



Universidad de Valladolid

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

MEDIDA DE LA TRANSMITANCIA EN CORNEAS
DAÑADAS. ESTUDIO DEL PROCESO DE
CICATRIZACIÓN.

Presentado por: Adrián Benítez Manquillo

Tutor: Santiago Mar Sardaña

Tipo de TFG: Investigación

En Valladolid a, 31 de Mayo 2017

ÍNDICE

1. RELACION AUTOR CON EL ESTUDIO.....	3
2. RESUMEN.....	3
2.1. ABSTRACT.....	4
3. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
5. HIPÓTESIS.....	6
6. MATERIALES.....	7
6.1. <i>Dispositivo experimental</i>	7
7. METODO EXPERIMENTAL.....	9
8. RESULTADOS.....	10
9. ANALISIS.....	14
10. DISCUSIÓN/CONCLUSIONES.....	15
11. BIBLIOGRAFIA.....	16
12. ANEXOS.....	17

1. Relación estudio/alumno

Grupo de Óptica de la visión

Cuando hablamos de ojos, corneas, retinas, etc. Lo primero que se nos viene a la mente es un óptico/optometrista y un médico (oftalmólogo). Como cabe esperar en el siguiente estudio se van a mezclar ambas ramas junto con otras ciencias primarias como la física y la biología principalmente.

Por lo que en este estudio se aplicaran principalmente conocimientos de todas ellas, que se deben exigir a un óptico/optometrista como profesional cualificado.

2. Resumen/Abstract

Resumen

Propósito: Realizar, obtener y discutir resultados sobre la transmitancia de la córnea de conejos en el espectro de luz visible (400-700 μm), previamente dañadas y cicatrizadas, tras aplicarle un silenciador de ARN.

Metodología: Se obtendrán las medidas, realizadas en un banco óptico en el cual incidiremos luz blanca sobre la córnea (dañada o no dañada) situada sobre una porta-corneas, después recogeremos los datos de transmitancia de luz a través de un monocromador, y un analizador óptico multicanal (OMA) junto a un ordenador con su software específico.

Resultados: Resultados poco claros y concisos, ya que veremos una variedad muy grande y dispar de estos. Reflejados en tablas de transmitancia en varios ejemplares tanto en sus ojos sanos como en sus ojos dañados.

Conclusiones: A día de hoy, es imposible destacar una evolución en la investigación, ya que no observamos avances en el mismo, solo pudiendo proporcionar datos, sin mucha cohesión entre ellos. No obstante la investigación de la Dr. Carmen, llevándola a cabo con éxito, podría ayudar a

muchos pacientes que sufren daños corneales a mejorar su calidad de vida, mejorando su visión.

Abstract

Purpose: To perform, obtain and discuss the results of the visible light spectral (400-700 μ) transmittance in damaged and healed rabbit corneas after applying RNA silencing.

Methodology: Measurements were obtained and taken in an optical bench. The -damaged or not damaged- cornea was illuminated by white light and placed on a CORNEAL CARRIER. Light transmittance data was collected through a monochromator, an optical multichannel analyzer (OMA) and a computer with a specific software.

Results: The obtained results were unclear and vague. Results of both healthy and damaged eyes are reflected in transmittance tables.

Conclusions: Nowadays, a development in the research is impossible to highlight since there is no progress in it, but data without cohesion. However, Dr. Carmen's investigation could help numerous patients suffering from corneal damages by improving their vision and, therefore, their quality of life -if successful.

3. Introducción

La cornea es la estructura ocular con mayor potencia dióptrica del ojo, caracterizada por su transparencia y curvatura es capaz de transmitir la luz del exterior hacia el interior del globo ocular. Actuando como primera lente y como gran barrera protectora para el ojo. Esta está compuesta por 6 capas: epitelio corneal, membrana de Bowman, estroma corneal, capa de DUA, membrana de Descemet y endotelio corneal.

Todas las corneas necesitan una específica organización celular para garantizar así, su transparencia y con ello la mayor transmitancia posible de luz hacia el interior; cuando esto no ocurre se debe a opacidades corneales.

Las opacidades corneales son debidas a muchas causas, pero en este estudio nos centraremos específicamente en las provocadas por la cicatrización corneal.

Proceso de cicatrización - Ante una herida corneal, se preceden varios acontecimientos celulares. Al principio se produce la muerte celular de las células que componen el estroma, debido al daño en el epitelio, después empieza la proliferación de nuevas células a partir de células no dañadas, se observa que muchas de estas células se diferencian a miofibroblastos, para conseguir la síntesis y remodelación del colágeno. Durante la conformación de la matriz extracelular de manera natural, se experimentan cambios y alteraciones en la densidad celular, produciendo así un desorden en la organización de esta misma, provocando así una disminución de la transparencia.

En la actualidad conseguir una transparencia corneal buena, es uno de los factores a tener en cuenta para una buena calidad visual y de vida.

Si se consigue que las células se reorganicen y ordenen después de una herida en la córnea, se podrá obtener transparencia corneal, pero hasta entonces tendremos que considerar importante convivir con una bajada de calidad visual y social.

4. Objetivos

Evaluar, medir, comparar y describir la transmitancia de luz blanca a través de 26 corneas de trece conejos con heridas corneales provocadas y evaluadas a distintas fechas. Primeros conejos tenían provocada la herida desde hace un mes, la segunda tanda de animales llevaban con la herida cinco meses, y finalmente la última tanda llevaban más de seis meses con la herida realizadas, la primera y segunda tanda de corneas, tenían aplicado el tratamiento para cicatrización corneal, la última remesa no lo tenía aplicado.

