

R. 14877

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL



Queda registrada esta Tesis Doctoral
año... 134... número... 26... del libro
correspondiente.

En fe de lo cual, _____

El Jefe del Negociado de Tesis,

M. Yolanda Díaz Robledo.

T.D.
M/30(I)



ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REEPITELIZACION CORNEAL
DEL CONEJO BAJO LA ACCION DE LA RADIACION LASER DE
INFRARROJOS DE 904 NANOMETROS.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en
de la
de esta Universidad desde el día
hasta el día

Sevilla de de 19

EL DIRECTOR DE

TESIS DOCTORAL, presentada por

Antonio Martín Aroca

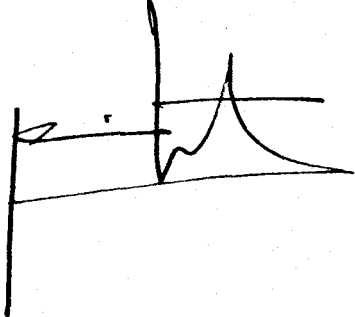
D. JESUS MONTERO MARCHENA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE / SEVILLA.

CERTIFICA : Que D. Antonio Martin Aroca ha realizado su TESIS DOCTORAL en este Departamento sobre el Tema : ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REEPITELIZACION CORNEAL DEL CONEJO BAJO LA ACCION DE LA RADIACION LASER DE INFRARROJOS DE 904 nm.

Dicha Tesis ha sido realizada bajo la Direccion del Dr. D. Jesus Montero Iruzubieta y la Co-Direccion del Prof. Dr. D. Jesus Montero Marchena.

Y para que asi conste firmo el presente en Sevilla, mayo de mil novecientos ochenta y siete

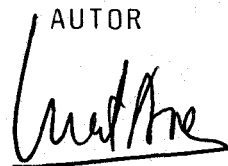
Fdo. J. MONTERO IRUZUBIETA
DIRECTOR



Fdo. J. MONTERO MARCHENA
CO-DIRECTOR



Fdo. A. MARTIN AROCA
AUTOR



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
D.T.O. DE OFTALMOLOGIA
Prof. J. MONTERO MARCHENA

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Juan Ramón Zaragoza, por haber puesto a mi disposición el Servicio de Laserterapia del HUS y haberme apoyado en todo momento.

Al Prof. Dr. D. Jesús Montero Marchena, por su excelente labor de coo-dirección. Su constante apoyo y supervisión en todo momento vencieron todas las dificultades y permitieron realizar con éxito el presente trabajo.

Al Dr. D. Juan M^a Loizaga, por permitirme la utilización del Departamento de Anatomía Patológica de la Ciudad Sanitaria "Virgen del Rocío", y muy especialmente al Dr. D. Enrique Rafel, que me introdujo en el apasionante campo de la microscopía electrónica; me enseñó y alentó en todo momento y sin su ayuda no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. D^a Pilar Rodrigo, por su constante y acertada orientación y ayuda en las técnicas de laserterapia.

A los Prof. Dres. D. Emilio Fernández y D. Plácido Navas, que de forma eficaz e inmejorable me ayudaron cuando más lo necesitaba.

A los Prof. Dres. D^a Josefina Hidalgo y D. Angel Velasco, que me prestaron su apoyo incondicional en todo momento. Sus grandes cualidades investigadoras permitieron que el trabajo fuese más ameno y que se pudiera realizar con buen fin.

Al Dr. D. Alberto Hevia, por su gran colaboración prestada en la obtención de los resultados referentes a microscopía electrónica.

Al Prof. Dr. D. Enrique Lerma y a D^a Isabel Zamorano, por haberme orientado y ayudado en la realización de las técnicas histológicas.

A D^a Luisa Holgado y M^a Angeles López, que pusieron constante y desinteresadamente todo su empeño en la enseñanza práctica de las técnicas de microscopía electrónica.

Al Dr. D. Eugenio Cordero, por su magnífica e incansable labor en la iconografía.

A D. Juan Polo, por su colaboración en la interpretación de los resultados estadísticos.

A D. Fernando del Pino, por los medios facilitados.

Y a todos aquellos que me han ayudado, enseñado y animado, mis más sinceras gracias.

A M^a José, con cariño.

A todos los investigadores, que con su callada,
constante y fructífera labor hacen posible el
desarrollo de las ciencias.

INDICE

<u>TOMO I</u>	Página
- INTRODUCCION	1
SECCION I: CORNEA	2
Parte 1ª.-Anatomía e histología de la córnea	3
Parte 2ª.-Bioquímica y fisiología de la córnea	39
Parte 3ª.-Ulceras corneales y mecanismos de reparación	68
SECCION II: RADIACION LASER	120
Parte 1ª.-Fundamentos de la emisión láser	121
Parte 2ª.-Características y tipos de láser	137
Parte 3ª.-Efectos de la radiación láser y sus aplicaciones	149
Parte 4ª.-El láser en oftalmología	170
SECCION III: ANTIMETABOLITOS Y RREPITELIZACION CORNEAL	191
- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	206
- MATERIALES Y METODOS	210
 <u>TOMO II</u>	
- RESULTADOS	221
Resultados de cada grupo	222
Comparación entre grupos	421
- DISCUSION	450
- CONCLUSIONES	479
- RESUMEN	482
- BIBLIOGRAFIA	487

INTRODUCCION

SECCION I: CORNEA

PARTE 1ª.-ANATOMIA E HISTOLOGIA DE LA CORNEA

1.-EMBROLOGIA

El desarrollo de la córnea es inducido por el cáliz óptico, siendo reconocible ya en sus comienzos en embriones de 10 a 13 mm. de longitud.

Existen tres tipos básicos de células en el desarrollo de la córnea de los vertebrados, además de fibras nerviosas y algunas sustancias extracelulares. Estos constituyentes se unen entre sí en el tiempo y en el espacio, de modo que la córnea desarrolla un gran número de intrincadas diferencias funcionales: su avascularidad, fuerza tensil, turgencia, población específica de iones orgánicos, capacidad regenerativa, índice de refracción, curvatura y transparencia.

Tras la estrangulación que separa la vesícula cristalina del ectodermo, las células mesenquimatosas penetran entre ambos y forman una delgada capa entre los dos tejidos mencionados.

En líneas generales, las células ectodérmicas forman el epitelio anterior, estratificado y escamoso sobre la superficie corneal. Las células mesoteliales dan origen al endotelio, de tipo cúbico simple, sobre la cara posterior de la córnea. Los corpúsculos de origen mesodérmico se esparcen en una capa de estructura colágena que se sitúa a modo de "sandwich" entre el epitelio y el endotelio, denominado estroma corneal (Anxenfeld, 1976) (1).

Así pues, la córnea tiene un doble origen: ectodérmico y mesodérmico. El ectoblasto de recubrimiento, tras hacer crecer por su cara profunda al esbozo cristalino, dará lugar por su cara profunda a una lámina muy delgada que se colorea intensamente con el azul diamina de Mallory; esta "membrana prima" de Hensen aparece muy precozmente y precede a la aparición de todo tejido conjuntivo en el mesénquima embrionario.

Esta "membrana prima" o "mesoestroma" está formada inicialmente por fibras de colágeno, pero es acelular, y se discute aún si su origen es epitelial o mesenquimatoso (Saraux y cols., 1985) (2).

Hay que entender las dos primeras capas de mesénquima pericupular para tener una idea de la formación de la córnea.

- la primera capa aparece sobre la 6ª semana, y está compuesta por células mesenquimatosas, procedentes de la atmósfera pericupular, que penetran en el mesoestroma para formar el endotelio corneal, disponiéndose en una capa continua y única. No se trata por tanto de un "endotelio" auténtico, sino de un "mesotelio".

- la segunda capa aparece sobre la 7ª-8ª semana, y formará el contingente estromal de la córnea, infiltrándose entre el epitelio y el endotelio.

Las células del mesénquima están, por tanto, dotadas de fibrilogénesis, formando fibras colágenas cuya ordenación ulterior muestra la típica estructura laminar de la sustancia fundamental de la córnea. La riqueza celular inicial del estroma va disminuyendo progresivamente y la córnea se hace transparente.

El epitelio deriva del ectoblasto de superficie, que pasa del estado biestratificado en el tercer mes, al estado triestratificado en el quinto mes. La membrana basal deriva directamente del epitelio.

La membrana de Bowman, como capa limitante entre el epitelio y la sustancia propia, aparece hacia el cuarto o quinto mes por una diferenciación de las capas superficiales del estroma corneal.

La membrana de Descemet aparece al cuarto mes bajo el aspecto de una membrana basal granulomatosa e irregular, secretada por el endotelio corneal; hacia el octavo mes, dicha membrana basal adquiere un aspecto más lamelar con material de estriación vertical.

Este es el aspecto que presenta la membrana de Descemet en el nacimiento. El material granular que forma los tres cuartos posteriores de la membrana de Descemet es secretado después del nacimiento, y se añade en capas sucesivas al material granuloso y estado embrionario.(2).

La inervación de la córnea se inicia hacia el tercer mes, y está concluida a los nueve.

La córnea es relativamente grande en el momento del nacimiento, alcanzando sus ulteriores dimensiones aproximadamente hacia el segundo año. Al principio es más aplanada que la del adulto y, al contrario de la

forma definitiva, también está más incurvada en la periferia que en el área central (1).

2.-FUNCIONES Y PROPIEDADES DE LA CORNEA

Las funciones de la córnea vienen determinadas por sus características anatomofísicas. La peculiar composición y disposición de los elementos que la conforman hacen posible las siguientes funciones:

- mantenimiento y protección del contenido endocular.
- transparencia corneal.
- refracción ocular.

De estas funciones, la primera y la tercera son esencialmente pasivas, es decir, la córnea no trabaja para mantener las condiciones necesarias para su realización; mientras que para el mantenimiento de la transparencia corneal, se requiere un perfecto metabolismo corneal intrínseco (Sherrard ES, 1981) (3).

El mantenimiento y protección del contenido ocular es una función que comparte con la esclera, la otra túnica fibrosa que rodea al globo ocular. Esta túnica está básicamente formada por haces de colágeno aplanados, entre los que se encuentran los plexos de fibras elásticas. Las células de la esclerótica son fibroblastos alargados y aplanados; también se encuentran melanocitos en las capas más profundas, fundamentalmente en las proximidades de la entrada al nervio óptico.

La transparencia corneal es una función indispensable para proporcionar luz dentro del globo ocular y precisa un perfecto metabolismo corneal intrínseco. La córnea tiene que trabajar para permanecer transparente. Esta transparencia depende de varios factores:

- ausencia de vasos sanguíneos.
- perfecta organización tisular.
- superficie de interfase lisa y regular.
- mantenimiento de una hidratación normal de los mucopolisacáridos del estroma corneal, que dependerá de la integridad del epitelio y del endotelio (Weekers JF, 1982) (4).

La córnea es la primera y más poderosa lente del sistema óptico del ojo. La producción de una imagen nítida en la retina requiere un apropiado poder de refracción (Waltman SR, 1981) (5).

El poder de refracción de la córnea depende de su curvatura y de su índice de refracción; el radio de curvatura de la superficie anterior de la córnea en la región central es de 7,8 mm., oscilando entre 7 y 8,5 mm. en condiciones normales.

A menudo, la curvatura de la córnea central no es la misma en todos los meridianos, asemejándose su superficie a la de un huevo, produciéndose en estos casos un astigmatismo corneal.

El índice de refracción de la córnea es 1,376, lo que da a la región central anterior un poder de refracción promedio de 48 dioptrías.

La superficie posterior y cóncava de la córnea está en contacto con el humor acuoso, que tiene un índice de refracción inferior (1,336), de forma que el poder de refracción de esta superficie es de -5,8 dioptrías, lo que proporciona a la córnea el 70% del poder de refracción total del ojo, al tener ésta un poder de refracción de 43 dioptrías (5).

La curvatura de la córnea cambia un poco con el paso de los años. Es más esférica en la infancia; en la niñez y adolescencia adquiere un astigmatismo de eje mayor horizontal; vuelve a ser más esférica en la edad media y en la vejez astigmática de eje mayor vertical.

El grosor de la córnea en su porción central también aumenta un poco con la edad, sin embargo, en las enfermedades del segmento anterior, puede producirse un ligero aumento en el grosor de la córnea sin que exista evidencia clínica de edema de córnea o cicatrización de la misma.

3.-ANATOMIA

La córnea es una membrana fibrosa enclavada en la abertura anterior de la esclerótica y, junto a ésta, constituye la envoltura fibrosa del globo ocular, proporcionándole forma y firmeza; pero al contrario que la esclerótica, la córnea es transparente con una superficie lisa y brillante refractando así la luz incidente. Es a la vez una envoltura resistente

y un medio transparente, y estos dos aspectos condicionan su anatomía.

Situada en el orificio anterior de la esclerótica, la córnea presenta una curvatura más acentuada que el resto del globo ocular.

La córnea posee una incurvación mayor que la del la esclerótica y se halla engastada en ella oblicuamente, como un cristal de reloj, formándose una zona de transición de aproximadamente 1 mm. de anchura. La conjuntiva llega hasta este sector, de forma que aquí hallamos superpuestas las tres capas: conjuntiva, esclerótica y córnea (Fig. 1) (1).

