



Caracterización de un láser UV de bajo coste para inducir lesiones en la retina

María Isabel Gómez Schiavon

Tutor:

Eduardo Fernández Jover

Co-tutora:

Ariadna Díaz Tahoces

Instituto de Bioingeniería

Departamento de Neuroprótesis y Rehabilitación Visual

Facultad de Ciencias Experimentales

Grado en Biotecnología 2010-2014

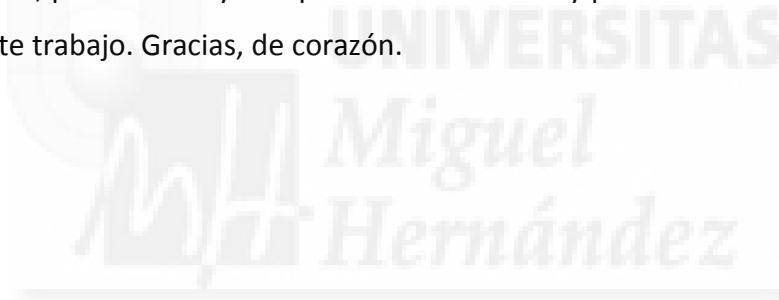
Agradecimientos

Quiero agradecer y dedicar, en primer lugar, este estudio a mis padres, José Daniel y Adelina, por haber estado siempre conmigo y haberme dado todo el soporte y ánimos para continuar y seguir hacia delante. Gracias por estar conmigo *a las duras y a las maduras*.

En segundo lugar, agradezco a todo el grupo de investigación de Neuroingeniería Biomédica (Nbio) haciendo especial hincapié en Gema, Desiré y Sonia. Gracias por ayudarme a lo largo de todo este tiempo, de una u otra forma.

Asimismo, no tengo palabras para agradecer toda la ayuda recibida a mi compañera Cynthia Pardines.

Y, por último, agradezco a mis tutores, Dr. Eduardo Fernández Jover y Ariadna Díaz Tahoces, por toda la ayuda que me han ofrecido y por darme la oportunidad de realizar este trabajo. Gracias, de corazón.



Resumen

El agujero en la capa de ozono y el aumento de la esperanza de vida de las personas en los países occidentales, conlleva a un incremento en el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta de la retina. Estos hechos podrían generar un aumento en la aparición temprana de enfermedades retinianas asociadas a la edad como por ejemplo la Degeneración Macular (AMD). Actualmente, se conocen varios efectos de esta radiación sobre diferentes tejidos oculares, sin embargo, existe una gran controversia en lo que a la retina se refiere.

En este contexto, este estudio se realizó con el objetivo de aportar un mayor conocimiento de los efectos producidos por la radiación ultravioleta en la retina durante períodos de exposición breve. Para tal fin, se ideó un experimento en el que se irradió con un láser de bajo coste, de 405 nm de longitud de onda, a ratones de la cepa C57/Bl6 (*wild type*) con pulsos de diferentes tiempos. Asimismo, se quiso comprobar la eficiencia de los láseres de bajo coste en el ámbito científico, con el objetivo de abaratar costes en posibles estudios posteriores.

Palabras clave: retina, radiación ultravioleta, láser de bajo coste, lesión.

Abstract

The hole in the ozone layer and the increased life expectancy of people in western countries, is leading to an increment in time of exposure to ultraviolet radiation from the retina. These facts could lead to an increase in early-onset retinal diseases associated with aging such as macular degeneration (AMD). Currently, several effects of this radiation on different ocular tissues are known; however, there is considerable controversy as regards the retina.

In this context, the study was conducted with the aim of providing a better understanding of the effects of ultraviolet radiation on the retina at short time periods. For this purpose, an experiment in which was irradiated with a laser of low cost, of 405 nm wavelength, to mice C57 / Bl6 (*wild type*) strain pulsed with different times was devised. Also, it was tested the efficiency of low cost lasers in science, with the aim of reducing costs in possible future studies.

Key words: retina, ultraviolet radiation, low cost laser, lesion.

Contenido

✚ Agradecimientos	1
✚ Resumen	2
✚ Introducción	4
• Sistema visual	4
• Estructura y función de la retina	5
• Radiación ultravioleta	6
• Efectos de la radiación ultravioleta en la retina	8
✚ Antecedentes	9
✚ Objetivos	10
✚ Métodos	11
• Manipulación de los animales	11
• Estudio OCT	11
• Lesión	13
▪ Sistema de retención y Caracterización del láser	13
▪ Distancia y Ángulo	13
▪ Manejo del láser	13
▪ Grupos de estudio	14
• Procesamiento histológico de la retina	15
▪ Seccionado del tejido	16
▪ Tinción en hematoxilina-eosina	16
▪ Imágenes de microscopía óptica	17
✚ Resultados	18
• OCT y estudio histológico	18
• Grupos de estudio	18
▪ Grupo I	19
▪ Grupo II	21
▪ Grupo III	22
▪ Grupo IV	24
▪ Grupo V	25
✚ Conclusiones	28
✚ Bibliografía	29

Introducción

· *Sistema visual*

El sistema visual es un conjunto de órganos, vías y centros nerviosos que permiten captar y procesar las ondas luminosas que recibimos a través de la radiación solar para convertirlas en señales nerviosas que pueden ser interpretadas por el cerebro¹. La entrada al sistema visual es el globo ocular.

El globo ocular (**Figura 1**) es una esfera rodeada de una membrana blanca llamada esclerótica, que en la parte anterior del ojo es transparente. A través de esta zona transparente, llamada córnea, los rayos luminosos son orientados para que incidan en la retina. Detrás de la córnea se encuentra la cámara anterior del ojo la cual contiene el humor acuoso que nutre la córnea.

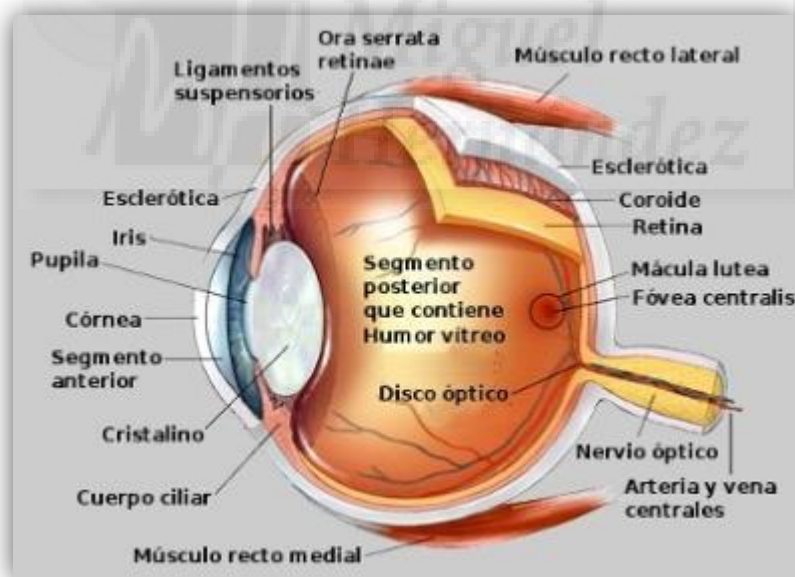


Figura 1. Estructura del globo ocular.

El iris es una membrana circular de tejido muscular que limita la cámara anterior dejando en su centro una apertura, la pupila. Debido a su naturaleza muscular, el iris es capaz de regular el diámetro de la pupila controlando así la cantidad de luz que llega a la retina. Detrás del iris y de la pupila se encuentra el cristalino. Éste es una lente que

permite el enfoque de la imagen en los fotorreceptores de la retina encargados de la fototransducción.

· ***Estructura y función de la retina***

La retina de los vertebrados es, esencialmente, una porción del cerebro que se proyecta hacia estructuras superficiales del organismo para obtener la luz exterior. Estructuralmente, es una red neuronal de capas de grosor variable ^{[2][3][4]}, que delinea la mitad de la parte posterior del globo ocular.

La retina está formada por 3 capas (**Figura 2**) que contienen cuerpos celulares (nuclear externa, nuclear interna y capa de las células ganglionares) y 2 capas denominadas plexiformes, donde se producen interacciones sinápticas entre los 5 tipos mayoritarios de neuronas (fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células ganglionares y células amacrinas).

Los fotorreceptores se dividen en conos y bastones. Los bastones funcionan principalmente en condiciones de baja luminosidad y proporcionan la visión en blanco y negro. Los conos, sin embargo, están adaptados a las situaciones de mucha luminosidad y proporcionan la visión en color⁵.