5. Hipótesis

Consiguiendo silenciar una proteína de ARN que afecta a los canales de calcio, se podría conseguir una restructuración de las células corneales, sin dejar opacidad de cicatrización provocando así mejora en transparencia.

6. Materiales

6.1 Dispositivo experimental

Porta-córneas (Fig.2) - dispositivo formada por dos soportes de teflón donde se coloca la córnea, creando una cámara cerrada a través de la juntas tóricas (Fig.3) que aprietan la córnea y los cierres con láminas de cristal (Fig.1) por donde después introduciremos suero fisiológico, para simular la diferencia de presión intraocular (13mmHg) y reproducir el entorno intraocular.



Fig.2. Porta-corneas montado



Fig. 1. Piezas porta-corneas y herramientas.

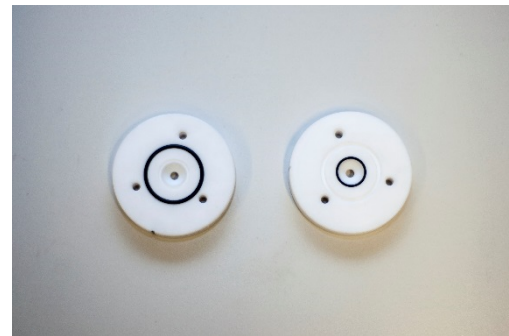


Fig.3. Soporte Cornea (Junta Tórica)

Lámpara incandescencia blanca (Fig.4) – lámpara de utilizada para iluminar la córnea y así poder realizar la medida de la transmitancia.

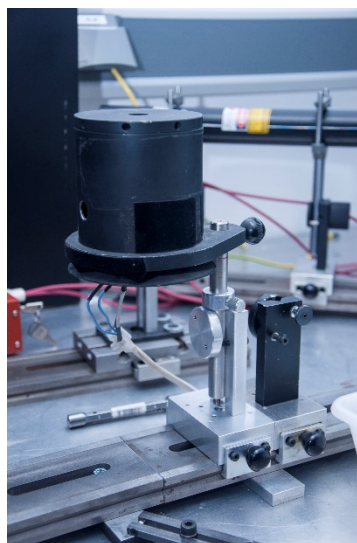


Fig. 4. Lámpara incandescencia blanca

Monocromador (Fig.5 y Fig.6) – Dispositivo que nos permite la separación de la luz en diferentes longitudes de onda. Para así poder recoger la luz con un detector, en este caso la cámara OMA2.

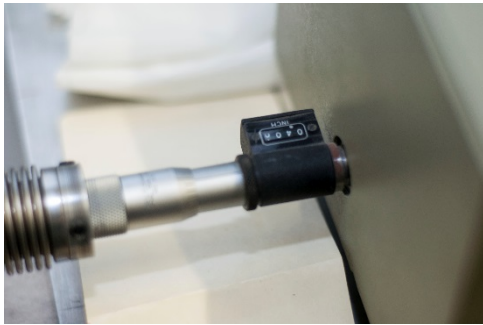


Fig. 5. Monocromador, medidor nanómetros

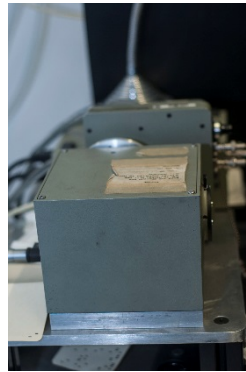


Fig. 6. Monocromador

Cámara OMA2 (Fig.7) - La cámara OMA2 se compone de 509 canales que nos detectan la diferente intensidad de luz que nos llega, por cada longitud de onda, pudiendo así medir la cantidad de luz y por tanto la transmitancia del tejido.



Fig. 7. Cámara OMA2

Dispositivo completo (Fig. 8)

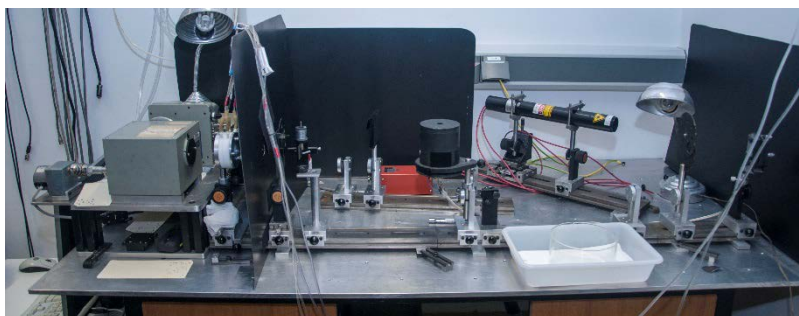


Fig. 8. Dispositivo experimental completo

7. Método experimental

Empezamos en la sala de biología, allí trabajaremos con los conejos tratados a los cuales debemos realizar las medidas.

Primero se ha de dormir a los conejos inyectando tras una hora BRDU, para saber en las histología en que momento de división celular se encontraba las células corneales.

Después antes de sacrificar se sedará de nuevo con Ketamina, para después aplicar una inyección intracardiaca llamada Dolethal.

Una vez sacrificado el animal, procedemos a la extracción de la córnea de ambos ojos, una de ellas sin herida y la otra con herida.

Cuando extraemos la córnea, tenemos pocos minutos para la toma de medidas para que las propiedades biológicas sigan activas antes de que empiece a degradarse la córnea y eso pueda provocar errores de medida en nuestros datos, así que colocamos rápidamente la córnea en el porta-corneas y llevarlo hacia nuestro banco óptico.