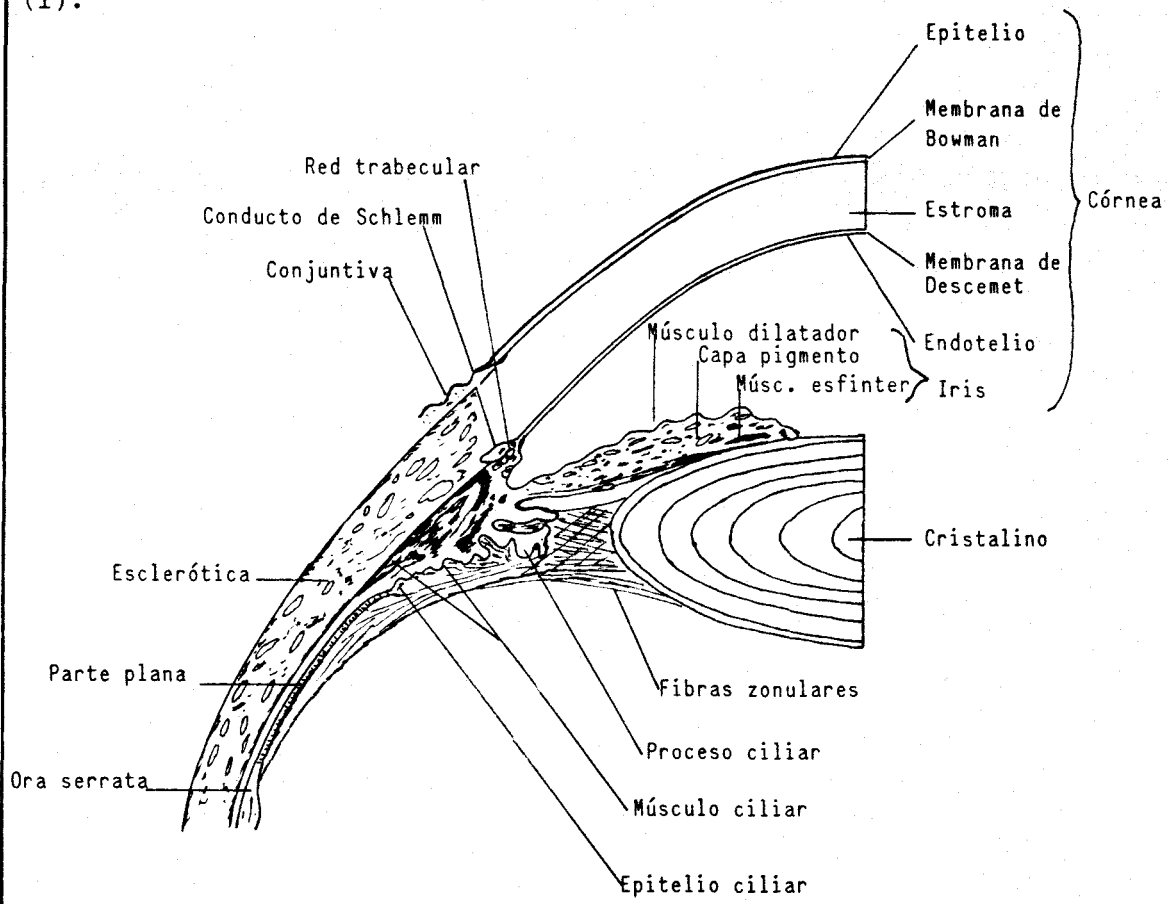


Fig. 1.- Angulo de la cámara anterior y estructuras circunvecinas. (1)

Esta zona marginal, llamada limbo, ocupa una posición especial respecto a los tejidos que la constituyen, siendo algo más ancha hacia arriba y por abajo que en la dirección nasal y temporal; el resultado es que la córnea, vista desde delante, muestra una forma ligeramente oval en el diámetro transversal. Esto se debe a que la esclerótica y la conjuntiva entran más en la córnea por arriba y abajo que lateralmente.

Se distingue una zona óptica central de unos 4 mm. de diámetro sensiblemente esférica, y una zona periférica ligeramente aplanada.

Vista de frente, tiene la forma de una elipse de unos 12 mm de diámetro en sentido horizontal y de unos 11 mm. en sentido vertical. Frente a esto, por detrás la córnea es casi circular y su diámetro es de unos 12 mm. en todas las direcciones. Así, al estar más aplanada la cara posterior que la anterior, la periferia está tallada en bisel a expensas de la cara anterior (Fig. 2) (1).

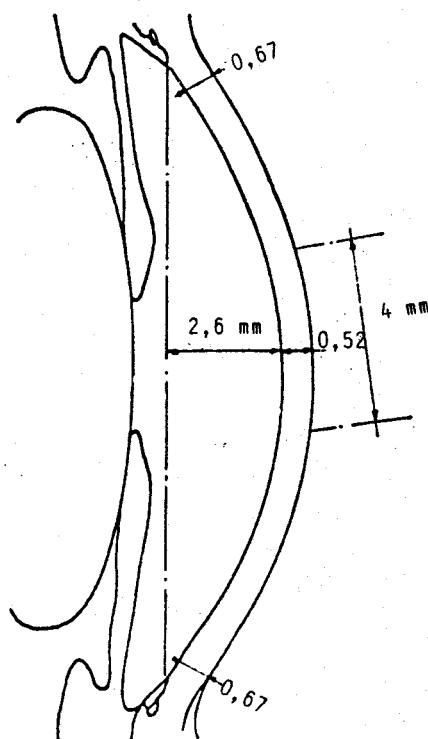
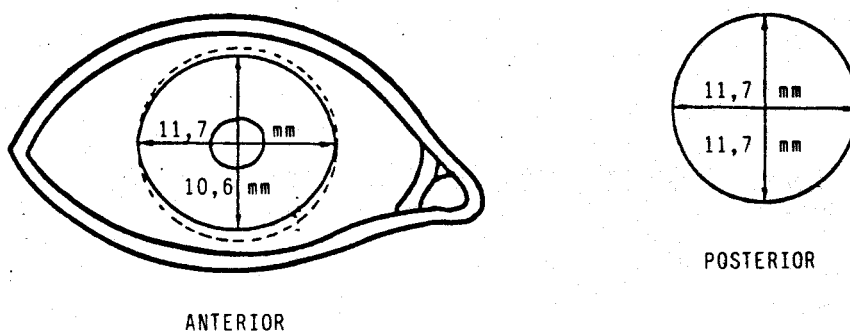


Fig. 2.- Formas y dimensiones de la córnea (Anxenfeld Th) (1).

El radio de curvatura de la caras varía considerablemente. Sus valores oscilan entre unos 7,84 mm. para la cara anterior y unos 7 mm. para la cara posterior (2), (Bloom W, 1973) (6).

Mientras que los diámetros de la córnea son bastantes constantes, de forma que variaciones ligeras ya pueden considerarse como patológicas, el radio de incurvación, y por consiguiente el poder de refracción, oscila considerablemente según los individuos. A causa de las diferencias en el poder de refracción de la córnea, que puede combinarse con diferentes longitudes del eje ocular, se producen las anomalías de refracción, que no tienen obligatoriamente significación patológica.

Los radios de curvatura de la córnea pueden ser diferentes en distintos ejes, de lo que resulta un astigmatismo fisiológico, en el que el radio de incurvación en el meridiano vertical es aproximadamente 1 mm. inferior al del horizontal.

Por otra parte, estas cifras se aplican sólo a un área central de unos 4 mm. de diámetro. Fuera de esta zona, la córnea se aplanamente regularmente hasta llegar al limbo, estableciéndose este aplanamiento marginal de forma relativa y local (6).

El espesor de la córnea también aumenta algo con la edad. El promedio de espesor central de una córnea normal es de 0,56mm. en personas de menos de 25 años de edad; este espesor aumenta lentamente con la edad llegando a medir 0,57 mm. en personas de más de 65 años de edad. La córnea es algo mayor en la periferia (5).

Realizando medidas del espesor corneal mediante el facómetro, en el que se observa el espesor en un biomicroscopio ocular, se ha podido establecer una relación estadísticamente significativa entre el espesor de la córnea, el tiempo transcurrido después de la muerte y el porcentaje de células muertas en el endotelio, según la cual hay un aumento tanto del espesor de la córnea como de las células muertas en el endotelio a medida que pasa el tiempo después de la muerte (Fig. 3) (4).

Mediante modernas técnicas de ultrasonidos, se ha podido medir el espesor de la córnea de conejos en su zona central, paracentral y periférica, mostrando un espesor uniforme, con un promedio de variación del espesor de sólo 7 μ m. El espesor corneal central fue de $407 \pm 20 \mu$ m.

El uniforme espesor de la córnea contrasta con con el de la córnea humana que tiene $520 \mu\text{m}$ de espesor en el centro y alrededor de 630 a $660 \mu\text{m}$ en la zona periférica (Chan T, Payor S y Holden BA; 1983) (7).

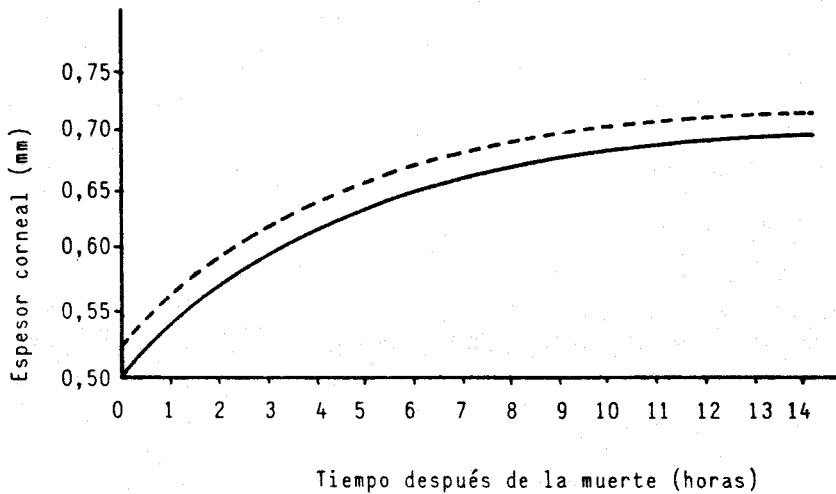


Fig. 3.-Triple correlación entre el espesor corneal, el tiempo transcurrido después de la muerte y el porcentaje de células muertas. (— media aritmética de los espesores; - - - media + error estándar). (Weekers JF) (4).

4.-HISTOLOGIA

La córnea está formada de delante atrás por las siguientes capas (Fig. 4):

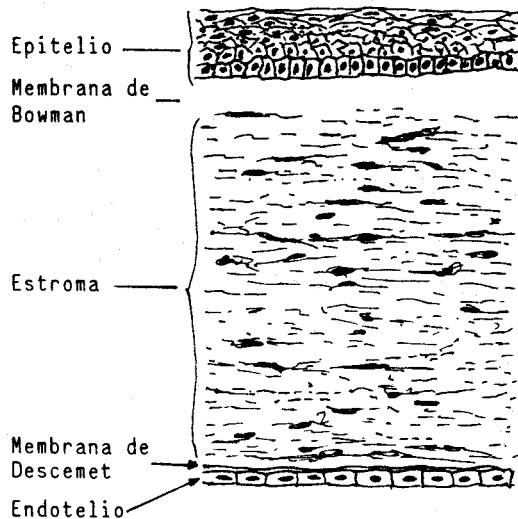


Fig. 4.- Corte transversal de la córnea.

A continuación iremos describiendo cada una de estas capas.

a) Epitelio

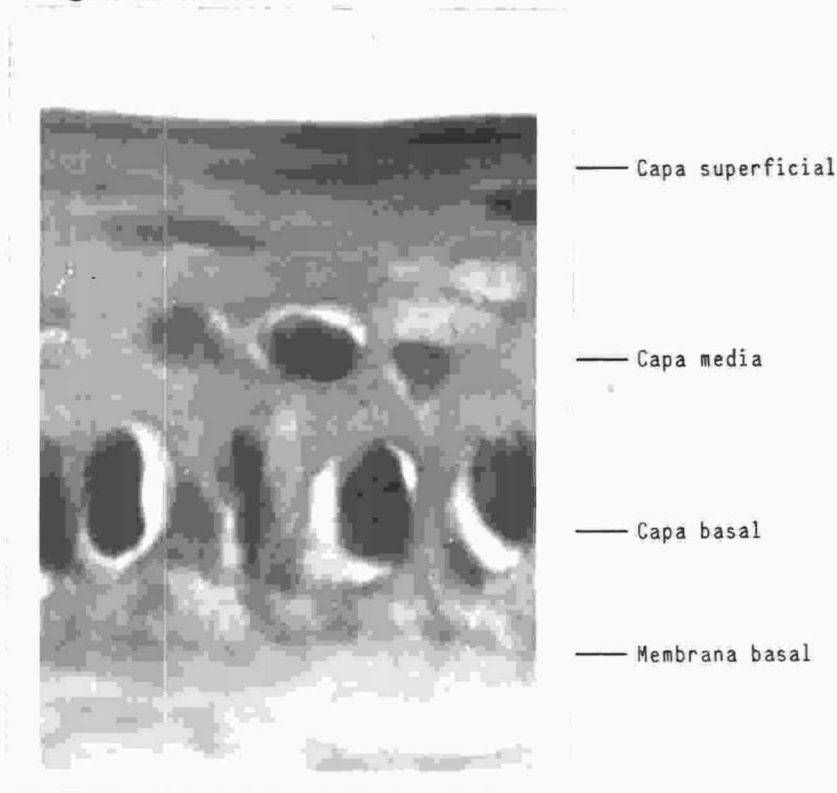
Se trata de un epitelio pavimentoso estratificado, con un espesor de unas 32 μm en el hombre y, por regla general, está compuesto por un total de 5-7 capas celulares. Tanto el espesor como el número de capas no son idénticas en los animales (1), (2), (3), (5).

Las células epiteliales forman una capa de espesor uniforme y gran regularidad (5), estando unidas entre sí por múltiples prolongaciones cortas interdigitadas que se adhieren a los desmosomas. El citoplasma contiene abundantes mitocondrias y retículo endoplásmico granular en una matriz citoplasmática llena de finos filamentos orientados al azar (6).

Este epitelio contiene numerosas terminaciones libres y posee una notable capacidad de regeneración.

Hacia abajo, el epitelio queda delimitado por la membrana basal.

El epitelio se puede dividir en tres capas: basal, intermedia y superficial (Fotografía nº 1).



Fotografía nº 1.- Epitelio de la córnea (Microscopio óptico, x 1000)

- Capa basal.

Es una capa monoestratificada compuesta por células muy altas, con un polo apical globuloso y un citoplasma claro y cromóforo. Ocupan un tercio del espesor epitelial. Los núcleos son pobres en cromatina y muy voluminosos, existiendo numerosas mitosis en las células de esta capa.

Estas células están dispuestas en empalizada y representan la zona de regeneración del epitelio.

Clásicamente se distinguen dos clases de células en esta capa:

- las células claras, deformes con el polo basal aplanado y el núcleo situado en la mitad inferior.
- las células oscuras, alargadas, cuyo polo basal se estira formando un pie.

Ultraestructura

Las células de la capa basal tienen un aspecto hexagonal, siendo más altas que anchas.

El núcleo se sitúa en el apex celular, su cromatina es poco densa y contiene en general un nucleolo. La membrana nuclear suele presentar una doble envoltura.

El citoplasma contiene orgánulos de disposición esencialmente perinuclear, algunas cisternas de retículo endoplásmico granuloso, un aparato de Golgi poco desarrollado, ribosomas libres y algunas mitocondrias. Existen numerosas tonofibrillas paralelas al eje mayor celular.