Por otro lado, los fotorreceptores están conectados a las células bipolares y a las horizontales mediante la capa plexiforme externa. En la capa plexiforme interna, las bipolares se encuentran conectadas a las células amacrinas y a las ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico.

Además de estas células nerviosas, en la retina también existen células del epitelio pigmentario (RPE) que forman la capa más externa de la retina. El RPE se encuentra organizado como una sola capa de células y está caracterizado por la presencia de gránulos de pigmento en su interior. Estos gránulos absorben la luz que llega hasta el RPE. Asimismo, en la retina también están presentes las células gliales (células de Müller, astrocitos y células de la microglía)⁶.

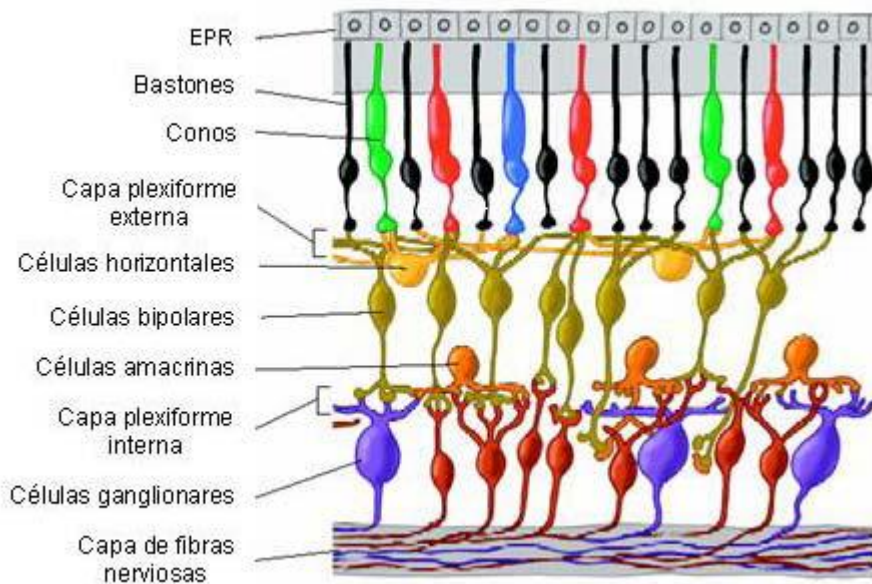


Figura 2. Esquema de las conexiones entre los diferentes estratos y células de la retina.

Conos y bastones son las únicas células directamente sensibles a la luz y son, por lo tanto, los encargados de transformarla en impulsos eléctricos. Las células amacrinas y horizontales median la modificación de la información que fluye desde los fotorreceptores a través de las bipolares hasta llegar a las células ganglionares. Son estas últimas las que, a su vez, envían la información al cerebro⁸.

Sin embargo, la retina al ser un tejido sensible a la luz, se ve afectada negativamente por la radiación solar, principalmente, por radiaciones con una longitud de onda inferior a la de la región visible como puede ser la ultravioleta.

· **Radiación ultravioleta**

El sol es nuestra fuente de energía. Esta energía la recibimos en forma de ondas electromagnéticas o lo que llamamos comúnmente luz. Las ondas que componen el espectro electromagnético difieren en la longitud y/o frecuencia de las mismas.

El sol emite en todas las longitudes de onda del espectro electromagnético, sin embargo, no emite la misma cantidad de energía en todas ellas (**Figura 3**).

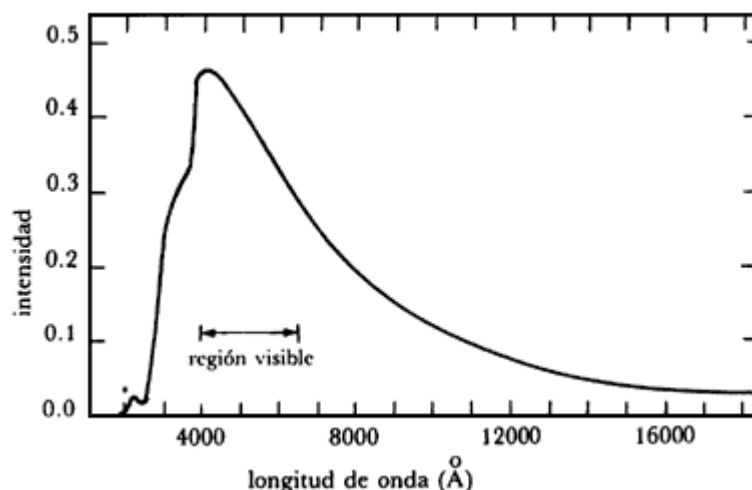


Figura 3. Espectro de emisión del Sol. Se observan las diferencias energéticas en la emisión del Sol en las diferentes longitudes de onda. La intensidad es máxima desde la región de ultravioleta cercano hasta el infrarrojo.

La radiación ultravioleta comprende la región del espectro electromagnético situada entre la luz visible y los rayos X, es decir, entre los 100 y 400 nm. Es un tipo de radiación muy energética ya que su absorción produce ruptura de uniones entre átomos y moléculas, forma radicales libres además de la excitación electrónica⁹.

Se divide en tres subcategorías dependiendo de la longitud de onda a la que emitan y, por tanto, de su energía. La de mayor energía, denominada ultravioleta de onda corta (UV-C), comprende de los 100 a los 280 nm; las UV de onda intermedia (UV-B) se sitúa entre los 280 y los 315 nm y, por último, las UV de onda larga (UV-A) entre los 315 y los 400 nm¹⁰. Además, existe una región comprendida entre el UV próximo y los rayos X (200 a 0,1 nm) llamada UV de vacío¹¹.

Aunque el sol emite en todo el espectro de ultravioleta (UV), las ondas UV-C y UV-B de menos de 290 nm son completamente absorbidas por la capa de ozono. El oxígeno y el nitrógeno atmosférico transforman la alta energía de esta radiación en reacciones fotoquímicas e impiden su llegada a la superficie terrestre¹². Sin embargo, las ondas UV-B de mayor longitud de onda, en conjunto con las UV-A, pueden penetrar en la superficie terrestre y, por lo tanto, interactuar con los ojos¹³.

No obstante, gracias a los efectos de filtrado de la córnea y de las lentes del ojo, que atenúan la radiación que penetra, sólo una pequeña fracción llega a la retina.

· Efectos de la radiación ultravioleta en la retina

La radiación UV no ha sido considerada como un factor principal en la inducción de daños en la retina¹⁰, ya que ésta se encuentra protegida de la misma gracias a la filtración que realiza el cristalino. No obstante, en etapas tempranas, cuando el cristalino no tiene toda la capacidad para filtrar la radiación, existe un mayor riesgo a desarrollar enfermedades retinianas¹⁴ como la Degeneración Macular Asociada a la Edad (AMD).

Por otro lado, la paulatina destrucción de la capa de ozono ha conducido a un incremento de la radiación en la superficie terrestre¹³ y esto, junto al aumento de la esperanza de vida de las personas, puede resultar en una mayor exposición de la retina a la radiación UV.

Sin embargo, cuando se observa el Sol de manera directa, la pupila se encuentra en miosis extrema, de modo que la cantidad de energía recibida es, probablemente, no más de 6% de la calculada para la pupila normal. Asimismo, la diminuta área de la imagen solar favorece una rápida disipación de la energía¹⁵. No obstante, se han descrito efectos negativos en la retina debido a la radiación solar como la Retinopatía Solar.

La Retinopatía Solar también conocida como Retinitis Foveomacular es una patología que afecta la retina, particularmente a la mácula, debido a un daño producido por una exposición prolongada a la radiación solar o a otra fuente de luz. Usualmente ocurre mirando el Sol, ante un eclipse solar u observando una fuente de radiación UV¹⁶.

La extensión del daño en la retina depende de la intensidad de la exposición solar y tal daño puede ocurrir por tres mecanismos: fotoquímico, mecánico y térmico.

Existen, por tanto, varios efectos de la radiación solar, más concretamente de la de UV cercana, en la retina.

Antecedentes

La primera descripción de daño en la retina en rata derivado de la exposición a la luz solar fue realizada en 1966 por Noell *et al.* en el capítulo **“Retinal damage by light in rats”** basado en el análisis de electroretinograma (ERG) e histología. Esta publicación describe un espectro de acción funcional para el daño provocado por la luz, que es similar al espectro de absorción de la rodopsina, y formula tres hipótesis que influyen en gran parte de nuestro pensamiento actual sobre el mecanismo de daño en la retina.