Las corneas se enumeraran con un código, nombrando el número de córnea, numero de animal, con/sin tratamiento, con/sin herida y el ojo (OD/OI). Ex. Cor.002 TR.H.268.OI

Partimos situando los distintos elementos en un sistema de alineamiento en este caso un banco óptico (Lámpara, diafragma, porta-corneas y pupila). Para una perfecta alineación es necesario que un láser sea reflejado provocando así una perfecta línea recta entre los elementos, para así no producir ninguna desviación ni perdida de la luz emitida.

Una vez todo alineado, el monocromador unido a la cámara OMA2 y esta al ordenador, colocamos el porta-corneas, este irá conectado a varios suministros de suero fisiológico preparado para que simule la diferencia de presión a la que se encuentra la córnea. (13 mmHg)

Colocaremos el porta-corneas entre la lámpara de luz blanca y el monocromador perfectamente paralelo para así garantizar una incidencia del 100% de la luz emitida.

Una vez atravesase la luz la córnea esta se recogerá por el monocromador seleccionando las distintas longitudes de onda entre 400-700 nm realizando 100 medidas de cada longitud.

Las medidas se realizarán cada vez en un orden, siendo primero medido de 400-700 nm, en pasos de ± 5 nm, y el ojo contralateral se medirá de 700-400 nm en pasos de ± 5 nm.

La cámara OMA2 que contiene 509 canales nos detectará la cantidad de luz transmitida por la córnea. Mandado así los datos al Software en el ordenador recogidos en metadatos brutos listos para procesar en un lector de código ASCII.

8. Resultados

Corneas analizadas el 16-Sep-2016

Las corneas analizadas corresponden a ojos con herida corneal provocada con un mes de antelación. Tras realizar las medidas correspondientes obtenemos los siguientes resultados reflejados en las siguientes tablas (Tabla 1 y Tabla 2).

Transmitancia, Corneas NO heridas, tratadas. (Tabla 1

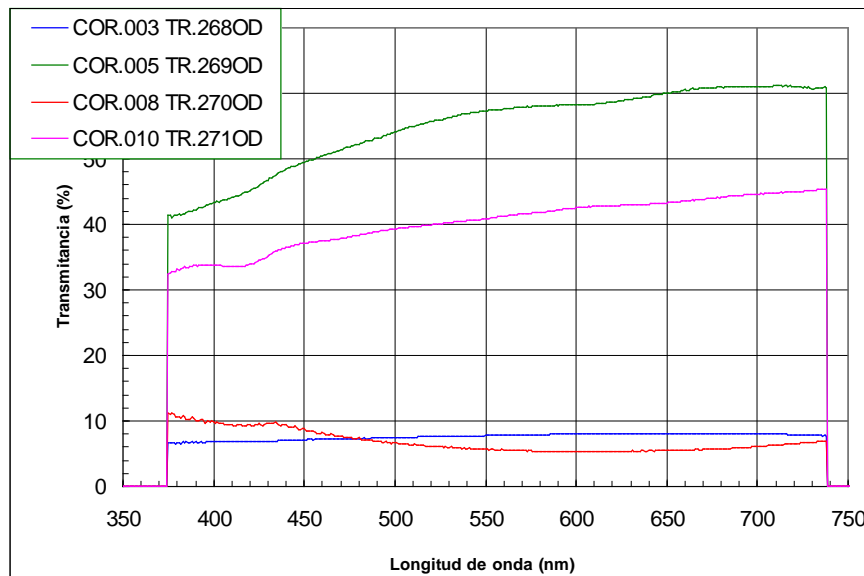


Tabla 1. Transmitancia, corneas no heridas, tratadas

Transmitancia, Corneas heridas y tratadas. (Tabla 2).

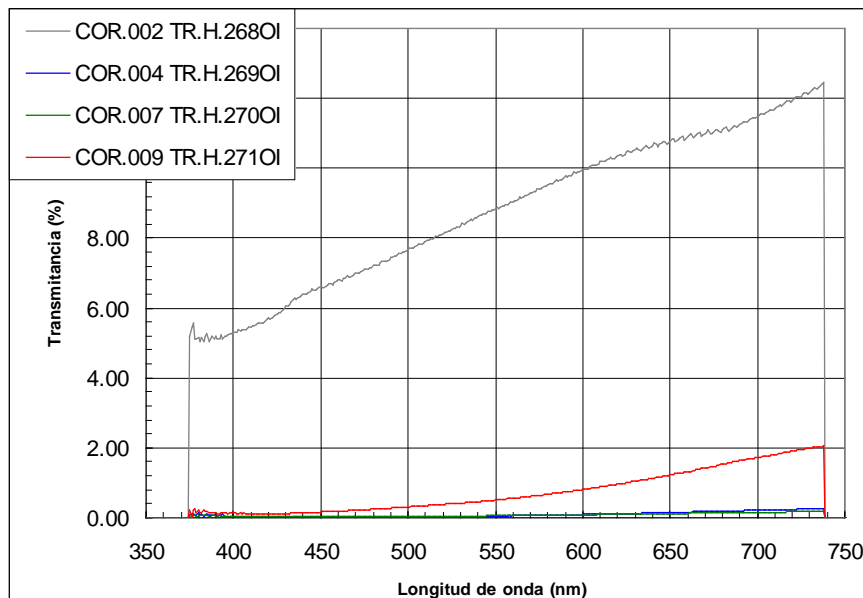


Tabla 2. Transmitancia, corneas heridas y tratadas

Corneas analizadas 05-Oct-2016

Las corneas analizadas corresponden a ojos con herida corneal provocada con un cinco meses de antelación. Tras realizar las medidas correspondientes obtenemos los siguientes resultados reflejados en las siguientes tablas (Tabla 3 y Tabla 4).