La membrana citoplasmática es muy sinuosa. Contiene numerosas interdigitaciones y sistemas de unión, asegurando la coherencia de las células basales entre sí, de las células basales y las intermedias y de las células basales y la membrana basal. En el apex celular hay que señalar un gran número de interdigitaciones con las células intermedias y los desmosomas.

En las caras laterales se observan numerosos desmosomas que junto

a las intrincaciones de las membranas celulares aseguran la cohesión entre las células basales. Los espacios intercelulares tienen un tamaño de 200 a 300 Å (2).

En la parte basal de la célula, la membrana celular tiene un espesor de 80 Å. Está separada de la membrana basal del epitelio por un espacio claro de 110 Å. A lo largo de esta membrana basal celular aparecen numerosos hemidesmosomas. A partir de estos hemidesmosomas, numerosas microfibrillas osmófilas atraviesan el espacio entre la membrana celular y la membrana basal para alcanzar esta última e incluso la región más superficial de la membrana de Bowman. Se trata de sólidos sistemas de unión del epitelio corneal (Fotografía nº 2).

Mediante técnicas de incubación de células basales en un medio de cultivo de bajo contenido en calcio, se ha podido determinar que la formación de hemidesmosomas y de desmosomas son procesos dependientes de calcio y que la formación de desmosomas ocurre en 2 horas después de la adición de 1 mM de calcio al medio. En contra a los desmosomas, los hemidesmosomas se mantienen en medios que contiene sólo 10 µM de calcio. Aunque los hemidesmosomas y desmosomas son morfológicamente similares, poseen diferentes requerimientos de Ca^{2+} para mantener su unión (Trinkaus-Randall V y Gipson IK, 1985) (8).

-Capa intermedia.

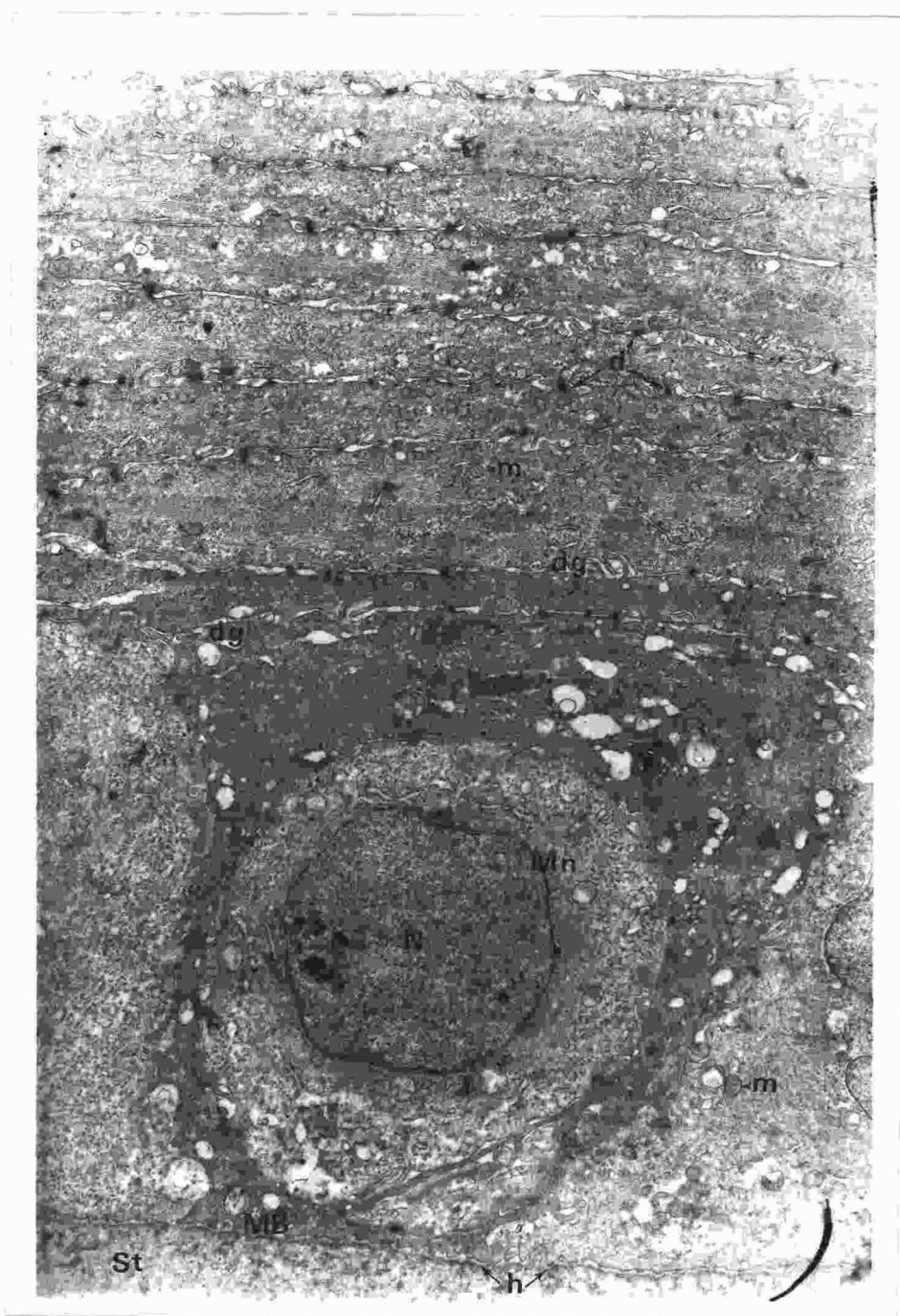
Está compuesta de dos o tres capas de células y su eje mayor es paralelo a la superficie corneal. Estas células se hacen más columnares a medida que se aproximan a las capas profundas (5).

Las células tienen una cara basal cóncava y su citoplasma granuloso más oscuro que el de las células basales, es también más cromatófilo. Los núcleos presentan las mismas características que los de la capa basal.

Ultraestructura

Las células intermedias se disponen horizontalmente en el epitelio corneal y presentan:

- una cara anterior convexa



Fotografía nº 2.-Epitelio de la córnea de conejo. MB: membrana basal, St: estroma; N: núcleo; Mn: membrana nuclear; h: hemidesmosoma; dg: interdigitaciones; d: desmosoma; m: microvellosidades (M.E.T., x 10000).



- unas expansiones laterales y posteriores que aseguran la interconexión con las otras células intermedias y con las otras células basales.

El núcleo tiene un eje mayor orientado paralelamente al del epitelio. El citoplasma es pobre en orgánulos con presencia de tonofibrillas.

La coherencia celular se asegura mediante las digitaciones de la membrana citoplasmática, numerosos desmosomas y maculae ocludentes. (Fotografía nº 3).

- Capa superficial.

Comprende dos o tres capas de células (más delgadas cuanto más anteriores). Las células más superficiales son planas y están cubiertas de células escamosas, similares a la mayoría de las células del epitelio superficial de la piel, aunque al contrario que estas células, el epitelio corneal normal no es queratinizado (5).

Las células de la superficie de la córnea son poligonales, frecuentemente hexagonales con un pleimorfismo importante, siendo la longitud media de las células inferior a 30 μm , aunque a veces alcanza las 50 μm . (Marechal y cols., 1983) (9), (Loman LE y cols., 1982) (10).

En la primera capa anterior, las células son aplanadas, y su superficie no excede a las 2 μm . El citoplasma es acidófilo muy homogéneo y denso y los núcleos aplanados y densos. Se ha podido individualizar en la parte externa del epitelio una capa glucolipídica que responde a una transformación bioquímica citoplasmática (2).

Ultraestructura

Las capas celulares superficiales son horizontales, con un núcleo achatado que presenta una cromatina mucho más densa que las otras células.

El citoplasma contiene abundantes tonofibrillas de disposición horizontal, agregados de glicógeno y vesículas.

Los orgánulos citoplasmáticos son raros.



Fotografía nº 3.-Córnea de conejo. CM: capa media; CS: capas superficiales; N: núcleo; d: desmosoma; mv: microvellosidades (Microscopio Electrónico de Transmisión, x 14.000).

Los desmosomas y las maculae ocludentes abundan entre las células (Fotografía nº 3).

La superficie celular contiene numerosas microvellosidades, cuya altura varía de 0,5 a 3 μm , y su espesor es de unas 0,5 μm . Estas microvellosidades se proyectan dentro del film lagrimal y pueden atrapar el fluido lagrimal y prevenir así la desecación de las células epiteliales (5). Se pueden encontrar depósitos de material filamentosos en contacto con las microvellosidades, que se interpretan como remanentes de la película lagrimal (2).

Observando la superficie del epitelio corneal en el microscopio electrónico de barrido (MEB), se ha podido comprobar la presencia de una doble población celular, unas células de aspecto claro y otras células oscuras. La presencia de esta doble población celular (células claras y oscuras), en la superficie del epitelio corneal no parece deberse a un artefacto de preparación ni de observación (demostrado por el hecho de que al variar el ángulo de incidencia no varía el aspecto de la célula).

Esta distinción bajo el MEB de diferentes tipos de células en la superficie del epitelio corneal, está basada en el número de vellosidades de la superficie celular; así se observan células claras cubiertas de microvellosidades y micropilis, y células oscuras de superficie lisa. Pero parece ser que esta diferencia se debe a un error de interpretación, ya que la presencia de mucosustancias enmascaran más o menos las vellosidades explicando así los aspectos observados (Renard G y cols., 1983) (11).

En efecto, en estudios con microscopio electrónico de transmisión (MET), se ha podido demostrar que las células de la superficie del epitelio corneal están recubiertas de tres capas de mucosustancias:

- la más superficial se lava por la acetilcisteína y proviene del film lagrimal.
- la 2ª no se lava por la acetilcisteína, es heterogénea y capaz de enmascarar las microvellosidades. Está presente desde que la superficie celular se individualiza y parece aumentar con el envejecimiento de la célula.
- la 3ª es muy fina, recubre la totalidad de la superficie celular y sigue el relieve de las microvellosidades; se

trata del glicocalix.

En estudios morfométricos realizados mediante la cuenta de microvellosidades y la medida de la longitud de la superficie celular, cualquiera que sea el método utilizado, los resultados del análisis cuantimétrico de las vellosidades de la superficie del epitelio corneal son coconcordantes y no se puede poner en evidencia nada más que un sólo tipo celular con variaciones en el número de las microvellosidades bastante limitadas.

No hay pues, en MET, diferencias entre las células y la clasificación entre células claras y oscuras adoptadas en MEB y tampoco depende del número ni de la altura de las microvellosidades.

Igualmente, las mucosustancias depositadas en la superficie de las células aparecen desde el inicio de la descamación de las células subyacentes. Esto explica que el estudio en MEB de las células en curso de descamación no haya podido aportar la prueba de una evolución del tipo celular en el curso de envejecimiento.

El depósito o la absorción de la mucina en la superficie del epitelio corneal es una propiedad de estas células, invariable en el tiempo hasta su descamación. Esta capa de mucina es capaz de enmascarar las microvellosidades y se pueden explicar así los aspectos observados en MEB (11), (Renard G y cols., 1983) (12).

La diferencia más acusada entre la superficie corneal humana y la del conejo es la ausencia en humanos de numerosos agujeros epiteliales previamente asociado con el modelo normal de exfoliación u otros procesos metabólicos en conejos (Pfister RR y Burstein NL, 1977) (13).

MEMBRANA BASAL

Entre las células del estrato basal del epitelio corneal y la membrana de Bowman, hay una membrana basal de unos 60 a 65 μm de espesor. (Fotografía nº 2).

Esta membrana basal ha sido examinada histológicamente y se ha observado que es similar a las otras membranas basales de los diversos tejidos, siendo PAS positiva y con una textura fibrogranular en el seno

de una matriz mucoprotéica (5), (2).

Las membranas basales son de interés corriente en biología a causa de su amplia distribución en la naturaleza, su importante función fisiológica de filtración y soporte y su aparente papel en el desarrollo de ciertos estados patológicos.

La membrana basal filtra la sangre en el glomérulo, forma la cápsula del cristalino y forra el alveolo pulmonar. Estas membranas basales son sintetizadas por el epitelio glandular, gastrointestinal y corneal y por el endotelio capilar.

En la piel, la membrana basal cutánea separa la epidermis avascular del rico plexo capilar de la papila dérmica, con un espesor aproximado de 500 a 800 Å.

Todas las membranas basales parecen ser casi amorfas, de una estructura finamente fibrilar electrónicamente densa. Su conformación es determinada por la geometría del epitelio o endotelio responsable de su síntesis (Heaphy MR y Winkelmann RK, 1977) (14).

El epitelio corneal está finamente anclado a la membrana de Bowman y al estroma subyacente por compuestos de unión especializados compuestos de hemidesmosomas de la membrana celular de la célula basal y su estrecha asociación con la membrana basal mediante las múltiples fibrillas de anclaje (Kenyon KR, Fogle JA, Stone DL y Stark WJ; 1977) (15).

Las distrofias o anomalías traumáticas de estos complejos de unión pueden producir en la clínica importantes problemas de persistentes erosiones corneales y defectos epiteliales, ya que la membrana basal se usa para el restablecimiento de esta estrecha adhesión entre el nuevo epitelio y el tejido subyacente, porque si queda intacta es reutilizada por el nuevo epitelio en formación y así, al no tener que ser sintetizada de nuevo, las erosiones corneales y defectos epiteliales tardan mucho menos tiempo en curar.

Mediante estudios con MET, se ha podido observar que en una membrana basal típica hay una capa electrónica lúcida (la lámina lúcida), adyacente a la superficie basal epitelial, y una capa electrónicamente densa (la lámina densa), adyacente al tejido conectivo subyacente.

A causa de que sólo la lámina densa es bien visualizada por el microscopio electrónico de rutina, estas membranas típicas son llamadas "unilaminares", para distinguirlas así de las membranas reduplicadas o multilaminares que han sido descritas en los ancianos. También se ha observado la presencia de una membrana de tipo mixto, compuesta de segmentos continuos de membrana uni y multilaminar.

La membrana basal fetal tiene una apariencia enrarecida y con una densidad electrónica heterogénea es similar a la sintetizada en adultos durante la curación de heridas.

Los hemidesmosomas y los filamentos de anclaje están parcialmente desarrollados en el período fetal. La membrana basal tiene un contenido en hemidesmosomas significativamente menor (14%), que en el período postnatal (22%).

Después del nacimiento y hasta las dos primeras décadas de la vida, la membrana basal del epitelio corneal mantiene una apariencia unilaminar, existiendo un incremento del espesor en función de la edad, que es independiente de la reduplicación de la membrana.