Históricamente, el trabajo en esta área ha progresado desde las primeras descripciones del daño en la retina por la luz UV, hasta los análisis recientes de los mecanismos de acción.

En 1990, van Norren y Schellekens en el artículo **“Blue light hazard in rat”** estudiaron los riesgos de la luz azul en rata y encontraron en la región de UV cercano el pico del potencial de acción.

Más recientemente, Wilson *et al.* (2003) en el artículo **“Comet Assay of UV-Induced DNA Damage in Retinal Pigment Epithelial Cells”** generaron un perfil de genes expresados en la retina, RPE y coroides después del tratamiento con un láser de Argón e identificaron otros genes que tenían efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades retinianas angiogénicas mediante la fotocoagulación.

Objetivos

Dada la problemática actual derivada del agujero en la capa de ozono y de la sobreexposición continuada en algunos casos a la radiación ultravioleta, es conveniente conocer y caracterizar los efectos que este tipo de radiación puede causar en la retina.

En la literatura, han sido descritos varios efectos de la radiación UV en la retina en tiempos de exposición prolongados y usando fuentes de radiación con una alta intensidad. Sin embargo, son menos conocidos los efectos en tiempos de exposición breves.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es evaluar los efectos producidos por la radiación ultravioleta en la retina de ratón pigmentado, utilizando tiempos de exposición breves y provocados con un láser de bajo coste. Se usaron diferentes tiempos de irradiación con el fin de simular los diferentes tipos de exposición a la luz solar.

Asimismo, el estudio tiene como objetivo verificar la utilización de un láser de bajo coste en lugar de un láser convencional. De ser apto su uso, supondría un gran ahorro económico para los laboratorios.

Métodos

· Manipulación de los animales

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados en concordancia con la normativa europea y española reguladora del uso de animales en investigación.

Los animales utilizados fueron hembras de ratón adultas de la cepa C57/Bl6 procedentes de la colonia de cría del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández en el campus de Elche. Todos ellos fueron pesados previamente e identificados con nombres arbitrarios. El mantenimiento de los animales fue con agua y pienso *ad libitum*, siguiendo un ciclo de 12h:12h (luz-oscuridad).

Para poder llevar a cabo correctamente el experimento los animales fueron anestesiados antes de la inducción y estudio de la lesión. Se usaron inyecciones por vía intraperitoneal que combinaban dos tipos de compuestos, xilacina (10 mg/kg de Xilagesic® 2%, Calier S.A.) y ketamina (70 mg/kg de Ketamidor® 100mg/mL, Riohterpharma ag) ambas destinadas para uso veterinario. Previamente a la anestesia se sedaron los animales con isoflurano inhalado (Isoflo 100% p/p, Esteve Veterinaria).

Transcurridos quince días desde el momento de la lesión, los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical.

· Estudio OCT

Anteriormente a la inducción de la lesión, todos los animales fueron analizados por un equipo de Tomografía de Coherencia Óptica, a partir de ahora OCT, para descartar patologías en el ojo del animal.

El OCT es una tecnología de imágenes médicas sin contacto similar a la ecografía y a la resonancia magnética. Con esta tecnología, la luz reflejada se utiliza para producir imágenes detalladas de la sección transversal y 3D del ojo. El modelo utilizado mide simultáneamente múltiples longitudes de onda de la luz reflejada a través del espectro.

Esta tecnología permite realizar el diagnóstico, control y seguimiento de las diferentes capas de la retina.

El equipamiento utilizado en el estudio fue Heidelberg engineering OCT SPECTRALIS® modelo OCT Plus (**Figura 4**). Este equipo consta de tres láseres de distintas longitudes de onda (infrarrojo≈815nm, azul≈488nm y verde≈518nm) que proporcionan información procedente de las diferentes estructuras de la retina.

En adición, el equipo combina el barrido infrarrojo con el modo multicanal, en el cual el equipo utiliza los tres tipos de láseres que dispone para generar una composición de imágenes superpuestas.



Figura 4. Imagen del equipo OCT utilizado en el estudio.

Para observar a los animales correctamente se les anestesió antes del reconocimiento. También se requirió el uso de una lente de contacto y de un dilatador de pupila (1% tropicamida, COLIRCUSÍ®, Alcon Cusí, S.A). Asimismo, para evitar la desecación de los ojos, tras cada análisis se les aplicó gel oftálmico (Lipolac®, Angelini Farmacéutica, S.A.)

Además, tras la lesión también se utilizó la Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) como técnica de seguimiento. El protocolo de manejo de los animales fue el mismo que el seguido en la fase previa a la lesión.

Conforme a la bibliografía consultada, se decidió realizar el seguimiento cada cuatro días durante quince días. Tras quince días, los animales fueron sacrificados. Después del sacrificio se procedió a la extracción de los ojos de los animales con el fin de observar histológicamente los efectos producidos en la retina.

· *Lesión*

- *Sistema de retención y caracterización del láser*

Para la mantener la reproducibilidad del experimento se ideó un sistema de retención de los animales colocado sobre un sistema de orientación angular, en el que ángulos y distancias estaban definidos. De igual modo, el láser utilizado se encontraba sobre una montura de 2,5 cm de altura inmóvil gracias a dos aros fijos situados en la misma.

El modelo del láser utilizado fue un LZCS - Classic 405nm 50mW Focusable Violet Laser Pointer (LZCS405-050) de Lazerer. Este láser tiene una potencia descrita de 50mW y trabaja con un voltaje de 3.7 V. El material del que está hecho es de aluminio y el láser es focalizable. Para comprobar la fiabilidad del láser utilizado se decidió medir su potencia, resultando ser de 18 mW.

- *Distancia y ángulo*

Se realizaron varias pruebas para establecer la distancia óptima de focalización y se decidió que ésta era de 1 cm desde el láser al ojo del animal. En este caso el tamaño de spot es de 1,5 mm.

Asimismo, se utilizaron varios ángulos de incidencia hasta optar por un ángulo de 70 grados respecto a la horizontal para llevar a cabo la lesión. Esta angulación nos permitía un correcto análisis por OCT del daño ocasionado.

- *Manejo del láser*

El láser se encontraba pulsado de forma continua gracias al uso de un aro colocado sobre el interruptor del mismo. Y el suministro de corriente se controlaba a través de

scripts en Python y un ordenador. Este suministro variaba en el número y duración de los pulsos dependiendo de cada ensayo (**Tabla 1**).

- *Grupos de estudio*

Se establecieron cinco grupos de ensayo en función del número y duración de cada pulso. Asimismo, el número y duración de cada pulso se decidió según la cantidad de veces que un ojo humano adulto parpadea por minuto que, en situaciones normales es un promedio de diez¹⁸ y, cuando se fija la vista, se reduce considerablemente.

En consecuencia, los ensayos en los que se irradia con pulsos de tres segundos corresponden a situaciones en las que la vista no permanece fija y, al contrario ocurre con los pulsos de diez segundos, que corresponden a situaciones en las que la vista se centra en un objeto o acción estática.

Además, para comprobar los efectos de estos dos tipos de situaciones a diferentes tiempos de exposición, se utilizaron tiempos de uno y cinco minutos, dependiendo de si se trataba de un momento puntual o una exposición mantenida. Finalmente se añadió un grupo de sobreexposición, en el cual se irradia la retina del animal durante 45s, con pulsos continuos de 15s.

- Grupo I Corresponde a una exposición normal cuando se observa una fuente de luz de forma no fija.
- Grupo II. Corresponde a una exposición continuada cuando se observa una fuente de luz de forma no fija.
- Grupo III. Corresponde a una exposición normal cuando se observa una fuente de luz de manera fija.
- Grupo IV. Corresponde a una exposición continuada cuando se observa una fuente de luz fijamente.
- Grupo V. Corresponde a una sobre exposición al haz de luz UV.

	Nº de pulsos	Duración pulso (s)	Tiempo interpulso (s)	Distancia (cm)
GRUPO I	17	3	0,5	1
GRUPO II	85	3	0,5	1
GRUPO III	6	10	0,5	1
GRUPO IV	29	10	0,5	1
IND. V	3	15	1	1

Tabla 1. Resumen de los diferentes casos de estudio. Variación del número de pulsos, duración de estos, tiempo entre ellos y la distancia al ojo del animal.

