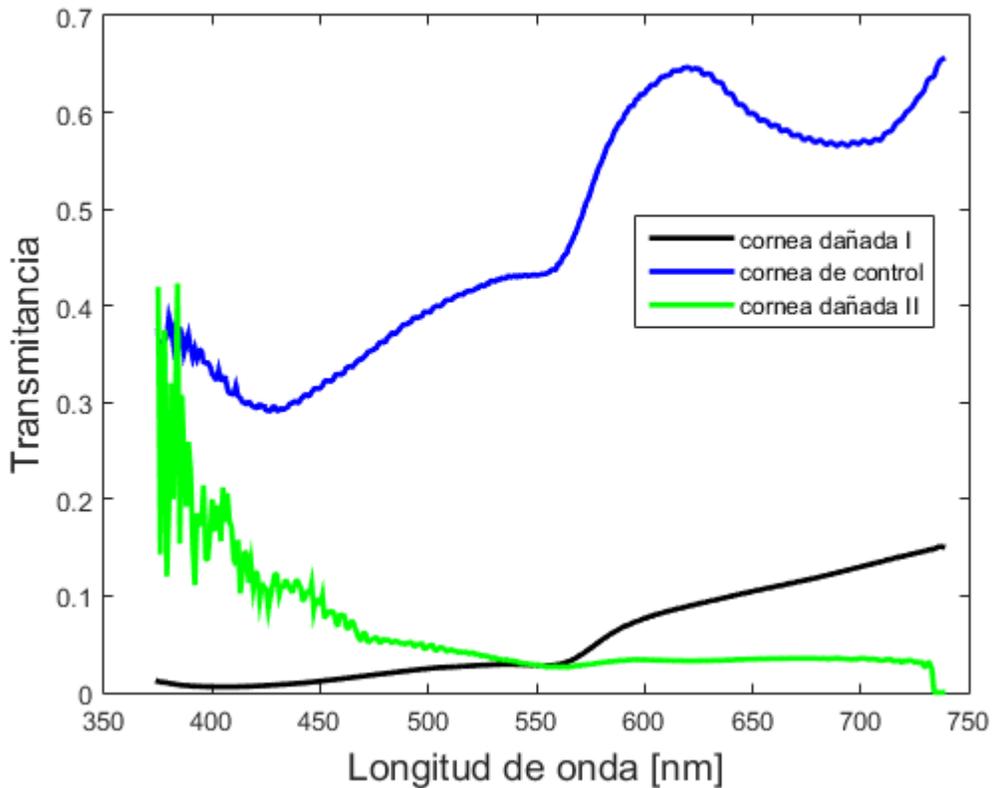


Figura.II.2: Comparativa de la transmittancia en función de la longitud de onda

El perfil de la figura.II.1, ilustra el comportamiento de la transmittancia en función del respectivo espectro, donde la córnea dañada I, presenta una opacidad severa con 14.9 % en la región de 735 nm y 0.63 % de transparencia en la región de 400 nm.

La córnea de control es más transparente en la región de 620 nm y 730 nm con ~ 64 %. La córnea dañada II, es la más opaca en casi todo el espectro visible con transmittancias alrededor de 3.4 %, en las regiones de los 375 nm hasta 475 nm presenta un ruido, que puede estar relacionado con la alta ganancia en esta región o por existencia de burbujas en una de las extremidades de la cámara corneal.

En comparación con las córneas obtenidas obedeciendo los procedimientos legales, las del matadero salen en desventajas relacionadas con las condiciones y métodos de extracción corneal, el tiempo de exposición no debería llevar más que 30 min y las condiciones de conserva inadecuadas.