A partir de la 2ª década de la vida es patente la reduplicación de la membrana basal con formación de una membrana multilaminar, de estructura estratificada.

La densidad de los hemidesmosomas en las regiones de tipo unilaminar, es significativamente mayor (33,9%), que en las regiones adyacentes de tipo multilaminar (17,4%).

La membrana de tipo mixto parece representar una fase transicional que es intermedia entre las fases unilaminar y multilaminar.

Hay una clara y estadísticamente significativa relación positiva ($p < 0,0001$) entre la edad y el espesor de la membrana basal.

La deposición de la membrana basal parece ser el único proceso implicado en el espesamiento de la membrana en el período prenatal y postnatal precoz. Este proceso produce un incremento anual en el espesor de la membrana de 3,04 nm. (Alvarado J y cols., 1983) (16).

En vida, el proceso de reduplicación de la membrana juega un papel más acentuado en el espesamiento que por simple deposición de la membrana.

La alta incidencia de membrana reduplicada de tipo multilaminar, sugiere que este cambio en la estructura de la membrana basal ocurre en las córneas como parte de un proceso normal.

La injuria y la muerte celular están asociadas con la reduplicación de la membrana en algunos casos. Cuando la córnea está expuesta a la abrasión traumática repetida, ulceración, inflamación crónica o edema, la reduplicación de la membrana se observa en individuos de menos de 20 años de edad.

Otro factor que puede ser importante en la reduplicación de la membrana es un deterioro primario de la membrana basal, sus fibras de anclaje y los hemidesmosomas (3).

b) Membrana de Bowman

La membrana de Bowman se encuentra principalmente en el hombre y en los primates, y aparece como una banda hialina acelular y homogénea de 8-14 μm . de espesor. Su cara anterior está perfectamente limitada, mientras que su cara posterior, irregular, no se puede separar del estroma subyacente.

La tinción con el PAS ha permitido separar la membrana de Bowman PAS negativa, de la membrana basal del epitelio PAS positiva.

Es la más superficial de las capas condensadas del estroma. Está constituida por numerosas fibrillas de colágeno entrecruzadas y orientadas en todos los sentidos.

Esta membrana no existe en todos los mamíferos; en el conejo, el epitelio corneal descansa sobre una simple lámina basal (6).

En la parte posterior, las fibras de colágeno de la membrana de Bowman se confunden con los haces de fibrillas colágenas del estroma, sin un límite preciso.

En la parte anterior, la membrana de Bowman está separada de la membrana basal por un espacio claro de un espesor variable de 10 a 100 Å.

En esta membrana no se aprecia ningún elemento celular ni vascular; sólo la pueden atravesar algunas células schwanianas (2).

La membrana de Bowman es mucho más resistente que el epitelio a los traumatismos, aunque al contrario de lo que ocurre con éste, no tiene capacidad de regeneración (1).

c) Estroma

Esta capa constituye aproximadamente el 90% de la córnea, con un espesor aproximado de 500 µm. (5), (1). Está compuesta de haces o láminas conjuntivas, de una sustancia fundamental que representa un 15% de peso seco y un 5% de células: los fibroblastos.

Ultraestructuralmente, los haces conjuntivos o laminillas están apilados unos sobre otros y situados paralelamente entre sí y a la superficie corneal.

Los fascículos conjuntivos permanecen independientes y su dirección variable permite que se entrecrucen formando como un enrejado, y así se describen:

- una zona central superficial, con una anárquica intrincación de los fascículos.
- una zona central media y profunda con fascículos bien separados entre sí.
- una zona periférica, con fascículos irregulares y en algún caso circulares (2).

Este anclaje de las fibras de colágeno proporciona a la córnea seiscientas veces más resistencia de la que es necesaria para mantener la presión intraocular, y proporciona además una forma de cúpula a la córnea (3).

* La fibrilla de colágeno es el elemento unitario de base del estroma corneal. Su diámetro tiene un valor medio de 225 ± 15 Å, aumentando

el diámetro mayor aproximadamente 30 Å de la membrana de Bowman a la membrana de Descemet, y sin variaciones de diámetro entre el centro de la córnea y la periferia.

La periodicidad transversal es de 460 Å, o sea, típicamente la del colágeno, y el diámetro interfibrilar de unos 487 Å (2).

Las fibrillas de colágeno parecen que pierden progresivamente su periodicidad en los planos anteriores y se continúan con las fibras de colágeno de la membrana de Bowman.

Las fibrillas de colágeno están bañadas en una matriz mucoproteica. Por detrás, el estroma corneal se continúa con la membrana de Descemet.

* La sustancia fundamental se describe como un material granuloso rodeado de fibrocitos y compuesta por numerosas macromoléculas: colágeno, proteoglicano y glucoproteínas de estructura.

* Las células, "fibrocitos" o "queratocitos", son fibroblastos modificados y están situados entre los fascículos de colágeno; son células aplanadas y delgadas, con un núcleo aplanado y alargado que ocupa la mayor parte del citoplasma. El citoplasma es pobre en orgánulos, emitiendo expansiones citoplasmáticas.

El estroma contiene bastantes células migratorias, de tipo linfoide procedentes de los vasos sanguíneos del limbo corneal, observándose muchos polinucleares neutrófilos y linfocitos entre las laminillas cuando sobreviene una infección (6).

El estroma primario es sintetizado por el epitelio corneal antes de la invasión mesenquimatosa de la córnea.

El estroma corneal del conejo se desarrolla después de que sea detectada la vesícula del cristalino, en el 13º día de gestación. Incrementa continuamente desde el día 14 de gestación hasta el 21º después del nacimiento. Este crecimiento es debido a la combinación de componentes celulares y extracelulares. La cantidad de células y de matrix extracelular, primitivamente colágeno, son proporcionales a la cantidad de ADN y de hidroxiprolina.

En el normal desarrollo de la córnea, la región interna es altamente poblada con una deposición activa de fibroblastos desde la matrix extracelular. Esta región profunda es asociada inicialmente con una extensa red de capilares a lo largo de su superficie que, probablemente, facilita el intercambio gaseoso y nutriente con el estroma en desarrollo. En la córnea adulta, el oxígeno entra al epitelio primariamente desde la superficie externa.

Los estados iniciales del desarrollo del estroma del conejo, muestran un rápido incremento en el número de células y un depósito de colágeno relativamente menor. El depósito de matriz extracelular incrementa en una proporción mayor que la del crecimiento de la población celular. Después del nacimiento se evidencian cambios mínimos en la proporción células/colágeno, a pesar del rápido crecimiento del epitelio.

La organización de las fibras de colágeno durante la curación puede depender de la síntesis de fibroblastos. Aunque la mayoría de estos fibroblastos están eventualmente orientados de forma paralela a la superficie, un número cuantioso se sitúan inicialmente al azar mientras se acumula la matriz de colágeno. En contra, en el estroma fetal las células están altamente organizadas en láminas aplanadas paralelas a la superficie corneal antes de que el colágeno se deposite. Esto sugiere que la estructure anormal corneal ulcerada es el resultado de la deposición de la matriz extracelular, mientras las células están todavía desorganizadas (Cintron C, Covington H y Kuplin CL; 1983) (17).

d) Membrana de Descemet

Es una membrana de aspecto homogéneo que separa el estroma profundo del endotelio, y es considerada como el producto de secreción de las células del endotelio (5).

Tiene un espesor de 5 a 10 μm ., posee gran resistencia y tiene las propiedades físicas de tipo elástica:

- tras sección, sus extremidades se curvan de delante atrás.
- es poco extensible.
- se colorea con los colorantes del colágeno.

- no capta los colorantes del tejido elástico.
- en contraposición, es fuertemente PAS positiva.

Está claramente separada del estroma corneal, y es más gruesa en la periferia que en el centro.

Al microscopio electrónico (Fotografía nº 4), la membrana de Descemet en las personas de edad avanzada, suele presentar una estriación entrecruzada, con unas estriás separadas por espacios de unos 1070 Å, unidas por filamentos de menos de 100 Å de anchura y con una separación entre sí de unos 270 Å. Los cortes tangenciales de estas córneas revelan una disposición bidimensional de nódulos, separados entre sí unos 1070 Å y unidos por filamentos de colágeno atípico, formando figuras hexagonales (6).

En las personas jóvenes, la membrana de Descemet es de aspecto más homogéneo.

En la periferia de la membrana de Descemet podemos encontrar los corpúsculos de Hassal-Henlé, que son unas prominencias cupuliformes y verrucosas. Estas verrucosidades hialinas son consideradas como un signo de envejecimiento de la membrana de Descemet, ya que son fácilmente reconocibles en individuos de más de 20 años de edad y su número aumenta regularmente con la edad; sobresalen en la cámara anterior y están recubiertas a este nivel por una fina capa de citoplasma endotelial (2).

e) Endotelio

El endotelio corneal está constituido por una sólo capa de células de 5 µm. de espesor y de 18 a 20 µm. de largo. El núcleo es oval y está situado en el centro de la célula.

Al microscopio electrónico, el núcleo no tiene unas características especiales, aparte de la presencia de numerosos poros en la membrana nuclear (Fotografía nº 4).

El citoplasma contiene numerosos orgánulos, consiguiendo así una gran actividad metabólica:

- las mitocondrias son numerosas.
- el aparato de Golgi es perinuclear.
- el retículo endoplásmico granuloso está presente.
- numerosos ribosomas libres están diseminados por el citoplasma.
- se aprecian centriolos, lisosomas y cuerpos multi-vesiculares.

Membranas de las células endoteliales.

a) La cara apical o posterior de aspecto hexagonal, presenta:

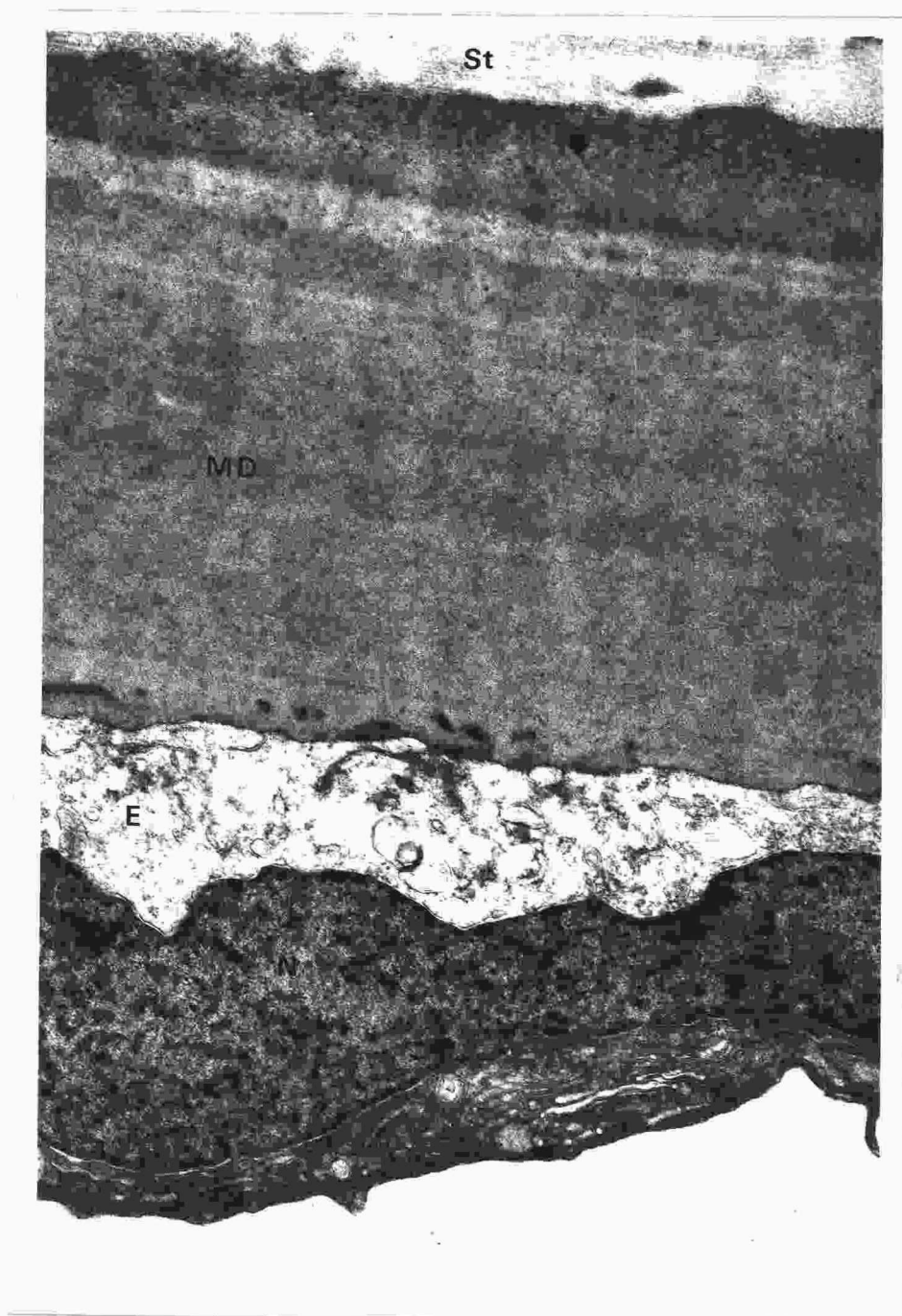
- de 20 a 30 microvellosidades de 0,5 a 0,6 μm . de alto en contacto con el humor acuoso.
- estructuras ciliares poco numerosas.
- intrincaciones marginoapicales "en dedo de guante" entre dos células endoteliales vecinas.

b) La cara basal o anterior está en contacto con la membrana de Descemet y su contorno celular es muy sinuoso. A este nivel se aprecia la presencia de numerosas vesículas de pinocitosis.

c) Las caras laterales aseguran la unión intercelular por distintos tipos de enlace:

- las uniones de tipo mácula adherens o "desmosomas", en los dos tercios anteriores de las membranas intercelulares.
- las uniones de tipo zónula occludens, son estructuras pentalaminares de dos tipos:
 - * zónula occudentes, en el tercio posterior de las células endoteliales.
 - *máculae occludentes, en los dos tercios anteriores de los espacios intercelulares.
- las "gap junctions" o uniones de siete laminillas o heptalaminares.

Por último, hay que insistir en la importancia de las interdigitaciones celulares.



Fotografía nº 4.-Córnea de conejo. St: estroma; MD: membrana de Desce-
met; E: endotelio; N: núcleo de la célula endotelial (Microscopio
Electrónico de Transmisión, x 17.000).