· *Procesamiento histológico de la retina*

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la inclusión en parafina de los ojos estudiados, con el fin de analizar sus estructuras histológicamente. En primer lugar, fueron fijados durante 90 minutos en paraformaldehído al 4%. Seguidamente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón fosfato 0,1M para eliminar el paraformaldehído y se siguió el protocolo siguiente para su inclusión en parafina.

- Retirada de tampón y deshidratación del tejido:
 1. Alcohol 70% durante 45 minutos.
 2. Alcohol 80% durante 45 minutos.
 3. Alcohol 90% durante 45 minutos.
 4. Alcohol 100% durante 45 minutos.
 5. Alcohol 100% durante 45 minutos.
 6. Alcohol 100% durante 45 minutos.
 7. Xileno durante 45 minutos.
 8. Xileno durante 45 minutos.
 9. Xileno durante 45 minutos.
- Inclusión en parafina:
 1. Incubación de ambos ojos durante 45 minutos en parafina (Surgipath®) a 56°. Extracción de la parafina.
 2. Incubación durante 45 minutos en parafina a 56°. Extracción de parafina.
 3. Colocación del tejido en la orientación correcta dentro de los soportes plastificados, relleno con parafina y solidificación en el equipo de inclusión (Myr® modelo AP280-2)

- *Seccionado del tejido*

Una vez incluidos los ojos de los animales utilizados en el experimento se procedió al seccionado de los mismos para su posterior tinción. Para ello, se utilizó el microtomo Microm® Heidelberg modelo 350s.

Las secciones se realizaron con un grosor de 7µm. Para su correcta obtención, se respetaron los tiempos de enfriamiento de las muestras así como el uso de amoníaco (3% en agua destilada) para evitar su deterioro. Finalmente se utilizaron portaobjetos pretratados con TESPA (3-aminopropil-trietoxisilano) para su almacenamiento.

- *Tinción en Hematoxilina-Eosina*

Con el fin de obtener imágenes histológicas de la retina y observar y cuantificar los efectos producidos por el láser ultravioleta, se tiñeron las secciones con Hematoxilina de Harris y Eosina.

Este método de tinción es uno de los más utilizados en histología animal y se caracteriza por la tinción diferencial de las estructuras ácidas y básicas presentes en los tejidos. La hematoxilina es una sustancia básica que, por lo tanto, tiñe estructuras basófilas, como el núcleo celular, en tonalidades púrpura. Por el contrario, la eosina es una sustancia ácida que tiñe estructuras básicas, como el citoplasma, de color rosáceo.

A continuación se describe el protocolo seguido para la tinción de los cortes.

- *Hidratación:*

1. Xilol I durante 5 minutos.
2. Xilol II durante 5 minutos.
3. Alcohol 100% durante 3 minutos.
4. Alcohol 96% durante 3 minutos.
5. Alcohol 70% durante 3 minutos.
6. Agua destilada durante 5 minutos.
7. Hematoxilina durante 15 minutos.
8. Agua destilada durante 5 minutos. Esta etapa se repite una vez más con agua destilada limpia.

9. Eosina 1% durante 6 minutos.
10. Agua destilada durante 3 minutos.

➤ **Deshidratación:**

1. Alcohol 70% durante 3 minutos.
2. Alcohol 96% durante 3 minutos.
3. Alcohol 100% durante 3 minutos.
4. Xilol I durante 3 minutos.
5. Xilol II durante 5 minutos.

Para el almacenamiento de los portaobjetos se recubrieron las muestras con el medio de montaje Eukitt (Akralab, Barcelona, España) y finalmente se taparon con cubreobjetos. Después se dejaron secar durante 24h para por fin almacenarlos en estuches identificados.

▪ *Imágenes de microscopía óptica*

Tras la tinción de las diferentes muestras obtenidas, estas se visualizaron mediante un microscopio óptico Olympus® modelo AX70 Provis (**Figura 6**). Para la obtención de imágenes a diferentes aumentos, se utilizó el software Olympus® DP-Soft. Finalmente, para analizar las imágenes, tanto las obtenidas con el microscopio óptico como las obtenidas en el OCT, se utilizó el software Image J®.



Figura 6. Imágenes del microscopio óptico Olympus® modelo AX70 Provis.

Resultados

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los grupos estudiados, para finalmente contrastarlos con los resultados presentes en la bibliografía.

OCT y estudio histológico

Gracias a los diferentes modos de adquisición de imágenes del equipo de OCT, se pudieron observar tanto el fondo del ojo como la retina. El barrido del láser infrarrojo reveló la estructura del fondo del ojo y la retina; permitiendo diferenciar la localización y el tipo de lesión que presentaban.

No obstante, la información que proporciona el OCT no es suficiente para llegar a una conclusión exacta, por lo que se complementaron las pruebas de OCT con el estudio histológico. Este estudio permitió observar la retina a nivel celular.

Grupos de estudio

Conforme a lo descrito anteriormente, se dividieron los animales del estudio en cinco grupos dependiendo del tipo de estimulación con el láser, con el fin de simular los tipos de exposición a la luz UV proveniente del Sol.

En todos los grupos se llevó a cabo un estudio de OCT previo al ensayo, para descartar patologías oculares previas y tener una referencia control inicial. A continuación, se procedió al análisis de la estructura de la retina, con el equipo de OCT, a los cuatro, ocho y quince días después de la lesión. Finalmente, se procedió al sacrificio de los animales y al estudio histológico del tejido. En la figura 7 se muestra la fotografía tomada como control para el estudio de la histología.

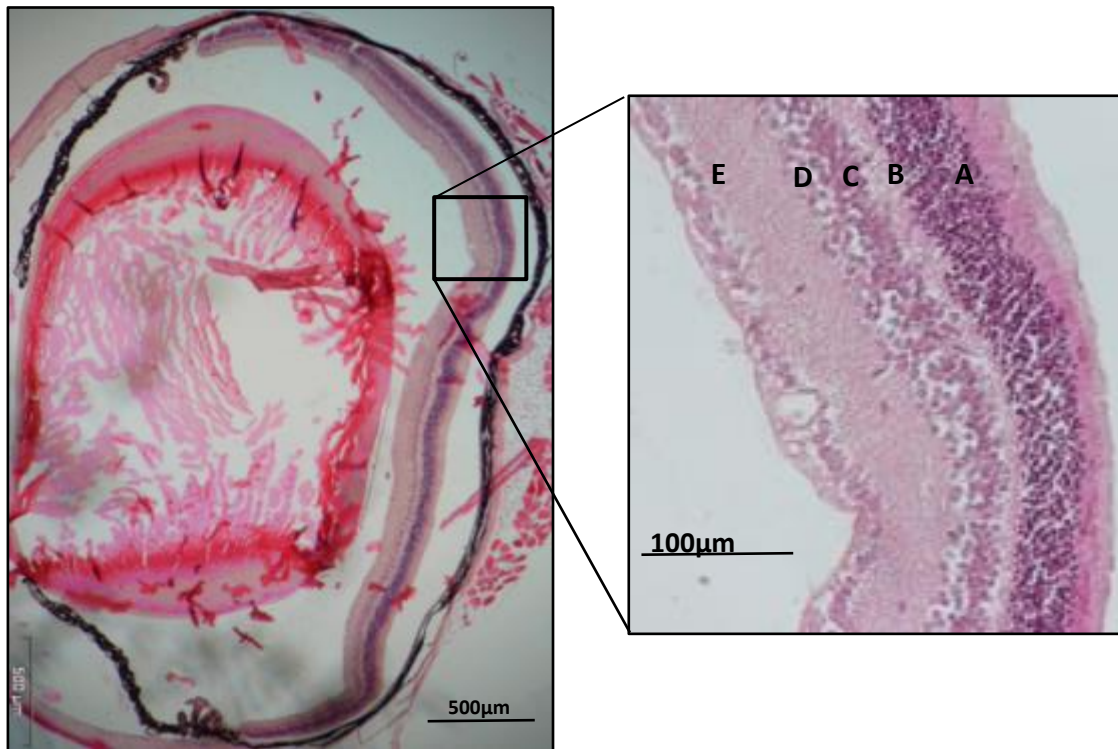


Figura 7. Imágenes histológicas control. Tinción en hematoxilina-eosina de una sección de la retina. (A) Capa Nuclear Externa, (B) Capa Plexiforme Externa, (C) Capa Nuclear Interna, (D) Capa Plexiforme Interna, (E) Capa de Células Ganglionares.