Transmitancia, Corneas NO heridas, tratadas. (Tabla 3).

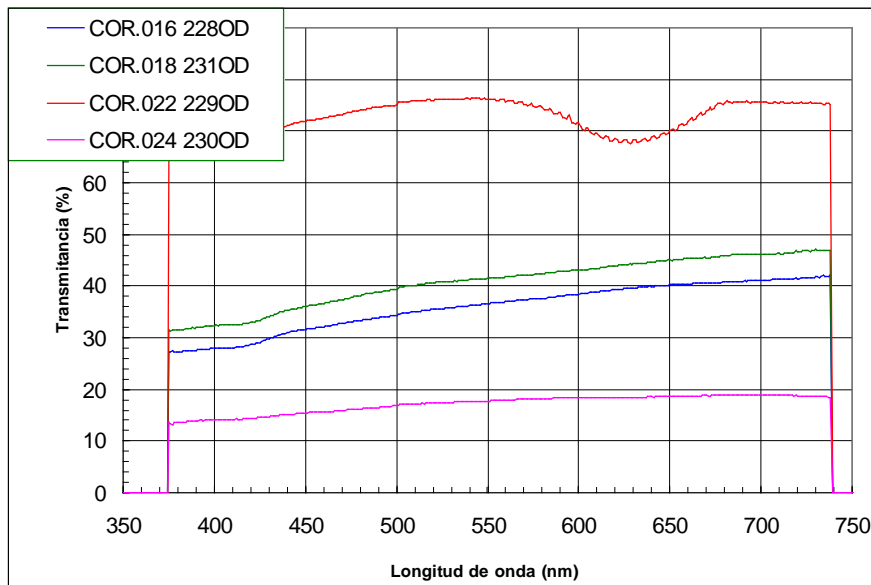


Tabla 3. Transmitancia, corneas no heridas tratadas

Transmitancia, Corneas heridas y tratadas. (Tabla 4).

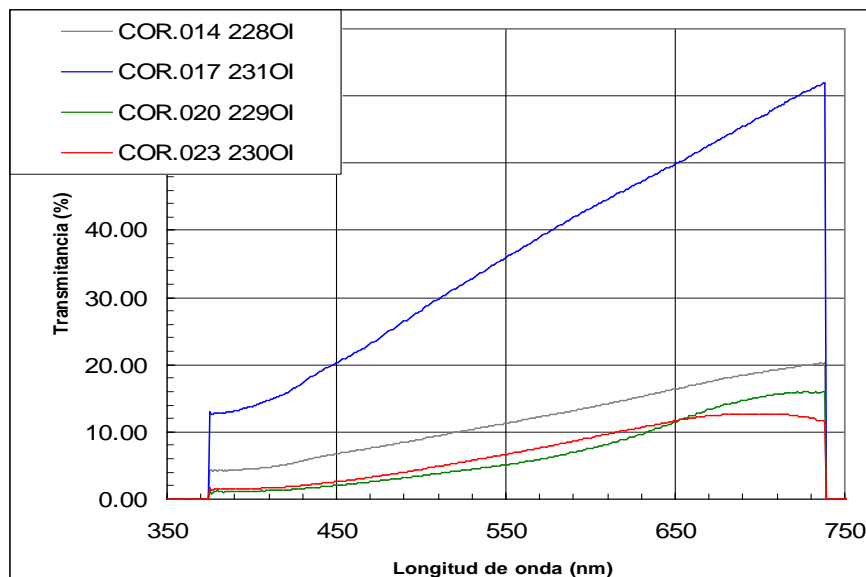


Tabla 4. Transmitancia, corneas heridas y tratadas

Corneas Analizadas 23-Nov-2016

Las corneas analizadas corresponden a ojos con herida corneal sin tratamiento en este caso, provocada con un seis meses y medio de antelación. Tras realizar las medidas correspondientes obtenemos los siguientes resultados reflejados en las siguientes tablas (Tabla 6 y Tabla 7). En este último análisis añadimos la medida de la irradiancia del dispositivo sin cornea, para tener un valor base sobre la medida de la transmitancia (Tabla 5).

Irradiancia de las medidas del soporte sin cornea (Tabla 5)

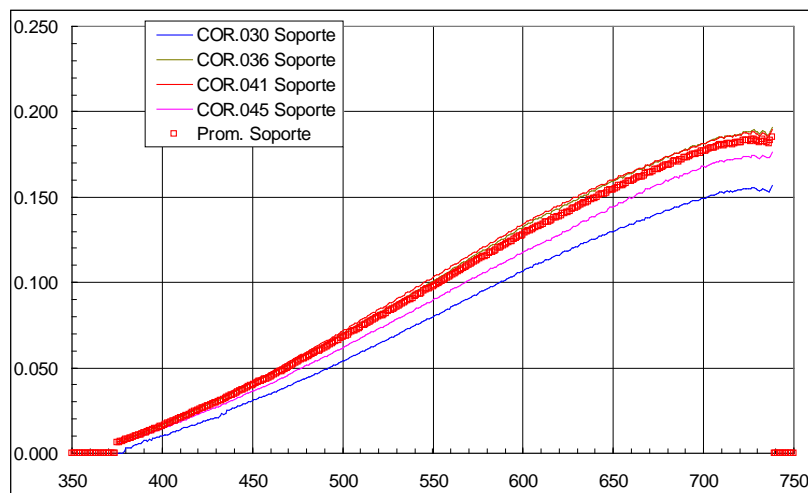


Tabla 5. Irradiancia de las medidas soporte sin cornea

Transmitancia, Corneas NO heridas, NO tratadas. (Tabla 6).