En las células endoteliales jóvenes se aprecian algunas mitosis, pero en las células adultas, la reparación de las lesiones endoteliales tiene lugar por contigüidad y por amitosis(2).

Los estudios con MEB contribuyen a precisar el estado de la superficie del endotelio corneal, evidenciando la gran regularidad de sus núcleos en posición central y prominentes en la cámara anterior, así como los límites celulares hexagonales irregulares y ondulados.

Ocurren muchas alteraciones en el endotelio corneal con la edad. Así, la densidad endotelial celular, expresada como el número de células por unidad de área, decrece con la edad (5).

La primera etapa en que aparece un efectivo decrecimiento en la celularidad endotelial es en el período prenatal, cuando la córnea está en la fase de crecimiento más rápido, y durante los primeros años de la vida.

El inicial decrecimiento en la celularidad, rápido y no lineal, en el período postnatal, coincide con un período de rápido crecimiento corneal.

Después de los primeros años de vida, el decrecimiento en la celularidad es gradualmente lento, continuo y de manera lineal. Este último decrecimiento en la celularidad endotelial probablemente refleja un período de efectiva pérdida celular endotelial en el tiempo, ya que no hay cambios significantes en el tamaño corneal después de los dos años de edad.

Igualmente, hay un decrecimiento lineal altamente significativo ($p < 0,002$) en la densidad celular endotelial de 0,56% células/año, en sujetos de 2 a 98 años (Murphy C y cols., 1984) (18); (Figs. 5 y 6).

Del mismo modo, con la edad también se observan cambios morfológicos en las células del endotelio corneal.

Desde el nacimiento hasta los 2 años de edad, el citoplasma de las células es bastante pequeño y las células aparecen fuertemente unidas unas a otras. Los núcleos ocupan la mayor parte de las células y no son esféricos.

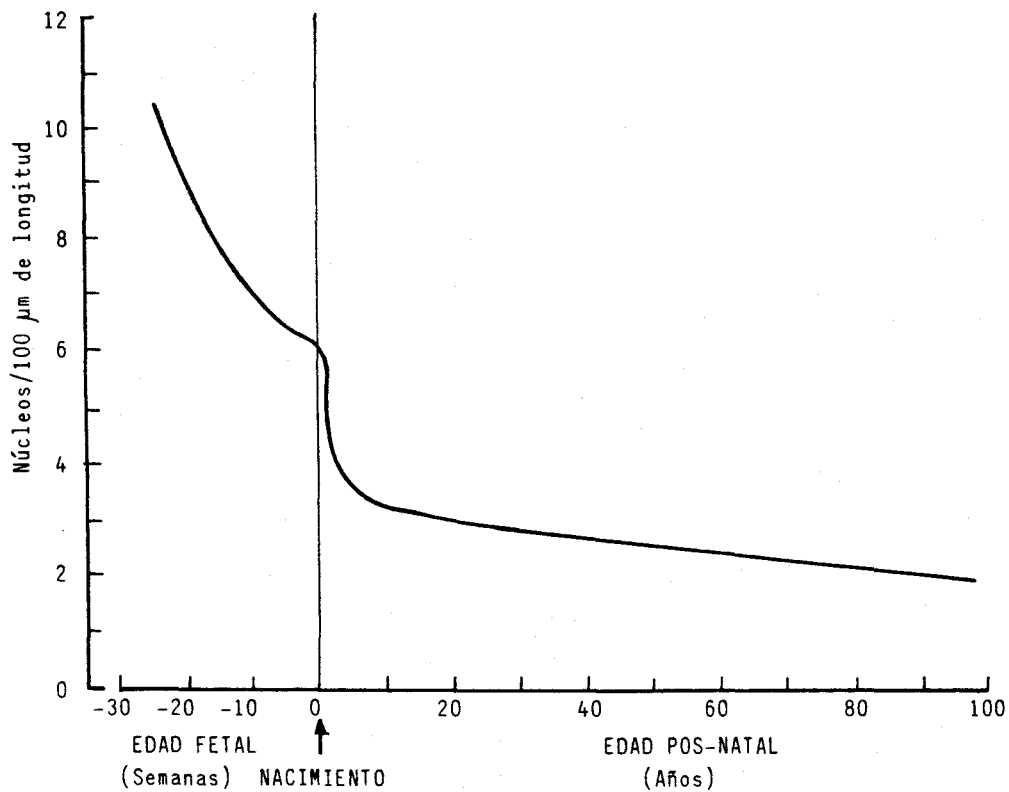


Fig. 5.- Efecto de la edad en la celularidad corneal endotelial (Murphy C y cols.) (18).

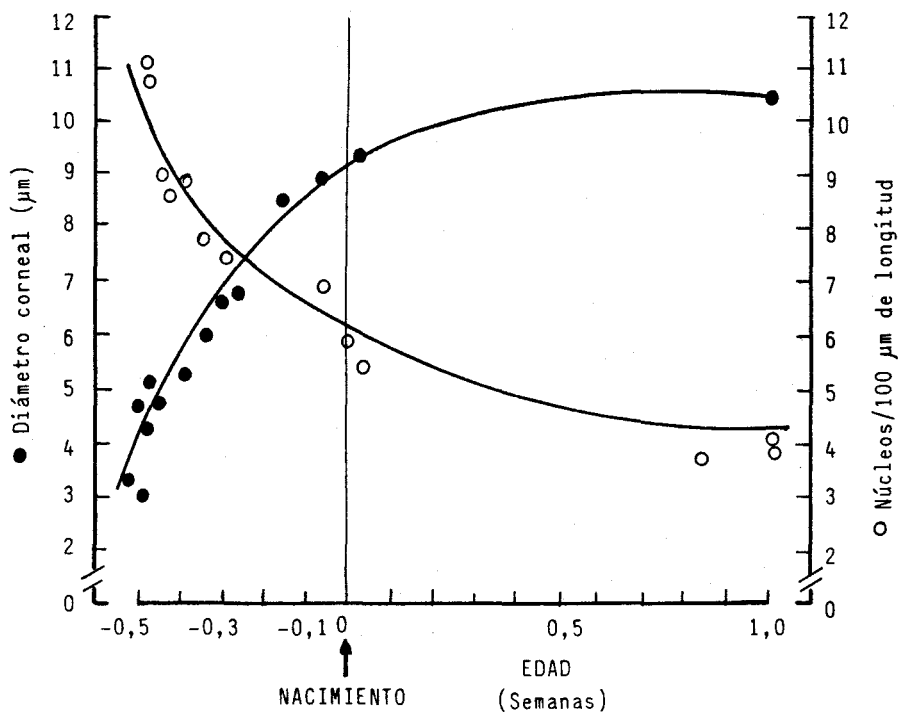


Fig. 6.- Densidad endotelial y diámetro corneal como funciones de la edad. (Murphy C y cols.) (18).

A medida que las córneas van madurando, los núcleos son más esféricos en apariencia y el citoplasma aumenta. La ordenación no es tan compacta y las células parecen extenderse: las células toman su normal aspecto hexagonal. Este modelo es típico desde los 6 años hasta los 40 ó 50 años de edad, aunque con la edad, las células parecen extenderse a distancia y el citoplasma ocupa un área más prominente.

Después de los 40-50 años, la regularidad del modelo endotelial va a desaparecer. El modelo hexagonal tan característico de la célula endotelial es distinto en todas las células. Algunas células aparecen muy compactas, estrechamente comprimidas, con un citoplasma muy escaso; otras células son más grandes de lo normal. La apariencia sugiere un tipo de metaplasia asociado con las células en división y un intento de curación, ambos por división celular y por alargamiento de las células remanentes. Es como si la muerte celular fuera tan rápida que no pueda ser compensada por la ordenada división celular en este tejido altamente especializado (Kaufman MD, Capella JA y Robbins JE; 1966) (19).

LIMBO CORNEAL

El limbo, o unión esclerocorneal, tiene una anchura de 1,5 a 2 mm. y en su cara externa hay una somera depresión denominada surco externo de la esclerótica, donde la suave curva de la esclerótica se continúa con la más cerrada y convexa de la córnea.

En su cara interna, el estroma esclerocorneal está marcado por una depresión circular, el surco interno de la esclerótica, ocupado por una red trabecular y el conducto de Schlemm.

En el reborde posterior del surco interno de la esclerótica, el estroma se proyecta hacia el interior del ojo, formando un pequeño reborde circular llamado rodete de la esclerótica, que por la parte anterior se adhiere a la red trabecular y por la posterior al músculo ciliar.

En el limbo corneal se observa una gradual transición del epitelio de la córnea al de la conjuntiva del bulbo ocular, terminando la membrana de Bowman y siendo sustituida por el estroma conjuntival y el borde anterior de la cápsula de Tenon.

En el limbo, la esclerótica colágena se continúa gradualmente con el estroma corneal y sus haces colágenos van adquiriendo progresivamente el pequeño diámetro uniforme y disposición ordenada, típicos de la córnea.

En la parte profunda del estroma del limbo, la membrana de Descemet termina como tal y da lugar a la aparición del tejido esponjoso de la red trabecular, situado entre la cámara anterior, la raíz del iris, el estroma límbico y el rodete de la esclerótica.

Entre la red trabecular y el estroma límbico se interpone el conducto de Schlemm, vaso aplanado que se extiende alrededor de toda la circunferencia del limbo.

De la pared externa del conducto de Schlemm, se originan de 25 a 35 conductillos secundarios que desembocan en las venas profundas del limbo o, en forma de venas acuosas, pasan a la superficie del estroma límbico donde se vacían en las venas episclerales.

La obstrucción de la filtración del humor acuoso por los espacios intertrabeculares o de su drenaje por el conducto de Schlemm, provoca un aumento de la presión intraocular que es característico de la grave enfermedad ocular denominada glaucoma (6).

5.-CELULAS INMUNITARIAS DE LA CORNEA

Ocasionalmente se observan linfocitos en el tejido conectivo del estroma. El área límbica vascularizada contiene más linfocitos, principalmente localizados alrededor de los pequeños vasos.

La eficacia de los anticuerpos monoclonales permite un estudio más preciso y elaborado de los linfocitos, monocitos y antígenos de histocompatibilidad.

Es generalmente aceptado que estos compuestos tienen un importante papel en diversas reacciones inmunológicas e inflamatorias de origen conocido y desconocido que ocurren en los diversos tejidos. Así, las enfermedades también pueden presentarse en el ojo (Vantrappen L y cols., 1985) (20).

Las células del epitelio corneal poseen sólo un pequeño potencial fagocítico, mientras que los queratinocitos efectúan la fagocitosis y pinocitosis.

Las células de superficie del epitelio corneal pueden interactuar con el sistema inmune, comportándose como macrófagos, y con los queratinocitos, produciendo factores no específicos que aumentan la actividad linfocítica (Grabner G y cols., 1982) (21).

Los linfocitos T y B están presentes en la muy vascularizada región límbica, pero también pueden ser observados en el centro de la córnea.

El pequeño número de linfocitos en la parte central de la córnea se correlaciona con el pequeño número de células Ia-like positivas en estas áreas. La baja concentración de estos elementos en la córnea puede ser responsable de la baja incidencia de reacciones inmunológicas en la córnea en la patología de transplantes y en otras enfermedades.

Usando anticuerpos monoclonales, los linfocitos T se dividen generalmente en células OKT₄ positivas helper/inductoras, y en células OKT₈ positivas citotóxicas/supresoras. La córnea contiene ambos linfocitos interepiteliales OKT₄ positivo y OKT₈ positivo, y estas células están concentradas densamente en el limbo y escasamente en el centro de la córnea (20).

La córnea contiene antígenos HLA-A y B. Sin embargo, los antígenos HLA-DR todavía no se han descrito en las células epiteliales de la córnea, estos se presentan en la conjuntiva normal y, ocasionalmente, en la córnea periférica y central.

Las células de Langerhans son células dentríticas irregulares que han sido descritas en la epidermis, la mucosa bucal y, en general, en la mayoría de los epitelios escamosos. Ellas expresan los antígenos Ia-like o HLA-DR (derivados del antígeno mayor de histocompatibilidad) (20).

Los antígenos Ia son glicoproteínas de la membrana celular primariamente expresadas en las células del sistema inmune (Klaresogh L, Försüm U, Malrnäs U y cols.; 1979) (22).

Aunque la función de los antígenos Ia está lejos de conocerse,

distintas líneas de evidencia sugieren que están implicados en la cooperación celular entre linfocitos T y los antígenos, actuando como antígenos, presentando y estimulando células a los linfocitos alogénicos. Su actividad fagocítica es mucho menos pronunciada que la de los macrófagos ordinarios (20), (22).

El epitelio corneal y conjuntival de muchas especies contienen células de Langerhans dentríticas con receptores para la ATPasa y anticuerpos contra los antígenos de histocompatibilidad clase II (Ia-like o DR). Estas células de Langerhans parecen análogas a la de la piel.

El epitelio corneal adulto normal contiene pocas células de Langerhans en la región de la conjuntiva, y la porción central está normalmente vacía de células de Langerhans.

La inflamación de la córnea está asociada con un incremento de densidad de células de Langerhans.

Asimismo, la reepitelización de la córnea tras una abrasión, se asocia con un incremento de densidad de células de Langerhans, que presumiblemente han emigrado pasivamente desde la unión del epitelio conjuntival y corneal.

Hay noticias contradictorias acerca de la presencia o ausencia de células dentríticas ATPasa positivas de antígenos de histocompatibilidad de la clase II (Ia-like o DR), en la córnea. Algunas de estas diferencias pueden ser asociadas con especies diferentes, variaciones genéticas en una misma especie, posible coexistencia de inflamaciones o infecciones o, quizás, técnicas experimentales.

Las células dentríticas ATPasa positivas están presentes en todas las regiones de la córnea y conjuntiva de recién nacidos. Estas células dentríticas también expresan los antígenos de histocompatibilidad, como se evidencia por estudios de inmunofluorescencia de anticuerpos monoclonales.

La Tabla 1 muestra la densidad de células ATPasa positivas en varias regiones de la córnea adulta normal (Chandler JW, Cummings M y Gillette TE; 1985) (23).



Lugar de recuento	Densidades (células/mm ²)		Valor de P
	Adultos	Niños	
Limbo	269,7 ± 24,6	300,0 ± 139,9	0,4
Córnea			
periférica	142,2 ± 25,8	165,0 ± 60,3	0,4
pericéntrica	57,2 ± 28,7	70,7 ± 22,1	0,3
central	7,7 ± 6,2	39,9 ± 13,0	0,001

Tabla 1. Densidades de células dentríticas ATPasa positivas en la superficie ocular de adultos y niños (Chandler JW, y cols., 1985) (23).