Grupo I

Para realizar la primera lesión se irradió durante un minuto al animal con pulsos de tres segundos. Comparando las imágenes OCT (**Figura 8**) tomadas durante los días cuatro y ocho del estudio con las tomadas previamente a la inducción de la lesión, no se observaron cambios significativos en la retina con este modelo de lesión. No obstante, se procedió a la toma de imágenes histológicas. Las fotografías obtenidas con el microscopio óptico (**Figura 9**) confirman los resultados obtenidos con el OCT, no aparecen alteraciones en las diferentes capas de la retina.

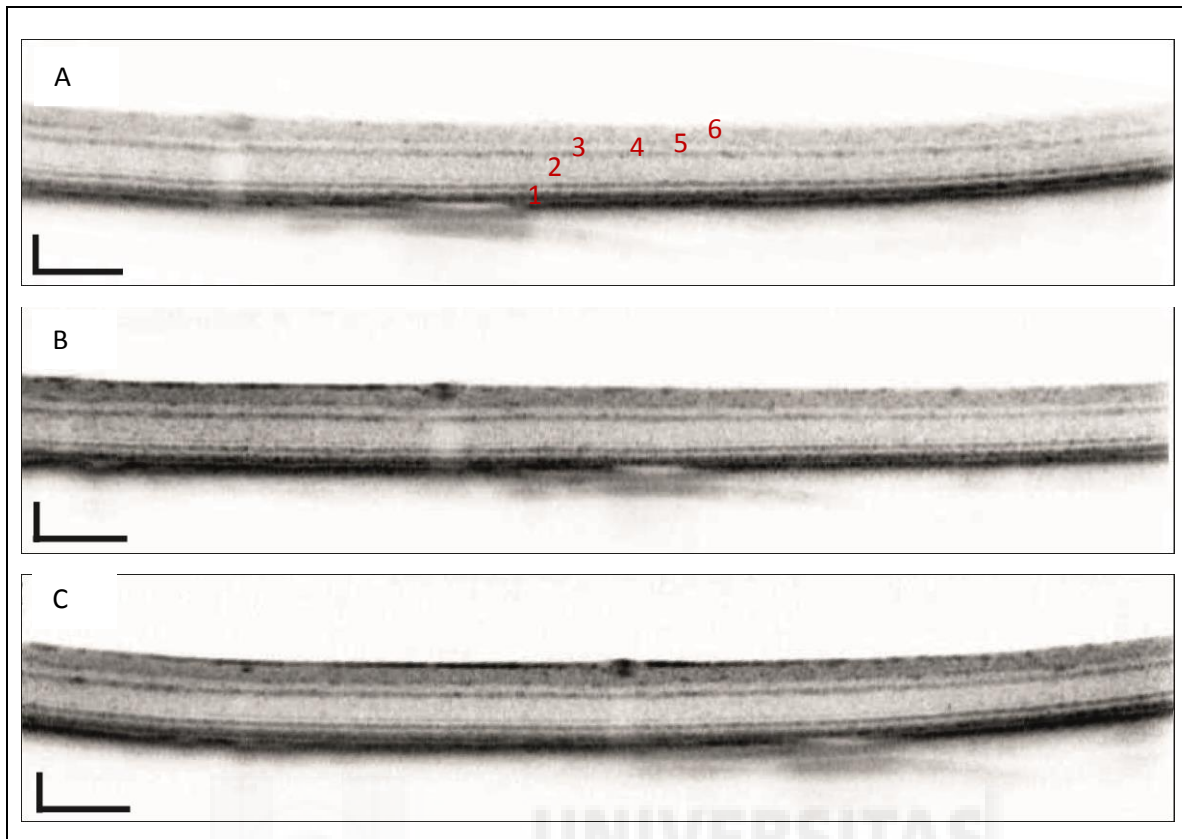


Figura 8. Imágenes OCT de la retina. Se muestran las imágenes tomadas por OCT antes de la lesión (A), tras 4 días (B) y a los 8 días (C) de las capas de la retina. (1) Epitelio pigmentario, (2) Capa Nuclear Externa, (3) Capa Plexiforme Externa, (4) Capa Nuclear Interna, (5) Capa Plexiforme Interna, (6) Capa de las células Ganglionares. Escala de 100 μ m.

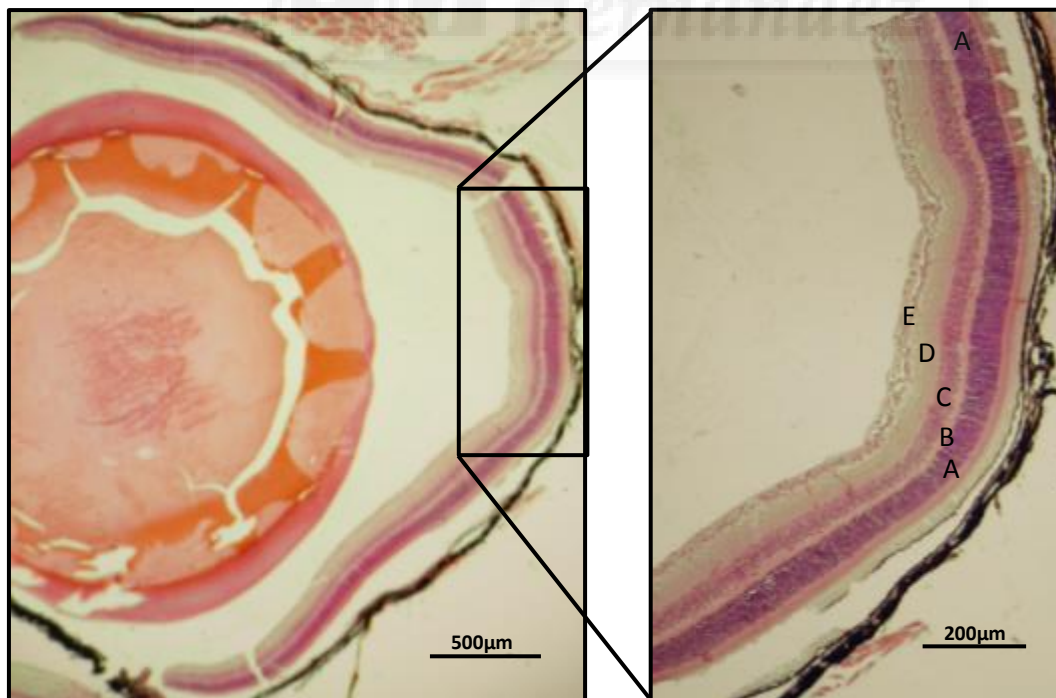


Figura 9. Imágenes de microscopía óptica de una sección transversal de la retina a los 15 días de ensayo. Tinción con hematoxilina-eosina. (A) Capa Nuclear Externa, (B) Capa Plexiforme Externa, (C) Capa Nuclear Interna, (D) Capa Plexiforme Interna, (E) Capa de Células Ganglionares.

· Grupo II

Para llevar a cabo el segundo estudio, se irradió al animal durante cinco minutos en pulsos de tres segundos de duración. Este ensayo simula una exposición prolongada a la fuente de radiación UV, pero con una frecuencia de parpadeo normal. Los resultados obtenidos tras el análisis por OCT se muestran en la figura 10. Como puede observarse, al igual que en el caso anterior, no se revelaron cambios significativos en la retina del animal. Transcurridos 15 días se procedió al estudio histológico de la retina. Las fotografías proporcionadas por el microscopio óptico (**Figura 11**) tampoco muestran ningún daño aparente en la retina, en concordancia con las obtenidas en el estudio de OCT.



Figura 10. Imágenes OCT de la retina. Se muestran las imágenes tomadas antes de la lesión (A), tras 4 días (B) y a los 8 días (C) de las capas de la retina. (1) Epitelio pigmentario, (2) Capa Nuclear Externa, (3) Capa Plexiforme Externa, (4) Capa Nuclear Interna, (5) Capa Plexiforme Interna, (6) Capa de las células Ganglionares. Escala de 100 μm .



Figura 11. Imágenes de microscopía óptica de una sección transversal de la retina a los 15 días de ensayo. Tinción con hematoxilina-eosina. (A) Capa Nuclear Externa, (B) Capa Plexiforme Externa, (C) Capa Nuclear Interna, (D) Capa Plexiforme Interna, (E) Capa de Células Ganglionares.