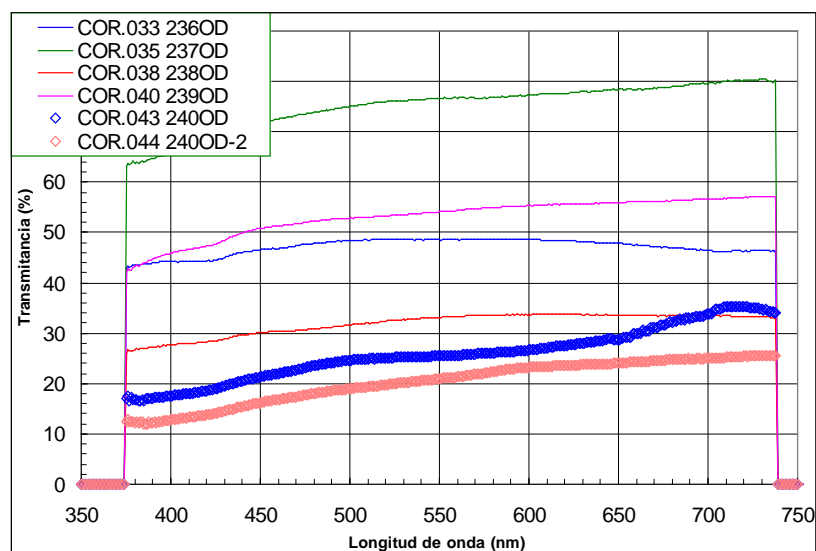


Tabla 6. Transmitancia, corneas no heridas, no tratadas

Transmitancia, Corneas heridas y NO tratadas. (Tabla 7).

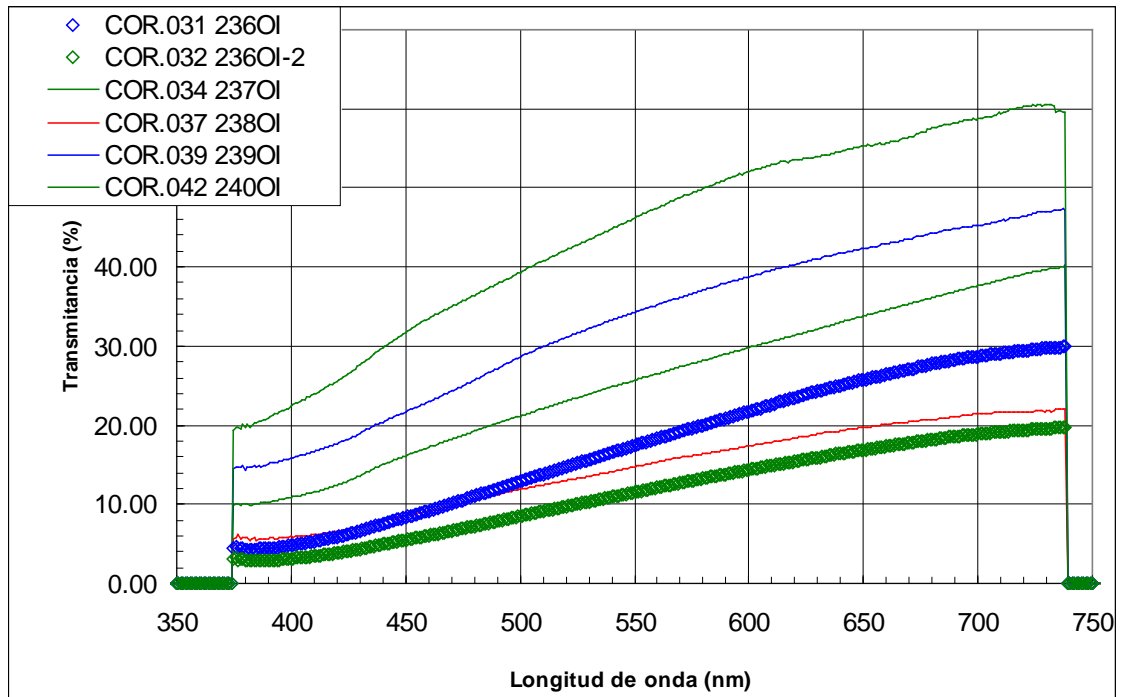


Tabla 7. Transmitancia, corneas heridas y no tratadas

9. Análisis.

Para determinar la precisión del mecanismo utilizado se adjuntan tablas de irradiancia en mediciones control sin corneas. Siendo estas casi iguales dándonos como resultado su precisión, siendo esta menor en las longitudes de onda de los azules y más alta en los rojos, causa de que la fuente de iluminación utilizada irradia más en las longitudes de onda largas.

Para el análisis de los resultados, vamos a enfocarlo desde dos puntos de vista, uno por tiempo de realización de la herida corneal y por otro lado lo analizaremos en Corneas heridas y No heridas, no teniendo en cuenta su tiempo de cicatrización.