Los recién nacidos tienen densidades de células dentríticas ATPasa que son comparables a la de los adultos en las regiones límbica, periférica y pericéntrica (Tabla 1).

En contra, las densidades de las células dentríticas ATPasa positivas fueron significativamente mayor en la región central de las córneas de los recién nacidos y ésta mayor diferencia permanece durante varias semanas de vida en ausencia de cualquier infección prenatal o postnatal.

Los niños tienen significativamente mayor densidad de células de Langerhans en su córnea central cuando se compara con córneas adultas. El descenso de la densidad de células de Langerhans desde el limbo a la córnea central podría ser porque estas células emigran pasivamente hacia la córnea central con el movimiento central de las células epiteliales (23).

La presencia de antígenos HLA-ABC, de células Ia-like positivas y de linfocitos T y B en la córnea normal, sugiere que la córnea contiene un apropiado sistema inmunológico. La distribución de este sistema, sin

embargo, es heterogénea, con una gran concentración de elementos en la periferia y una pequeña concentración en el centro de la córnea (45).

6.-VASCULARIZACION E INERVACION DE LA CORNEA

A) VASCULARIZACION

Normalmente, la córnea no posee vasos sanguíneos, por lo que toda vascularización es patológica.

En condiciones normales los capilares penetran en la córnea hasta 1 ó 2 mm. más allá del limbo; ciertas enfermedades producen una precoz e intensa vascularización, la situación y el carácter de los vasos sanguíneos recién formados son a veces guía para el diagnóstico.

En la proliferación vascular, los vasos penetran desde el limbo hacia la córnea, precisamente a la altura del proceso patológico. Se distingue una vascularización superficial y otra profunda.

Los vasos superficiales pueden seguirse desde la conjuntiva sobre tejido corneal; están situados por dentro del epitelio, por debajo de él, entre la membrana basal y la de Bowman y, en parte, en las laminillas más superficiales del estroma.

La vascularización profunda tiene su origen en las arterias ciliares anteriores, y estos vasos sólo son visibles por dentro del borde corneal, con un trayecto rectilíneo y poco ramificado. Penetran a la altura del proceso patológico y a causa de la estructura laminar de la córnea.

La vascularización es también un proceso que parece necesario para la curación, sobretodo de enfermedades infiltrativas graves de la córnea. Después de la curación, las cicatrices formadas, a veces muy densas, obstaculizan la capacidad visual. La vascularización, con cicatrización, puede tener como resultado una pérdida de agudeza visual (1).

Igualmente, la vascularización predispone a la córnea al rechazo de injertos, facilitando la detección de antígenos extraños en el material donante (Berman M, Winthrop S, Ausprunk D, Rose J, Ranger R y Gage G;1982) (24).

A pesar de estos aspectos negativos, la vascularización también previene la ulceración después de la herida, posiblemente por la introducción de antiproteasas y metabolitos para la curación de la herida.

Diversos mediadores han sido implicados en este proceso: prostaglandinas, aminas vasoactivas, factores angiogénicos epiteliales y componentes de leucocitos, atribuyendo a este último el desarrollo de nuevos vasos, debido a la baja tensión de oxígeno en el medio.

El factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento fibroblástico, estimulan el crecimiento de vasos dentro de la córnea. La reciente observación de que la córnea normal del conejo contiene una zona periférica de activador de plasminógeno en la superficie estromal, sugiere que el activador de plasminógeno corneal puede tener un importante papel en la regulación de la permeabilidad de los vasos del limbo (a través de vías conocidas plasmina-dependientes), en la neovascularización de la córnea y en la iniciación de quimiotaxis de polimorfonucleares, demostrando que el activador del plasminógeno humano (urokinasa), introducido en el estroma corneal en la zona periférica corneal, es capaz de causar neovascularización en la córnea de conejo debido o al efecto mitógeno directo de la urokinasa en las células endoteliales vasculares o a los efectos de la plasmina generada del plasminógeno en el estroma y/o en otras moléculas activas (kalicreína, kinina), que pueden ser activadas después de que la plasmina sea generada (24).

También se ha demostrado el factor vasoestimulante, una sustancia difusible liberada en la zona crítica, y el factor de actividad angiogénica, que puede ser obtenido de cultivos de epitelio corneal.

El sistema de activación del plasminógeno puede iniciar la degradación del colágeno en úlceras provocadas por quemaduras alcalinas (24).

B) INERVACION

La córnea es uno de los tejidos más sensibles del cuerpo, y ésta sensibilidad sirve para protegerla. La córnea es exquisitamente dolorosa cuando los nervios están expuestos en úlceras corneales o abrasiones(5).

La inervación proviene de los nervios ciliares largos y cortos, que penetran en la esclerótica por el polo posterior, ganando el plexo ciliar en la supracoroides y desde aquí salen ramas que penetran en la esclerótica. Estos nervios están reforzados por algunas ramas procedentes de la episclera y de la conjuntiva. A nivel del limbo, en el tercio medio de la córnea, encontramos un auténtico plexo pericorneal, estando cada nervio corneal en relación con varios nervios ciliares (2).

A este nivel, los nervios están rodeados por mielina, que desaparece al llegar al limbo, y por una vaina de Schwann, que persiste hasta muy dentro de la córnea. A partir del limbo los nervios corneales se dirigen hacia el centro de la córnea, dividiéndose de forma dicotómica y haciéndose progresivamente más superficiales (Figs. 7 y 8).

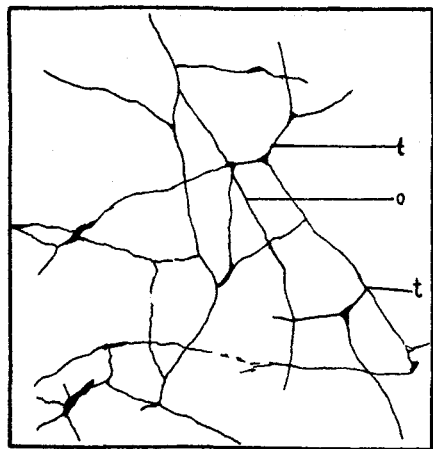


FIG. 7

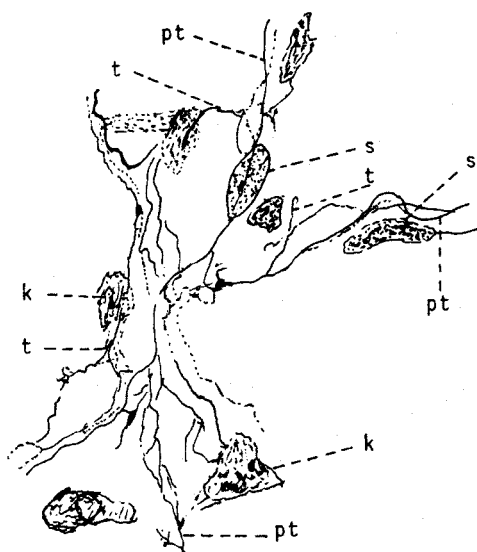


FIG. 8

Fig. 7.- Plexo nervioso en el centro de la córnea. En las capas medias (o) y profundas (t) destaca el progresivo aumento triangular en el punto de cruce (Saraux H) (2)

Fig. 8.- Red nerviosa terminal en la córnea humana. k, células fijas del estroma corneal; s, núcleo de la célula de Schwann; pt, red prterminal; t, red terminal (Saraux H) (2).

A nivel de las láminas, cada filete nervioso se divide

sucesivamente en multitud de filamentos muy tenues que se insinúan entre las laminillas y que pierden a este nivel su vaina de Schwann.

Debajo de la membrana de Bowman se forma un anillo muy denso de fibras nerviosas, configurando un auténtico plexo del que parten ramas en dirección vertical que perforan la membrana de Bowman, perdiendo la vaina de Schwann e insinuándose entre las células epiteliales.

Al microscopio electrónico se observan las fibras nerviosas rodeadas de células de Schwann, que perforan la basal epitelial y se aplican sobre la pared de las células, a las que deprimen pero sin penetrarlas.

Junto a esta red principal existe una red accesoria nacida de los nervios conjuntivales y episclerales, que penetran en el limbo acompañando a los vasos y forman en la periferia de la córnea un plexo anular de unos 1,5 mm. de largo que recorre por debajo la membrana de Bowman (plexo anular de Ranvier). También se han descrito corpúsculos de Krause en el limbo (2).

PARTE 2ª.-BIOQUIMICA Y FISILOGIA DE LA CORNEA

1.-BIOQUIMICA DE LA CORNEA

La composición química de la córnea equivale a la suma de sus partes, o sea, el estroma, el epitelio, el endotelio y la membrana de Descemet. El número de células y su morfología varía entre estas áreas, y esto se refleja en las diferencias químicas; químicamente, la córnea es un tejido heterogéneo.

La córnea contiene entre un 72 y un 82% de agua. Las proteínas están representadas por un 18-20%, con un 4 a 4,5% de polisacáridos. Las enzimas determinadas en la córnea (enzimas respiratorias, fosfatasas, amilasas, etc.), se hallan, en parte, a mayor concentración en el epitelio y en el endotelio que en el estroma, lo que indica la especial actividad metabólica de estos tejidos (1).

a) Estroma de la córnea.

El estroma constituye la mayor parte de la córnea. Es un tejido conectivo diferenciado que contiene entre un 75 y un 80% de agua.

De los sólidos restantes (20 a 25%), la mayor parte está constituido por colágeno, otras proteínas y mucopolisacáridos o glucosaminoglicanos. Las fibrillas de la córnea están diestramente organizadas y presentan la típica periodicidad del colágeno de 64 a 66 nm. Estas fibrillas de colágeno forman el esqueleto del estroma corneal.

Las propiedades fisicoquímicas del colágeno corneal no difieren de las del colágeno de otras estructuras del organismo, presentando un alto contenido en nitrógeno, glicina, prolina e hidroxiprolina. El colágeno de la córnea pertenece a los colágenos fibrilares tipo I, sintetizándose en los ribosomas en forma de preprocolágeno a través de la membrana a las cisternas del retículo endoplásmico rugoso, donde inmediatamente una proteasa la escinde de la molécula para suministrar procolágeno; es degradado por las enzimas proteolíticas, como la collagenasa, la pepsina o la papaína.

Los glucosaminoglicanos o mucopolisacáridos (MPS), representan entre un 4 y un 4,5% del peso seco de la córnea. Los MPS están localizados

en el espacio intersticial y desempeñan una función en la hidratación de la córnea a través de interacciones con los electrolitos y con el agua. Igualmente, actúan como aniones y unen los cationes con el agua. En el estroma corneal se encuentran tres fracciones principales de MPS: queratán-sulfato (50%), condroitina (25%) y condroitín sulfato A (25%)(5).

La composición química de estos MPS está resumida en la Tabla 2.

Los MPS son degradados por enzimas específicas.

El queratán-sulfato de la córnea es único y difiere del queratán-sulfato encontrado en cartílago por la longitud de sus cadenas, el grado de ramificación y la predominancia de ácidos amino.

La condroitina se encuentra exclusivamente en la córnea. La incorporación de azufre en los MPS del estroma corneal es usado como una técnica bioquímica para medir la velocidad de formación o de conversión de los MPS sulfatados (queratán-sulfato y condroitín-sulfato A), en animales de experimentación.

Los MPS se tiñen metacromáticamente con colorantes tales como el ácido peryódico de Schiff -PAS- (MPS neutros), o el azul alcian (MPS ácidos), en cortes histológicos de la córnea.

En pacientes que padecen errores innatos del metabolismo de los MPS (mucopolisacaridosis), los MPS se acumulan en la córnea provocando opacidades. La opacidad corneal se encuentra en los siguientes subtipos de mucopolisacaridosis: Urler (tipo I), Morquio (tipo IV), Scheie (tipo V) y Maroteux-Lamy (tipo VI) (Kenyon KR, Quigley HA, Hussels I y cols., 1959) (25). Se sabe ahora con certeza que tanto en el síndrome de Urler como en el de Scheie existe una diferencia de α -L-iduronidasa, una glucosidasa que degrada los MPS.

Los MPS están prácticamente ausentes en la esclera, por lo que los MPS han sido relacionados con el mantenimiento de la hidratación y transparencia corneal, ya que la esclerótica es opaca y refleja y dispersa la luz en condiciones normales.

Aunque las células del estroma contienen enzimas glucolíticas del ciclo de Krebs, el estroma tiene una actividad enzimática baja. El

Nombre	Peso molecular	Disacárido dominante	Sulfato	Modificaciones frecuentes	Localizaciones principales
Queratán sulfato	10.000 a 19.000	Galactosa-N-acetil-glucosamina	1	Sulfato en la posición 6 de cualquiera de los dos	Córnea, cartílago núcleo pulposo
Condroitina	40.000	Glucuronato de N-acetil-galactosamina	0		Cartílago, hueso piel, córnea
Condrotín-4-sulfato			1	Sulfato en la posición 4 de la hexosamina	

Tabla 2. Composición química y localizaciones de los mucopolisacáridos de la córnea (Waltman SR, 1981) (5).

adenosín trifosfato (ATP) que contiene el estroma es escaso (10 a 15 $\mu\text{mol/Kg}$ de tejido húmedo) (5).

b) Membrana de Descemet

La membrana de Descemet está constituida por un material semejante al colágeno, con un elevado contenido de glicina y de hidroxiprolina, característica química de las membranas basales en otros tejidos (membrana basal de los glomérulos renales, de los vasos sanguíneos y de la cápsula del cristalino). Las glucoproteínas están estrechamente unidas al componente proteico.

En contraste con el estroma corneal, no posee cantidades significativas de MPS sulfatados. Además, el colágeno de la membrana de Descemet es insoluble, excepto en álcalis o ácidos fuertes, y es más resistente a la colagenasa que el colágeno del estroma corneal.

Con el microscopio electrónico, la membrana de Descemet en personas de edad avanzada suele presentar una estriación entrecruzada, con unas estrías separadas por espacios de unos 1070 \AA y unidas por filamentos de menos de 100 \AA de anchura y con una separación entre sí de unos 270 \AA . Los cortes tangenciales de estas córneas revelan una disposición bidimensional de nódulos, separados entre sí unos 1070 \AA , y unidos por filamentos formando figuras hexagonales. Los datos histoquímicos, los análisis químicos y las investigaciones por difracción de rayos X, confirman que los filamentos que forman los hexágonos están formados por un colágeno atípico.