· Grupo III

En este caso se irradió al animal durante un minuto con pulsos de diez segundos de duración. Este tipo de lesión correspondería a una exposición corta a la luz UV en situaciones en las que disminuye el número de parpadeos por minuto, debido a la observación de un objeto fijo. En este caso se apreció una opacidad al cuarto día de la lesión, que no mejoró en los días posteriores hasta el sacrificio del animal. Esto puede deberse al efecto térmico que producen las fuentes de luz como el láser. El láser, al interaccionar con el ojo, puede haber creado una inflamación e incluso una lesión en tejidos más externos, como es la córnea. Sin embargo, se compararon las fotografías de la retina en el equipo de OCT (**Figura 12**) de los posteriores días con las previas a la lesión y, como en los casos anteriores, no se observaron cambios significativos en la retina del animal. En este caso no se muestran las fotografías realizadas al octavo día debido a un fallo en la adquisición de las mismas.

Una vez terminado el estudio de OCT se observaron las secciones de los ojos utilizando la microscopía óptica (**Figura 13**). Las imágenes obtenidas apoyan los resultados del OCT, mostrando una retina de características normales.

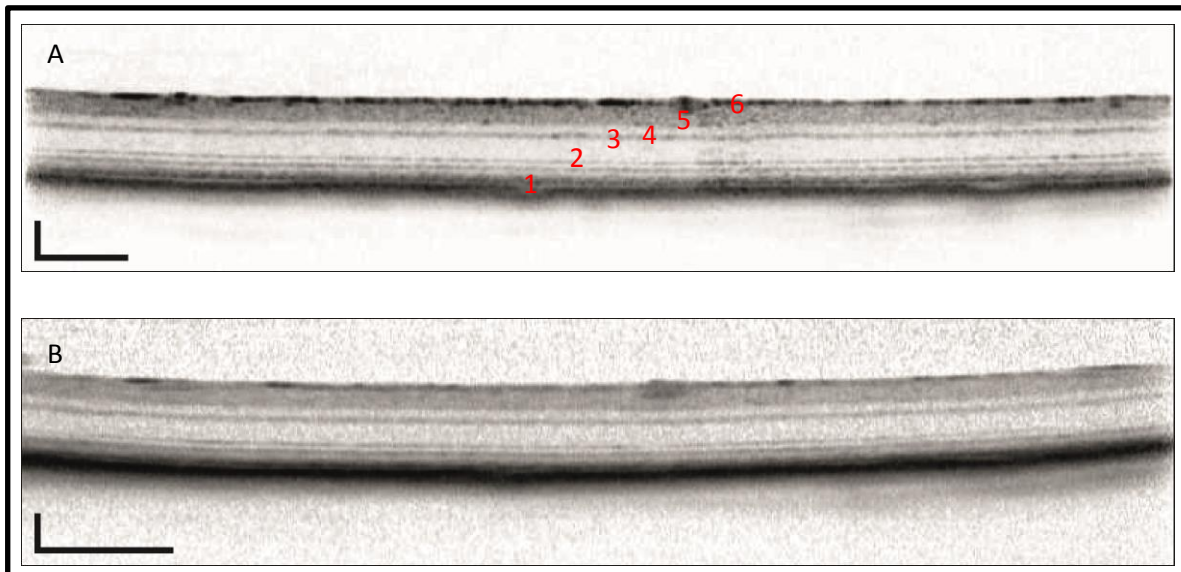


Figura 12. Imágenes OCT de la retina. Se muestran las imágenes tomadas antes de la lesión (A) y tras 4 días (B) de las capas de la retina. (1) Epitelio pigmentario, (2) Capa Nuclear Externa, (3) Capa Plexiforme Externa, (4) Capa Nuclear Interna, (5) Capa Plexiforme Interna, (6) Capa de las células Ganglionares. Escala de 100 μm .

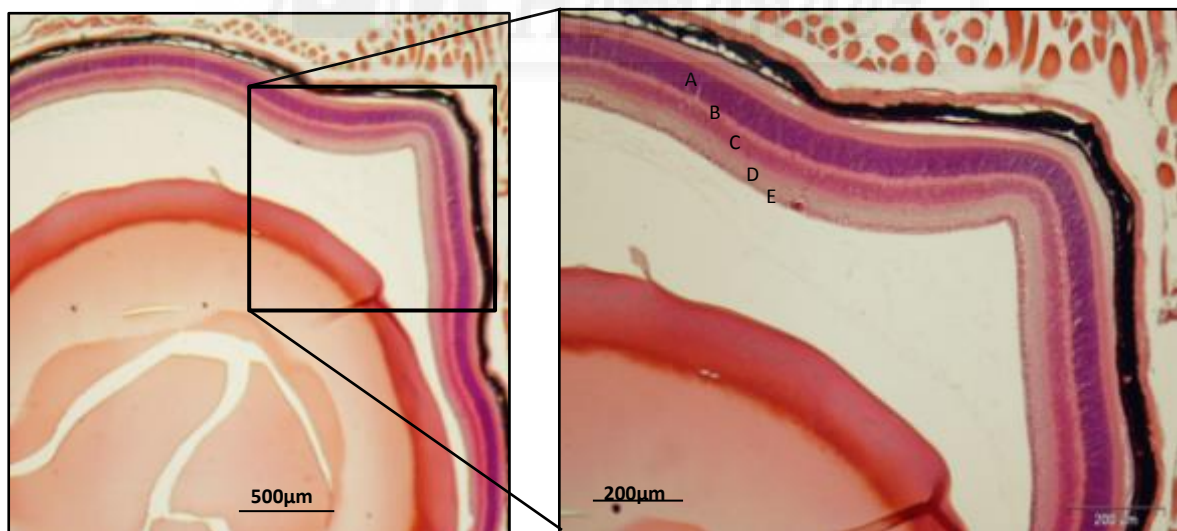


Figura 13. Imágenes de microscopía óptica de una sección transversal de la retina a los 15 días de ensayo. Tinción con hematoxilina-eosina de una sección de la retina. (A) Capa Nuclear Externa, (B) Capa Plexiforme Externa, (C) Capa Nuclear Interna, (D) Capa Plexiforme Interna, (E) Capa de Células Ganglionares.

•Grupo IV

Para realizar este ensayo se irradió al animal durante cinco minutos con una duración de pulsos de diez segundos. Este caso simularía una sobre exposición a la luz UV cuando se observa la fuente de forma ininterrumpida, como por ejemplo, durante la visión de un eclipse. Los resultados del estudio OCT (**Figura 14**) no mostraron ningún efecto en la retina del animal, aunque al cuarto día se apreció una opacidad en el ojo, como en el caso anterior. Seguidamente se procedió al estudio de microscopía óptica (**Figura 15**) para consolidar la información proporcionada por el OCT.