Corneas heridas/No heridas

Corneas heridas – encontramos variedad de resultados, normalmente todos ellos se encuentran dentro del rango 0 – 20% de transmitancia, aunque en algunos casos este pasa del 40%, el único factor común que observamos en los resultados es la mayor transmitancia en longitudes de onda largas que en las longitudes de onda cortas

Corneas No heridas – aquí también nos encontramos con valores variados, siendo estos más altos que los anteriores, encontrándose en un rango de 20-80% de transmitancia, algunos valores descienden considerablemente en comparación al resto, siendo estos en torno al 5-10%.

Por tiempo de cicatrización

Un mes – encontramos valores muy bajos de transmitancia tanto en corneas heridas como en no heridas.

Cinco meses – encontramos también valores muy variados, pero en este caso, mejor transmitancia en comparación a las corneas que solo tenían un mes de cicatrización. Se nota gran diferencia en corneas no heridas.

Seis meses – analizando los resultados, observamos un aumento de la transmitancia en corneas Heridas, superando estas incluso el 50% de transmitancia en algunos casos, siendo estas corneas no tratadas. En este caso se realizaron dos medidas seguidas de una misma cornea; COR.032. 236 OI. Siendo los resultados distintos entre ellos.

10. Discusión y Conclusiones

Observando los diferentes resultados, cabe esperar que haya factores que afectan a la variabilidad de datos obtenidos.

Tiempo realización de las medidas - Observamos en la Tabla 7. La medida de una misma cornea, siendo sus valores diferentes, esto nos indica que el tiempo en la toma de medidas es fundamental y determinante en los resultados, observando una disminución de la Transmitancia según pasa el tiempo (COR.032. 236OI y COR.032. 236OI-2).

Método de medición - para la obtención de medidas vamos alternando la medición de la transmitancia siendo un ojo medido de 400-700 nm y el ojo contralateral de 700-400 nm. Puede ser un factor poco determinante ya que el tiempo de realización de medida es el mismo; en torno a 12 min.

Fallo en la Medición - Algunos de los valores muy bajos o incluso nulos, se pueden deber a saturación de la medida por un excesivo paso de luz, provocando un fallo en la medición; otros fallos en la medición puede ser un impreciso alineamiento, posibilidad de burbujas en el porta-corneas dispersando la luz, o simplemente algún error humano que puede afectar a las medidas; no obstante no son factores muy decisivos para tanta diferencia entre los resultados.

Juntas tóricas - debido al crecimiento de los animales y en consecuencia el crecimiento del ojo, al colocar la córnea en el porta-corneas, en el caso de los conejos de más de 5 meses, el borde de la córnea sería presionado por la junta tórica aplicando una presión y creando una tensión en el tejido, provocando así un error en la medida de la transmitancia. Se asumió la idea de construir otro dispositivo que no aplicase presión sobre las corneas, para a ver si se conseguía mejorar los resultados.

Variabilidad Biológica – Otro factor importante a objetar es la diferencia biológica que existe entre animales de misma especie, dado que ningún ser vivo es igual a otro, y esas variaciones también afectan en parte a la medición de la transmitancia.

Tiempo de cicatrización – Observando los resultados obtenidos, vemos una mejora en la transmitancia de la luz cuanto más tiempo lleva el proceso de cicatrización, mejorando este de valores en torno al 0-5% hasta valores que llegan hasta un 20%. A ciencia cierta no sabemos si esta mejora es debida al tiempo de cicatrización o existe otros factores que hayan influido en esta mejora, no obstante es un dato a tener en cuenta.

Espesores corneales – la diferencia de grosos corneal puede ser otro factor a tener en cuenta para la transmitancia, aunque en este caso, todas las corneas se encontraban en espesores bastante parecidos.

Actualmente la única relación repetitiva que se encuentra es en caso de las corneas no heridas tiene una transmitancia bastante parecida en todas las

longitudes de onda, mientras que las corneas heridas, transmiten mejor las longitudes rojas que las azules.

Cabría esperar de los resultados una gran mejoría entre las corneas control sin dañar y las corneas heridas, pero existen demasiados factores que influyen en las medidas, no obstante tampoco sabemos si los resultados tan variados se deben al fármaco aplicado, siendo este el que no influya sobre la cicatrización de la córnea.

Hasta hoy en día no se han conseguido resultados notables y mejorables, por lo que se tendrá que seguir con el estudio para poder determinar un resultado o por el contrario llegar a la conclusión de que el fármaco aplicado no mejora la cicatrización corneal y en consecuencia su Transmitancia.

A día 26 de Abril, se realizaron unas nuevas medidas, realizando estas sin la junta tórica del soporte del porta-corneas, para comprobar si el la presión ejercida por la junta afectaba realmente a la medida de la transmitancia.

Efectivamente los nuevos resultados, nos muestran una gran mejoría en la medida de las transmitancia, observamos unas medidas coherentes en comparación a las tomadas con la junta tórica. No obstante las heridas de los ojos izquierdos son bastante uniformes dando lugar a medidas con diferentes resultados, en cambio las medidas del ojo derecho (cornea control) tienen bastante similitud entre ellas. (Anexo 1).

11. Bibliografía

1. Rodríguez Tejerina, MC. "Medida de la transmitancia de lentes intraoculares". Trabajo de Fin de Grado. 12 Mayo 2016. Universidad de Valladolid.
2. M.C. Martínez-García et al. / *Experimental Eye Research* 83-4, 728-735 (2006)
3. C. Martínez, J.T. Blanco-Mezquita, S.Mar, J.M. Merayo-Iloves, R.M. Torres. "Investigación en cicatrización corneal". *Ver y Oír*, 24, 213-217 (2007)
4. R. J. Peláez "Estudio de las regularidades en el ensanchamiento Stark de los gases nobles una vez ionizados". Tesis Doctoral. 25 Febrero 2008. Universidad de Valladolid.