En las persona jóvenes, la membrana de Descemet es de aspecto más homogéneo. Se cree que la disposición hexagonal de las fibras se forma con el tiempo por la agregación de un colágeno que normalmente se halla en dispersión en una sustancia fundamental amorfa, como tropocolágeno (6).

La membrana de Descemet es muy elástica y representa una barrera a la perforación en las úlceras profundas de la córnea. En las secciones histológicas, las glucoproteínas de la membrana de Descemet se tiñen intensamente con el ácido peryódico de Schiff (PAS).

c) Epitelio

El epitelio representa el 10% del peso húmedo total de la córnea. La composición química de las células epiteliales puede compararse a la de las células del parénquima hepático. En el epitelio, el agua representa el 70% del peso húmedo; los sólidos son:

- ácidos nucleicos: ADN y ARN
- lípidos (fosfolípidos y colesterol) en las membranas celulares.
- proteínas.

La cantidad de ADN en el epitelio, estroma y endotelio corneal de conejos se puede medir mediante el método de la difenilamina, que es el método de elección debido a su velocidad, reproducibilidad y sensibilidad. Para su cuantificación se mide la cantidad de fósforo contenido en el ADN previamente extraído; la cantidad de ADN se calcula basándose en el hecho de que el ADN contiene un 9,2% de fósforo.

El método de la difenilamina es capaz de medir entre 1,7 y 70 μg de ADN. Este nivel de sensibilidad es adecuado para determinar el contenido de ADN de los tejidos corneales. Sin embargo, si se quiere mayor sensibilidad, puede usarse el estudio fluorométrico del ácido diamino-benzoico, que es unas 10 veces más sensible que el ensayo con difenilamina (Friend J, Kiorpes T y Kinoshita S; 1983) (26).

Los resultados obtenidos por Willin O'Brien (1979) (27) están reflejados en la Tabla 3.

Tejido	μg ADN $1,2 \pm 0,1 \text{ cm}^2$	μg ADN 100mg/peso seco
Córnea total	$84,1 \pm 3,4$	758
Epitelio	$70,0 \pm 3,6$	5384
Estroma	$12,8 \pm 1,6$	169
Endotelio	$3,9 \pm 0,7$	433

Tabla 3. Contenido de ADN de las capas de la córnea de conejo (Willian O'Brien, 1979) (27).

El epitelio, estroma y endotelio corneal del conejo contienen respectivamente 52,8, 1,7 y 4,3 μg de ADN por mg de peso seco de tejido, observándose que el epitelio contiene más ADN que cualquier otra capa de la córnea (27).

Ya que el contenido en ADN es una medida para expresar la celularidad, el dato sugiere que el epitelio contiene cerca de 5 veces más células que el estroma y, aproximadamente, 20 veces más células que el endotelio (27).

El análisis del glucógeno puede ser cuantificado mediante la reacción de la hexoquinasa, específica de la glucosa por acoplamiento con la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. El glucógeno así obtenido es expresado como micromoles de glucosa por gramo de peso seco de epitelio o muestra. Friend J y cols. (26), usando este método obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 4):

Muestra de tejido	Peso seco	Glucógeno	
	(mg)	$\mu\text{moles/peso seco}$	$\mu\text{moles/muestra}$
Todo el epitelio de la córnea	$1,55 \pm 0,13$	253 ± 24	$0,34 \pm 0,04$
11 mm de diámetro	$1,23 \pm 0,26$	247 ± 29	$0,34 \pm 0,07$

Tabla 4. Peso seco y contenido de glucógeno de muestras epiteliales (promedio y desviación standar) (Friend J, Kiorpes T y Kinoshita S, 1983) (26).

En el epitelio se desarrollan grandes actividades de enzimas de glucólisis, ciclo de Krebs y ATPasa activada por Na^+K^+ . El epitelio contiene ATP, 2000 $\mu\text{mol/Kg}$ de peso húmedo; glucógeno, 10 mg/g; glutation, 75 a 180 mg/g y ácido ascórbico, 47 a 94 mg/100g.

En el pitelio se encuentran también elevadas concentraciones de acetil colina y colinesterasa, que pueden tener participación en el transporte de cationes o en la función nerviosa trófica.

La queratina es el mejor producto asociado con la maduración de

algunos tejidos epiteliales, hasta el punto de que varios estados de diferenciación celular, así como el tipo de células epiteliales presentes en una especie, son frecuentemente demostrables por la composición de queratina.

El epitelio conjuntival cubre la superficie corneal en algunas situaciones clínicas como la injuria química o la transplatación conjuntival. Posiblemente, la queratina puede ser un marcador más sensible para demostrar si la superficie regenerada del epitelio corneal es corneal o conjuntival.

Se ha estudiado las proteínas insolubles en agua (semejantes a queratina), en el epitelio de la córnea y conjuntiva. Aunque el epitelio corneal y conjuntival del conejo son epitelios no queratinizados de la superficie ocular, estos dos tipos de epitelio muestran una remarcable diferencia en las proteínas semejante a queratina. El epitelio regenerado de la córnea y conjuntiva son también diferentes durante los estadios iniciales en los procesos de curación (Kinoshita S, Friend J, Kiorpes TC y Thoft RA; 1983) (28).

Cuando el epitelio conjuntival crece sobre la córnea, sufre una transformación bioquímica y morfológica dentro del epitelio corneal y puede no estar completada a los 3 meses, pudiendo retornar a sus características histológicas iniciales por cualquier agresión mecánica o inmunológica (28).

Como resultado de la metaplasia conjuntival dentro del epitelio corneal, hay cambios en los modelos de proteínas que parecen estar asociados con la emigración celular. Así, los cambios en las proteínas semejantes a queratina se han observado durante la emigración del epitelio corneal para cubrir los defectos centrales, observándose una banda por electroforesis en el epitelio corneal emigrante que no está presente en el epitelio corneal normal y que desaparece sólo unos pocos días después de que el defecto sea curado (28).

Mientras que el significado de la aparición de nuevas bandas de proteínas no está claro, es evidente que la emigración y los procesos de curación constituyen un estímulo para la rápida síntesis o alteración de las proteínas semejantes a queratina. Se ha observado que las células emigrantes pueden sintetizar nuevas proteínas semejantes a queratina,

posiblemente por cambios en los filamentos citoplasmáticos. Aunque no hay clara evidencia directa de que estas bandas sean esenciales para el movimiento celular, éstas pueden jugar un importante papel en la emigración celular (28).

Se ha sugerido que los fenotipos del epitelio "in vivo" son determinados predominantemente por divergencia intrínseca, pero que el medio externo o las condiciones de crecimiento pueden afectar también la diferenciación de las células epiteliales; así el epitelio regenerado derivado de la conjuntiva creciente sobre la córnea, el fenotipo puede ser regulado principalmente por el medio externo y puede no ser determinado estrictamente por la divergencia intrínseca (28).

2.-METABOLISMO DE LA CORNEA

El término metabolismo comprende una serie de procesos químicos por medio de los cuales se obtiene energía que luego se utiliza para mantener las funciones normales de un tejido. En la córnea se necesita energía para mantener su transparencia y deshidratación. La energía en forma de ATP es generada por medio de la degradación de glucosa en ácido láctico (glucólisis) y en CO_2 y H_2O (ciclo de Krebs) (Fig. 9).

La córnea obtiene la glucosa principalmente del humor acuoso (Thoft RA, Friend J y Dohlman CH; 1971) (29). Las lágrimas y los capilares del limbo aparentemente contribuyen con cantidades mínimas de O_2 y de glucosa para el metabolismo de la córnea.

Con la degradación de un mol de glucosa a ácido pirúvico y con la conversión de éste en 2 moles de ácido láctico, se generan 2 moles de ATP. La utilización del ácido pirúvico en el ciclo de Krebs, con la utilización de O_2 , da como resultado la formación de 36 moles de ATP por mol de glucosa.

La mayor parte del oxígeno consumido por la córnea es absorbido por el epitelio y endotelio. El consumo de oxígeno del epitelio y del endotelio expresado en QO_2 es de 5 a 6, mientras que el del estroma es de sólo 0,23. El endotelio de la córnea obtiene la mayor parte del oxígeno

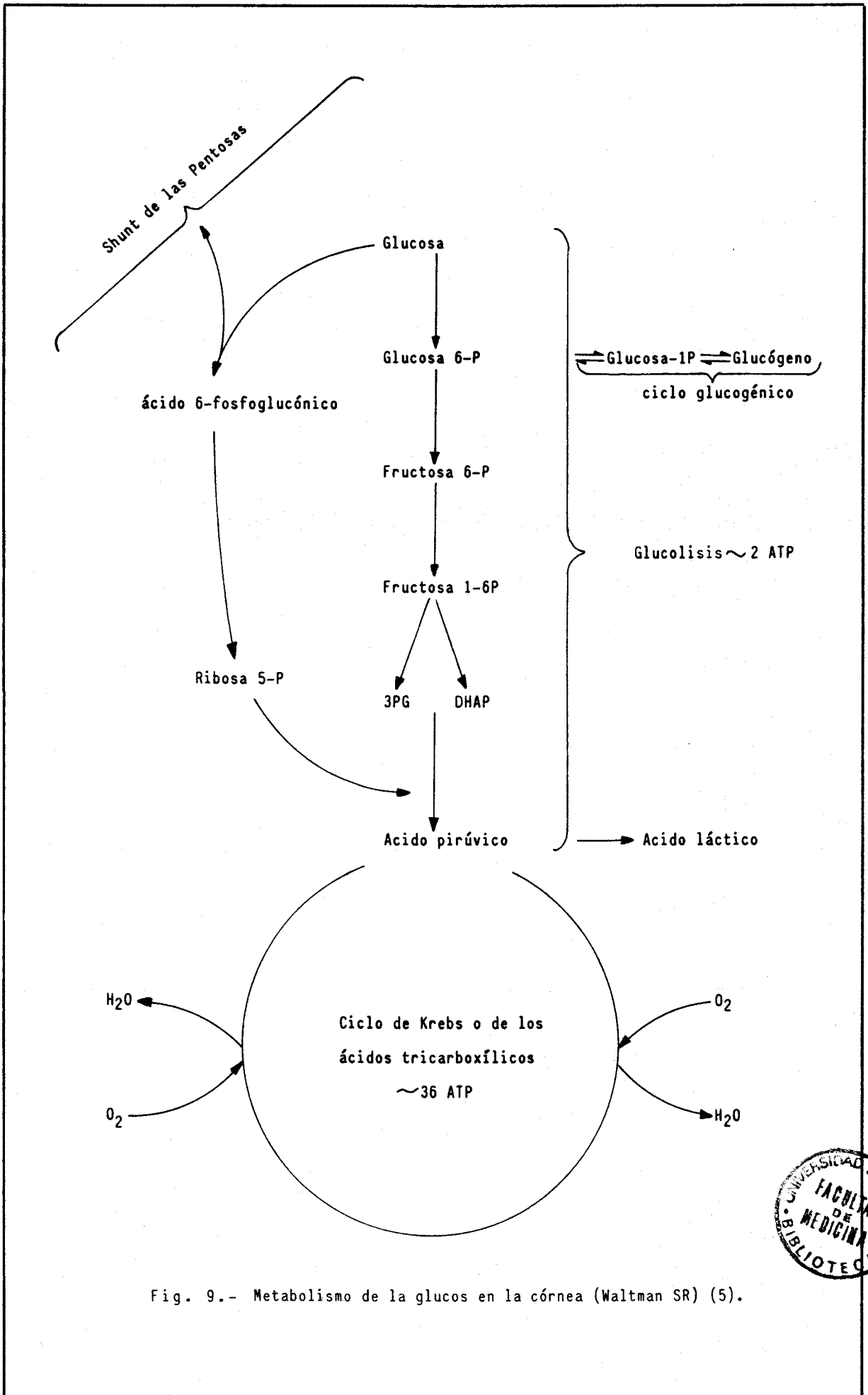


Fig. 9.- Metabolismo de la glucos en la córnea (Waltman SR) (5).



que requiere del humor acuoso, mientras que el epitelio lo hace tanto de los capilares del limbo como del oxígeno disuelto en la película precorneal. Esto es confirmado también por la experiencia clínica y experimental: cuando se usan lentes de contacto grandes y apretadas durante períodos prolongados, la córnea se edematiza.

Si el acceso de oxígeno al epitelio es bloqueado por medio de lentes de contacto muy estrechas o por el reemplazo de aire por nitrógeno, la córnea se edematiza y se vuelve opaca. En tales condiciones anaeróbicas el epitelio de la córnea produce ácido láctico. El éxito de la epiqueratoprótesis sugiere que el epitelio puede ser el responsable de las alteraciones estromales, tal vez por un exceso de producción de ácido láctico (5).

La glucosa puede ser almacenada en el epitelio en forma de glucógeno para ser degradada en ciertas situaciones de emergencia en las que el tejido necesita energía adicional, como por ejemplo durante los procesos de reparación que se suceden a las heridas traumáticas o quirúrgicas.

En el epitelio, la glucosa también puede ser metabolizada a través de la vía hexosa-1-fosfato (ciclo de las pentosas), pero sin obtener ganancia en ATP. Una característica del metabolismo a través de la vía de las pentosas es la formación de ribosa-5-fosfato y de trifosfopiridín-nucleótido reducido (TPNH). La síntesis de los lípidos efectuada por el epitelio de la córnea necesita TPNH, formado a través de esta vía, mientras que la ribosa-fosfato formada puede integrarse a los ácidos nucleicos (ADN o ARN).

El epitelio contiene niveles de ATP, glucógeno y enzimas oxidativas mucho más elevados que los del estroma y el QO_2 del epitelio y del endotelio es de 25 a 30 veces mayor que el del estroma. Dado que el epitelio y el endotelio contienen de 15 a 20 veces más células que el mismo peso de estroma, los valores obtenidos con respecto al metabolismo estromal deben multiplicarse por este factor.

3.-COMPOSICION ELECTROLITICA DEL ESTROMA Y DEL EPITELIO CORNEAL

En la Tabla 5 se muestra la composición de Na^+ , K^+ y Cl^- de la

córnea de conejo y las de su epitelio y estroma, comparadas con la del humor acuoso y las lágrimas.

	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Córnea			
córnea total	156	28	97
estroma	172	21	108
epitelio	75	142	30
Humor acuoso	143,5	5,2	108
Plasma	151	5,2	109
Lágrimas (humanas)	149	17	131

Tabla 5. Composición electrolítica de la córnea, plasma y humor acuoso del conejo (mEq/LH₂O) (Waltman SR, 1981) (5).