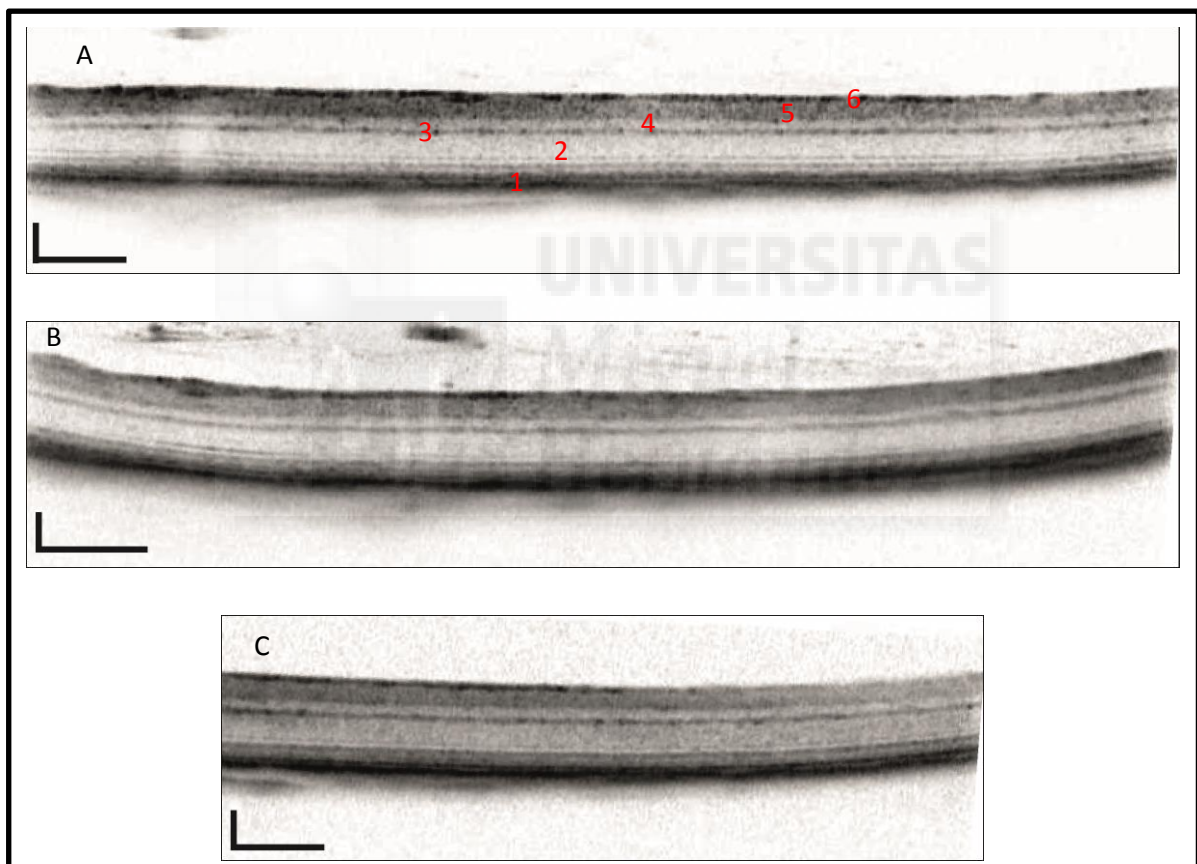


Figura 14. Imágenes OCT del fondo del ojo y de la retina. Se muestran las imágenes tomadas antes de la lesión (A), a los 4 (B) y 8 días (C) de la retina. (1) Epitelio pigmentario, (2) Capa Nuclear Externa, (3) Capa Plexiforme Externa, (4) Capa Nuclear Interna, (5) Capa Plexiforme Interna, (6) Capa de las células Ganglionares. Escala de 100 μm .

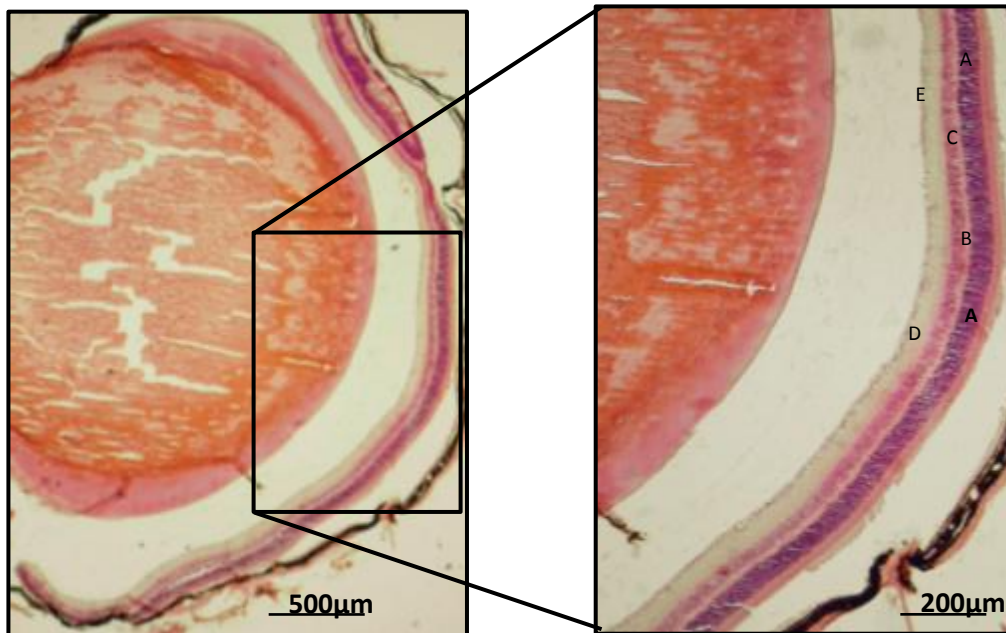


Figura 15. Imágenes de microscopía óptica de una sección transversal de la retina a los 15 días de ensayo. Tinción con hematoxilina-eosina de una sección de la retina. (A) Capa Nuclear Externa, (B) Capa Plexiforme Externa, (C) Capa Nuclear Interna, (D) Capa Plexiforme Interna, (E) Capa de Células Ganglionares.

•Grupo V

Este estudio corresponde a una sobre exposición continuada a la luz UV. Se irradió el ojo del animal durante cuarenta y cinco segundos con pulsos de quince segundos de duración.

En este caso, sí se observaron efectos sobre la retina del animal. Aparecen al cuarto día desprendimientos de retina en varias localizaciones del ojo (**Figuras 16 y 17**). En las imágenes tomadas por OCT se aprecia como la capa más externa de la retina sufre desprendimientos en algunas zonas. Estos desprendimientos van disminuyendo hasta desaparecer con el paso de los días.

Para verificar si la retina había recuperado su estructura normal o si presentaba alguna lesión se procedió al estudio histológico (**Figura 18**). Las fotografías del microscopio óptico mostraron una retina de características aparentemente normales, por lo que la retina se había recuperado de las lesiones iniciales.



Figura 17. Imágenes OCT de la retina. Se muestran las imágenes tomadas antes de la lesión (A), tras 4 días (B) y a los 8 días (C) de las capas de la retina en una de las áreas afectadas por el láser. Las flechas rojas señalan los desprendimientos en la capa de los fotorreceptores. (1) Epitelio pigmentario, (2) Capa Nuclear Externa, (3) Capa Plexiforme Externa, (4) Capa Nuclear Interna, (5) Capa Plexiforme Interna, (6) Capa de las células Ganglionares. Escala 100 μ m.