12. Anexos

Anexo 1

Se han eliminado las primeras medidas 004 y 005 porque estaban incompletas.

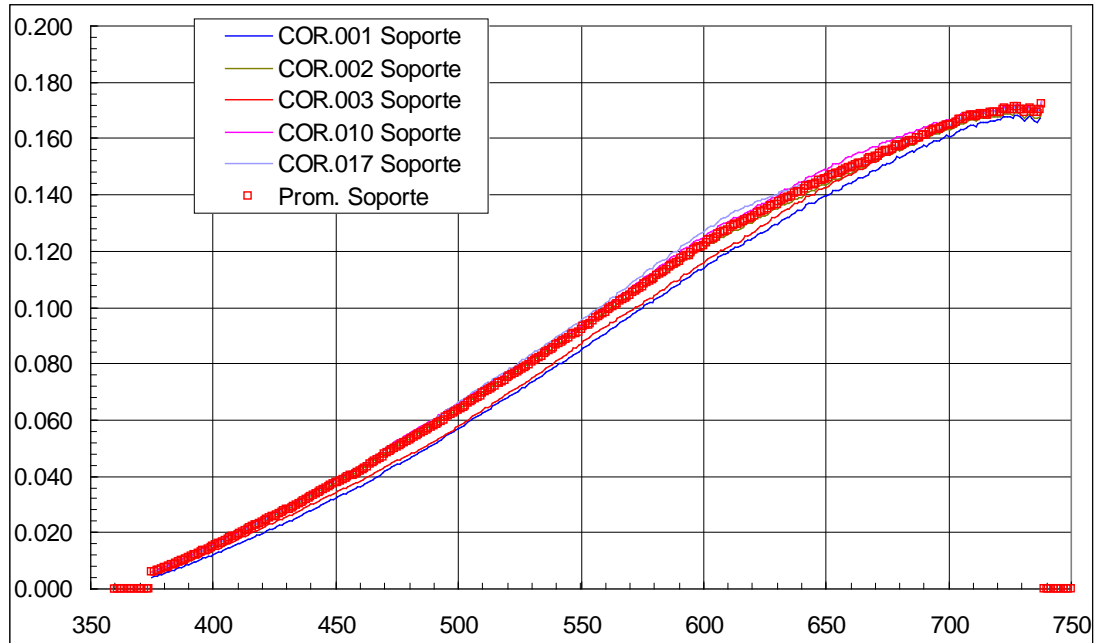


Figura 1. Irradiancia de las medidas del soporte (sin cornea). Todos los resultados son próximos.

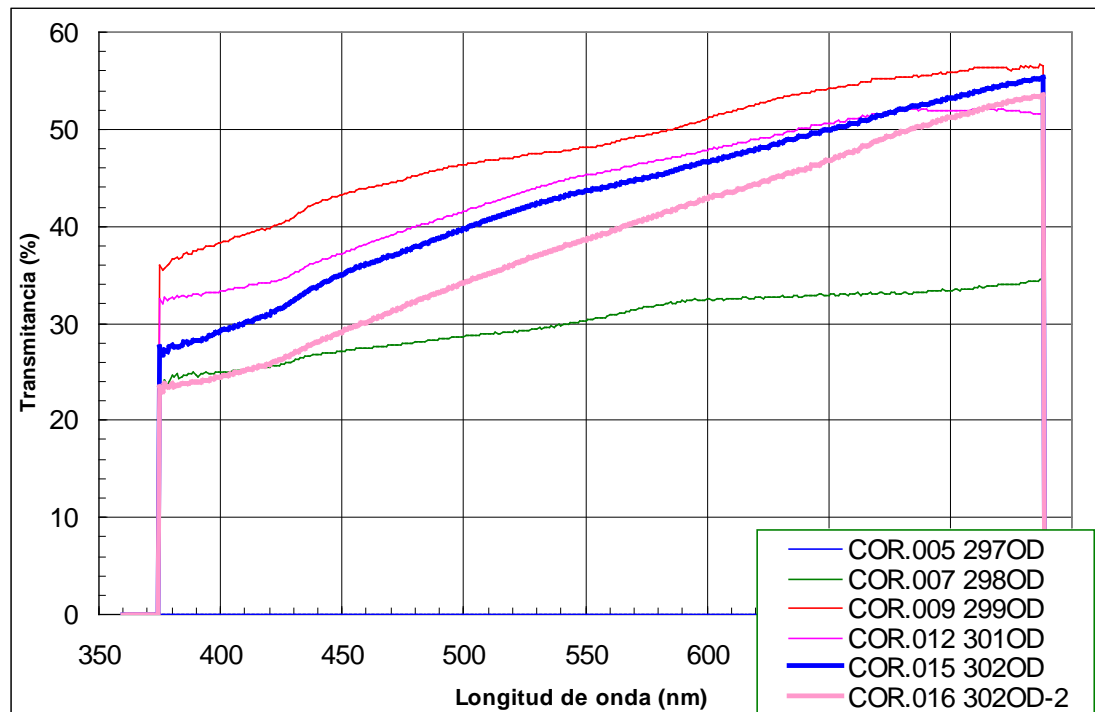


Figura 2. Transmitancia, en tanto por ciento, de las córneas de control. Las dos de trazo grueso corresponden a la misma córnea, la superior se hizo primero. La 007 da un valor más bajo por una burbuja.

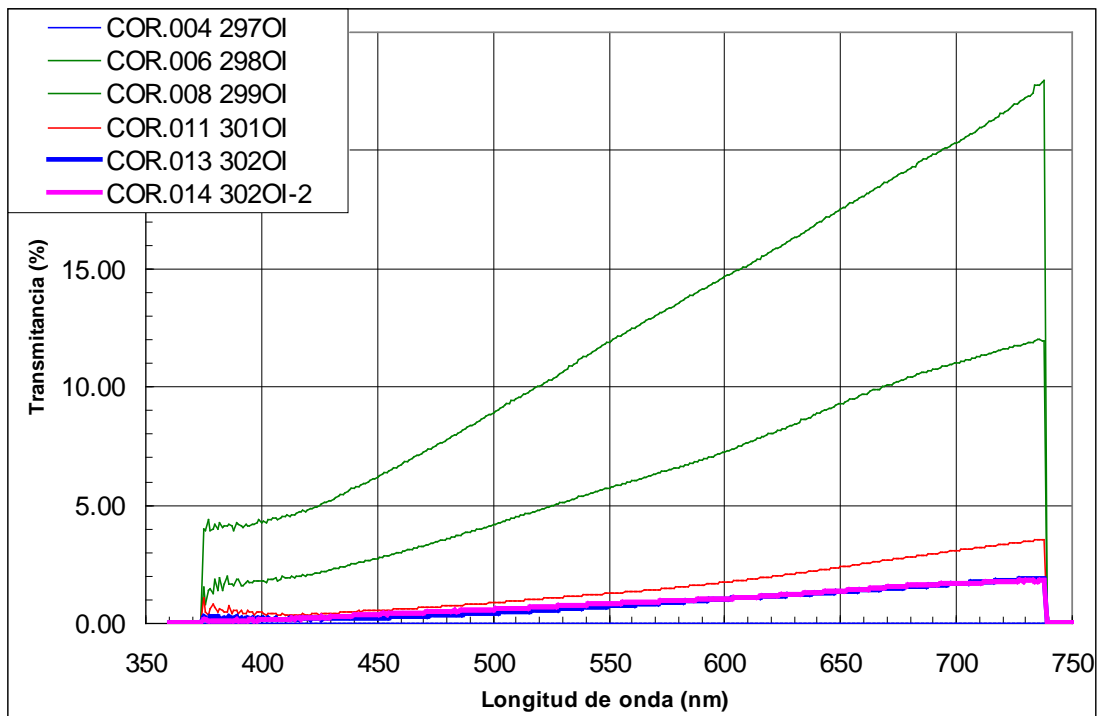


Figura 3. Transmitancias, en tanto por ciento, de las córneas heridas. Las dos de trazo grueso corresponden a la misma córnea.

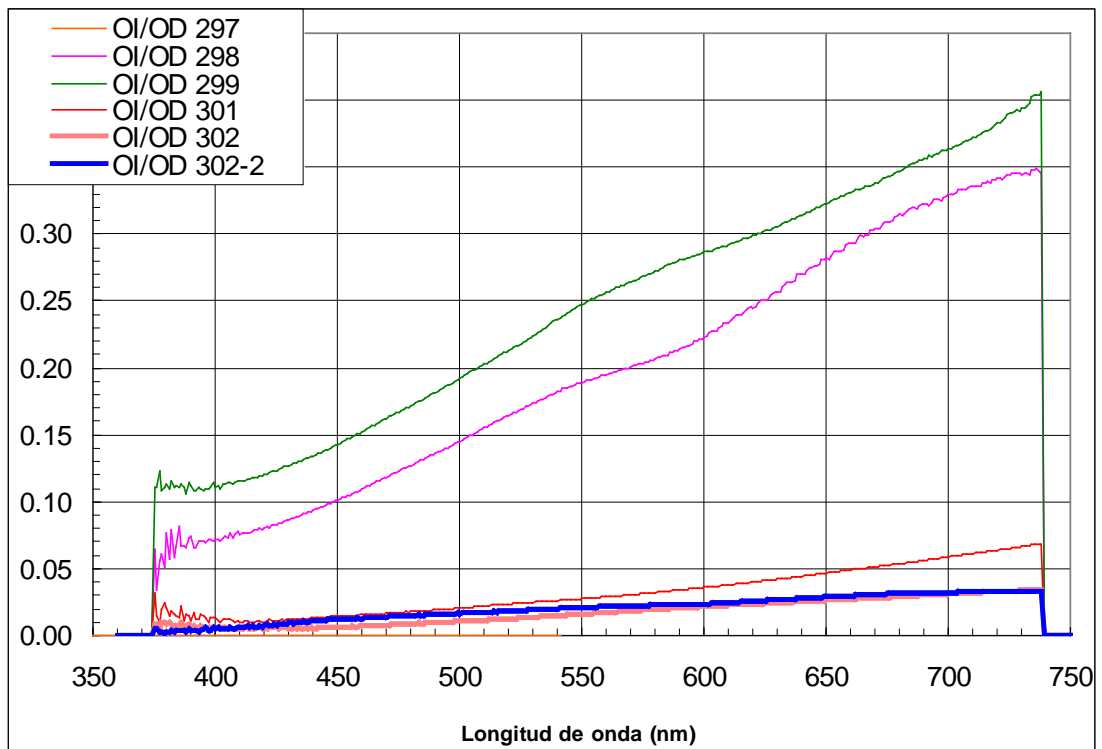


Figura 4: Relación OI/OD. Las dos de trazo grueso corresponden a la misma córnea.