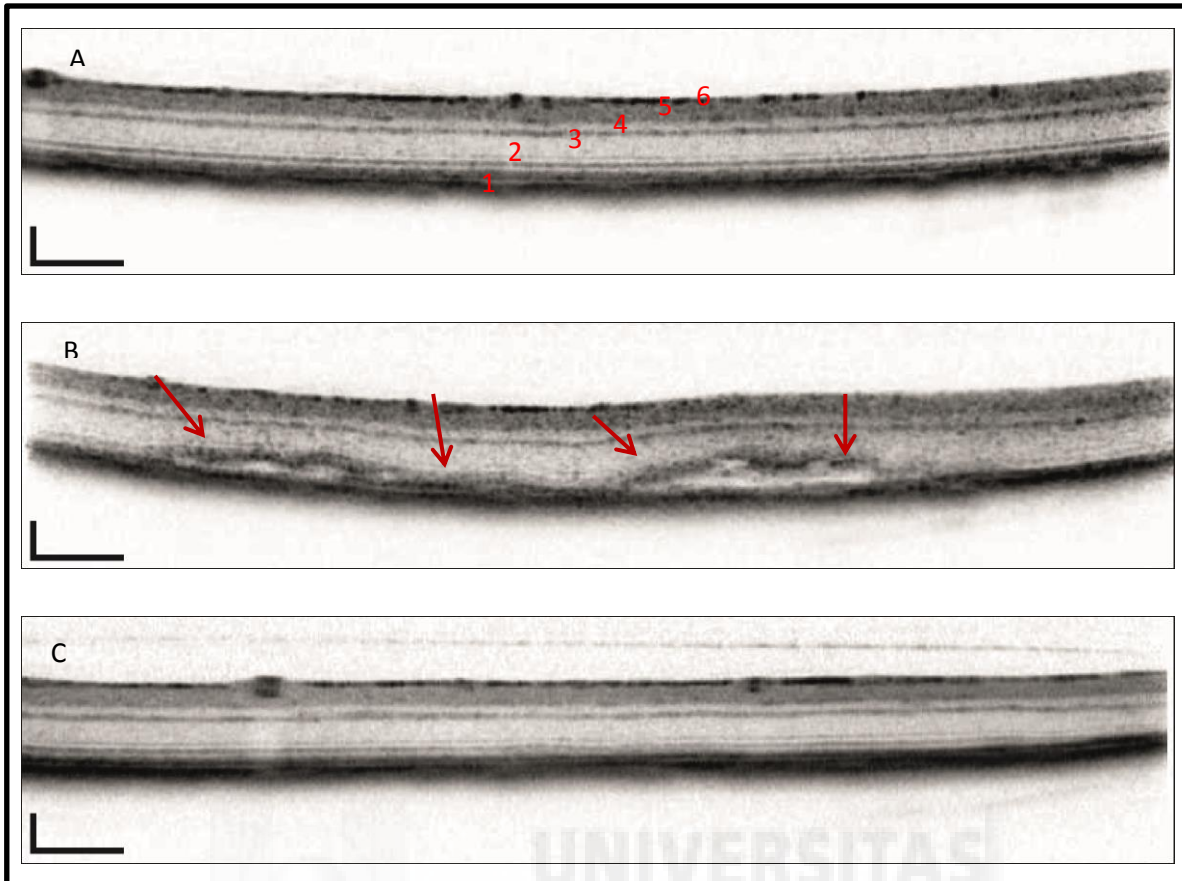


Figura 18. Imágenes OCT de la retina. Se muestran las imágenes tomadas antes de la lesión (A), tras 4 días (B) y a los 8 días (C) de las capas de la retina en una de las áreas afectadas (2) por el láser. Las flechas rojas señalan los desprendimientos en la capa de células fotorreceptoras. (1) Epitelio pigmentario, (2) Capa Nuclear Externa, (3) Capa Plexiforme Externa, (4) Capa Nuclear Interna, (5) Capa Plexiforme Interna, (6) Capa de las células Ganglionares. Escala 100 μ m.

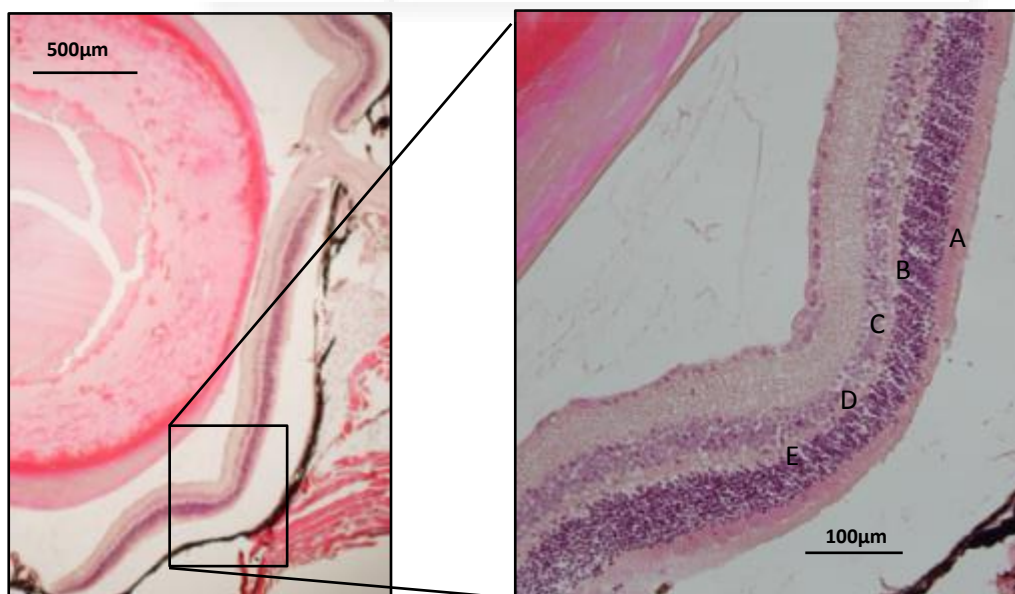


Figura 19. Imágenes de microscopía óptica de una sección transversal de la retina a los 15 días de lesión. Tinción con hematoxilina-eosina de una sección de la retina. (A) Capa Nuclear Externa, (B) Capa Plexiforme Externa, (C) Capa Nuclear Interna, (D) Capa Plexiforme Interna, (E) Capa de Células Ganglionares.

Conclusiones

Los resultados obtenidos, tanto del OCT como del estudio histológico, para los grupos I y II, no revelaron ninguna anomalía en la retina a lo largo de todos los días de estudio. Por tanto, se sugiere que estos modelos de lesión, con la potencia de láser utilizado, no producen ningún efecto negativo aparente en la retina.

De igual modo ocurre con los grupos III y IV, con la diferencia de que en estos grupos sí apareció un efecto en el ojo del animal. La opacidad observada se debió, probablemente, al efecto térmico de la radiación incidente, ya que, puede producir también cambios químicos.

Sin embargo, para el grupo V, sí se pudieron distinguir cambios estructurales en la retina durante el primer reconocimiento (día cuatro) en el estudio de OCT. Así, aparecieron desprendimientos en la capa de fotorreceptores que, con el paso del tiempo, se fueron recuperando. Estos desprendimientos pueden deberse a la combinación del efecto térmico y de los cambios fotoquímicos mediados por la absorción de la radiación UV. Si el proceso fotoquímico es reforzado térmicamente, son la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores junto con la del epitelio pigmentario (RPE), las más susceptibles a la radiación UV¹⁹, ya que es donde la rodopsina y los fotopigmentos de los conos tienen picos de absorción más fuertes. La recuperación temprana de estos desprendimientos puede deberse a la baja potencia del láser junto a la corta exposición durante el ensayo.

Por tanto, el ensayo del grupo V, sugiere producir efectos negativos en la retina que, a corto plazo, se recuperan. Estos resultados concuerdan con los descritos en la literatura, aumentando la gravedad de la lesión según aumenta el tiempo de exposición y la potencia de la fuente de radiación utilizada.

Asimismo, los resultados obtenidos en el grupo V con el láser de bajo coste, confirman la utilidad de este tipo de láser para estudios posteriores abaratando costes y posibilitando un mayor acceso a todo investigador.

Bibliografía

1. Gonzalez R.C., Woods R.E. (1992). *Digital Image Processing*. Addison Wesley.
2. Rodieck R. (1973). *The Vertebrate Retina*, W.H. Freeman Press, San Francisco.
3. Levick W.R., Dvorak D.R. (1986). The retina – from molecules to networks, *TINS*, 9: 181-185.
4. Dowling J.E. (1987) *The Retina: an Approachable Part of the Brain*, Harvard University Press, Cambridge, MA.
5. Alañón F.J., Cárdenas M., Alañón M.A., Martos A. *Anatomía y Fisiología del aparato ocular* (2002). Edit. Mediterráneo, Santiago de Chile.
6. Fernández E. (2007). *Retinosis Pigmentaria: Preguntas y Respuestas*. ISBN: 978-84-690-6696-6.
7. Yanoff M., Cameron D. Disorders of the visual system. In: Goldman L, Schafer AI, eds. *Cecil Medicine*
8. Meister M., Pine J., Baylor D.A. (1993). Multi-neuronal signals from the retina: acquisition and analysis, *Journal of Neuroscience Methods*, 51: 95-106.
9. Bailey R.A., Clarck H.M., Ferris J.P., Krause S. y Strong R.L. (1978). *Chemistry of the Environment*. Academic Press
10. Health Council of the Netherlands. Risks of UV Radiation Committee. UV radiation from sunlight. The Hague, The Netherlands: Health Council of the Netherlands; 1994. Publication 1994/05E.
11. Olsen E.D. (1990), *Modern Optical Methods of Analysis* p156, McGraw-Hill Book Company, New York.
12. Wark K., y Warner C. F. (1990). *Contaminación del aire*. Ed. Limusa
13. Frederick J.E. Ultraviolet sunlight reaching the Earth's surface: a review of recent research. *Photochem Photobiol.*1993;57:175–178.
14. Wagner R.S. (1995). Why children must wear sunglasses. *Contemp Pediatr*, 12: 27-31
15. William. T. Ham, Jr., y Harold A. Mueller. *The Photopathology and Nature of the Blue Light and Near-UV Retinal Lesions Produced by Lasers and Other Optical Sources* (192).

16. Chen J., Lee L. (2004). Solar retinopathy and associated optical coherence tomography findings.
17. Noell W.K., Walker V.S., Kang B.S., Berman S., (1966) Retinal damage by light in rats.
18. Doughty M. J. (2002) Further Assessment of Gender- and Blink Pattern-Related Differences in the Spontaneous Eyeblink Activity in Primary Gaze in Young Adult Humans.
19. William. T. Ham, Jr., y Harold A. Mueller. The Photopathology and Nature of the Blue Light and Near-UV Retinal Lesions Produced by Lasers and Other Optical Sources (225).