El estroma de la córnea tiene una elevada concentración de iones Na⁺, mientras que el epitelio es rico en iones K⁺. Los tres fluidos que rodean a la córnea (plasma, humor acuoso y lágrimas), son también ricos en iones Na⁺ (5).

En el estroma corneal, es evidente que la suma de los cationes Na⁺ y K⁺ es superior a la del anión Cl⁻ en 85 mEq/Kg H₂O. Una parte de las fuerzas osmóticas pueden ser originadas por los iones bicarbonato (25 a 35 mEq/Kg H₂O). Las restantes fuerzas aniónicas, de 50 a 60 mEq/Kg H₂O, pueden ser generadas por los MPS ácidos que actúan como aniones (MPS⁻). Se sabe que cada molécula de queratán sulfato y condroitín sulfato poseen entre 27 y 160 lugares de unión para cationes univalentes. Además de los MPS, las fibrillas colágenas y la proteína libre pueden actuar como aniones para lograr la neutralidad electroquímica de la córnea (5).

Es generalmente aceptado que el epitelio de la superficie corneal

es importante desde diversos puntos de vista. Sirve como el sustrato del film precorneal que es la principal superficie refringente del ojo. Proporciona la principal barrera para la difusión de sustancias desde las lágrimas hacia el estroma corneal y la cámara anterior (Mishima S, 1981) (30). Es una región en la que eventos locales, tales como el trauma y la composición del medio que lo baña, determinan la longevidad y el ritmo de turnover de la células epiteliales (Wilson G, O'Leary D y Bachaman WG, 1983) (31).

Como la condición de la superficie del epitelio es crítica para la estabilidad del film precorneal, hay una fuerte implicación de que los estados patológicos de la superficie corneal/film precorneal pudieran ser mejorados atendiendo a la composición del medio que baña la superficie corneal (Bachman WG y Wilson G, 1985) (32).

El potasio tiene una alta concentración en las lágrimas. Junto con el sodio mantiene el medio interno de la célula. El potasio reduce la cantidad de luz esparcida y por lo tanto la proporción de necrosis (32).

El calcio y el magnesio ejercen un papel estabilizante en la división celular y contribuyen en el metabolismo del glicógeno, en la endocitosis y en la motilidad celular.

La concentración de magnesio en las lágrimas es desconocida, pero ha sido implicado en la permeabilidad de la membrana y en la agregación celular, y está presente en muchos medios de cultivo celular y en la solución Ringer.

Aunque no está demostrado que el calcio, magnesio bicarbonato y fosfato sean esenciales para la superficie corneal, estos iones junto con el sodio, potasio y cloro en una solución tamponada mantienen al epitelio, así como una solución más compleja conteniendo glucosa y moléculas grandes. Esto apoya la idea de que las lágrimas no abastecen de glucosa al epitelio corneal, o al menos, que la glucosa precorneal no es esencial (32).

Estudios de la superficie del epitelio corneal revelan que las células varían enormemente en reflectancia. Las células viejas próximas a la exfoliación aparecen claras, las células más nuevas están deslustradas y pardas, mientras que las células en un estado intermedio aparecen

azules (31).

Las células claras normalmente se descaman una a una, pero este modo de descamación depende de la solución que baña la superficie epitelial. En solución salina isotónica, todas las capas de células claras fueron observadas separándose de la superficie del epitelio. Parece, por lo tanto, haber relaciones entre la solución que baña la superficie epitelial, la cantidad de luz reflectada y la proporción de células exfoliadas (31).

La cantidad de luz reflectada fue medida cuando el epitelio fue bañada durante 150 min. con solución Ringer, solución isotónica (ClNa) o salina isotónica con potasio. La luz reflectada por el epitelio anterior fue significativamente diferente para las tres soluciones, siendo la mayor parte de la luz reflectada por el ClNa y la menor por la solución Ringer (31).

Se concluye que las lágrimas se requieren para suministrar más cosas que el oxígeno y mantener la correcta osmolaridad y pH del epitelio. El potasio y también el calcio muestran ser ingredientes esenciales en el mantenimiento de la superficie del epitelio. Estos iones no son suministrados a través del estroma desde las soluciones que bañan la superficie endotelial (31).

4.-DESHIDRATAACION DE LA CORNEA

La córnea normal mantiene durante la vida un espesor bastante constante. Conserva su contenido acuoso en un nivel estable, que oscila entre un 75 y un 85% de su peso. Sin embargo, los trozos de tejido corneal aislados muestran una marcada afinidad hacia el agua cuando son sumergidos en soluciones isotónicas. En esas condiciones, la córnea se edematiza y pierde la transparencia. Mínimas alteraciones en el edema corneal pueden ser estudiadas midiendo directamente el espesor de la córnea con instrumentos como el facómetro corneal unido a la lámpara de hendidura de Haag-Streit.

A causa de que está fijada en el limbo, la córnea sólo puede hincharse en la dirección anteroposterior. Por esto, incrementos en el espesor corneal pueden ser correlacionados directamente con incrementos

en la hidratación (5).

El equilibrio del agua existente en la córnea depende de los siguientes factores que mantienen la relativa deshidratación del tejido: integridad anatómica del endotelio y del epitelio, equilibrio electro-lítico y osmótico, metabolismo, film precorneal y evaporación del agua a través de la superficie anterior y presión intraocular. Estos mecanismos serán tratados como entidades separadas en los párrafos siguientes; sin embargo, para la deshidratación de la córnea es necesario un perfecto equilibrio entre todos ellos.

a) Integridad anatómica del endotelio y del epitelio.

Cuando se produce un deterioro del epitelio o del endotelio corneal ocasionado por medios químicos o físicos (incluyendo la radiación ionizante), aparece un edema del estroma. La abrasión de la córnea o cualquier condición que provoque la pérdida del epitelio podrá producir áreas de edema y opacidad corneal. Afortunadamente, el epitelio de la córnea se regenera rápidamente y, generalmente, el exceso de hidratación de la córnea es leve y transitorio.

El daño del endotelio es mucho más serio. La destrucción extensa de las células endoteliales provocará un marcado, y a veces permanente, edema así como también la pérdida de la transparencia. El hecho de que el deterioro del endotelio produce como resultado un mayor y más rápido edema corneal que el deterioro del epitelio, sugiere que el endotelio es de gran importancia en el mantenimiento de la deshidratación (5).

En el conejo, la remoción del epitelio produce un aumento en el espesor corneal del 200% en 24 horas, mientras que la remoción del endotelio produce un aumento del 500%. La velocidad promedio inicial de engrosamiento es de 0,5% del espesor original por minuto, cuando es extirpado el epitelio, y del 2% por minuto cuando se extrae el endotelio. (5).

La causa principal de la hidratación de la córnea tras el daño endotelial parece ser el flujo de agua proveniente del humor acuoso y no una disminución del transporte de agua hacia afuera de la córnea, constituyendo el endotelio una barrera a la entrada de agua desde la cámara anterior y la membrana de Descemet la barrera para la salida.

En la distrofia endotelial de Fuch, condición que incluye la patología de la membrana de Descemet y del endotelio corneal, se produce un edema corneal progresivo; dicho edema prolongado llevará a una disminución de la agudeza visual (5).

b) Equilibrio electrolítico y osmótico

El estroma corneal es altamente hidrofílico debido a la fuerza osmótica de los MPS del estroma, de los que el queratán-sulfato puede ser el más importante. El mantenimiento del estado deturgescente es necesario para la visión normal ya que la córnea edematosa pierde rápidamente su transparencia. El epitelio y el endotelio corneal son membranas limitantes del estroma y juegan papeles críticos en el mantenimiento de su deshidratación.

El endotelio tiene una función de barrera y una bomba metabólica activa en el endotelio remueve el líquido que gotea dentro del estroma. El endotelio corneal bombea agua, sodio y, posiblemente, otros electrolitos del estroma. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que, al menos en ciertas especies, principalmente los iones bicarbonato son bombeados desde el estroma al humor acuoso (5).

Aunque el tejido corneal puede funcionar como una unidad, las células epiteliales y endoteliales pueden bombear iones Na^+ y Cl^- hacia afuera (hacia el humor acuoso y las lágrimas). Estas bombas celulares tienen un papel definitivo en la presencia de la deshidratación estromal. Como la concentración de iones Na^+ en el humor acuoso y en las lágrimas es más elevada que en el estroma, los iones Na^+ retroceden al estroma. De este modo en la córnea se produce un mecanismo de bombeo y fuga para iones Na^+ (5).

Se ha encontrado en el epitelio del conejo y de la rana una bomba de Cl^- estimulada por la epinefrina y el AMP cíclico.

La presión osmótica del fluido de los electrolitos del estroma pueden ser importantes en la regulación del movimiento del agua. La relación entre la tonicidad del fluido estromal y la del plasma, humor acuoso y lágrimas, todavía no ha sido resuelta.

La aplicación tópica de glicerina reduce el edema de la córnea

aumentando la osmolaridad de la película precorneal, constituyendo un medio clínico simple para aclarar temporalmente una córnea edematosa. Igualmente, si la osmolaridad del líquido que baña a la cámara anterior es elevada, la córnea se deshidratará, siendo la cantidad de agua perdida proporcional a la hiperosmolaridad del fluido. El edema experimental de la córnea puede evitarse elevando la osmolaridad del fluido que la baña (5).

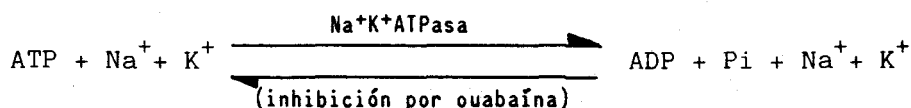
Todos estos estudios tienden a fundamentar el concepto de que las fuerzas osmóticas pueden actuar sobre la córnea para mantener el tejido en un estado relativo de deshidratación.

c) Metabolismo

Las actividades metabólicas de la córnea contribuyen a mantener la deshidratación del tejido. Cuando se inyecta yodoacetato, veneno metabólico que inhibe la glucólisis y la mayor parte del metabolismo oxidativo de la córnea, en la cámara anterior se producirá un 80% de aumento en la hidratación corneal, encontrándose un efecto similar en córneas en las que concentraciones más elevadas de yodoacetato fueron aplicadas en el epitelio durante cinco minutos (Harris J, 1960) (33). Probablemente, la inhibición del metabolismo del endotelio y del epitelio debido a la falta de ATP, necesario para el funcionamiento de la bomba electrolítica, es la causa principal de dicha sobrehidratación corneal (5).

Es generalmente aceptado que la expulsión activa de iones Na^+ producida desde la mayor parte de los tejidos es mediada por la enzima Na^+-K^+ ATPasa. Esta enzima suministra por medio de la degradación del ATP la energía suficiente para la expulsión de los cationes.

La $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa existe en concentraciones relativamente elevadas en el epitelio y el endotelio corneal, pero está prácticamente ausente en el estroma. La ouabaína, que es un inhibidor específico de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa, cuando se inyecta en la cámara anterior o se aplica tópicamente en el ojo, produce la inhibición de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPasa y la sobrehidratación de la córnea.



La córnea se deshidrata cuando la temperatura ambiente desciende y la actividad metabólica disminuye. Sin embargo, si existe suficiente glucosa, cuando la córnea es llevada otra vez a la temperatura ambiente, se deshidrata nuevamente. Por lo tanto, las córneas de ojos extraídas en autopsias conservadas en bancos a 4° C, están ligeramente hidratadas y las córneas injertadas pueden estar levemente edematizadas. El espesor de las córneas injertadas disminuye durante los días siguientes al trasplante, lo que indica que la córnea puede adaptarse rápidamente y recuperar su capacidad para la deshidratación (5).

d) Film precorneal y evaporación de agua a través de la superficie anterior.

El film precorneal es esencial para el mantenimiento de la integridad óptica de la córnea y toda modificación cualitativa y cuantitativa del film lagrimal precorneal entrañan perturbaciones agrupadas clínicamente bajo el síndrome de ojo seco (Brewitt H, Honegger H, Andermann C, Andermann G y Jager M; 1984) (34).

Tras algunos minutos de exposición al aire, la desecación del epitelio entraña pequeñas modificaciones de las células epiteliales externas, fenómeno que se traduce en el microscopio electrónico de barrido (MEB) por una disminución de las microvellosidades y micropilis, así como por una elevación del núcleo.

La formación de cráteres (característicos en la córnea normal del conejo) sobre la córnea, es considerado en parte como un mecanismo de humedificación fisiológica porque no son visibles en las células desecadas y son más numerosas cuando la humedificación es normal. Una exposición prolongada al aire entraña en poco tiempo lesiones celulares más graves (34).

La exposición al aire ambiente durante 15 min. conduce a una descamación de las células corneales externas. Por contra, la instilación única de una gota de colirio mucomimético a base de condroitín-sulfato, ha permitido durante el mismo tiempo de observación, compensar una interrupción absoluta de la humedificación del epitelio corneal. Después de 30 min., sólo algunas células epiteliales externas son afectadas y presentan signos de descamación (34).

La instilación única de una gota de colirio a base de condroitín sulfato permite conservar la superficie epitelial consus microestructuras aunque estas últimas sean netamente menos acentuadas y esto proporcionalmente a la duración de la exposición al aire (34).

La velocidad de evaporación de agua de la película lagrimal precorneal y de la superficie corneal anterior en el conejo es de 60 $\mu\text{l/h}$, siendo de 6 $\mu\text{l/h}$ en el ojo intacto del conejo y de 100 $\mu\text{l/h}$ cuando la superficie anterior de la córnea ha sido lavada (Mishima S y Maurice D, 1961) (35).

La evaporación de agua de la película lagrimal precorneal concentraría este fluido y aumentaría su osmolaridad en relación con la córnea. La hipertonicidad de la película lagrimal podría expulsar agua de la córnea anterior y mantener el estado relativo de deshidratación corneal (5).

e) Presión intraocular

El hecho de que la presión intraocular elevada dé como resultado el edema corneal, constituye para los médicos un signo útil para el diagnóstico del glaucoma. Se admite que las presiones intraoculares en el ojo humano de 50 mm de Hg o más, producen a menudo un edema corneal detectable con la lámpara de hendidura. Cuando la presión desciende a valores normales por medios de procedimientos médicos o quirúrgicos, el hinchazón corneal causado por la presión intraocular elevada es reversible. En los niños, la presión intraocular elevada puede dar como resultado el agrandamiento de la córnea y roturas en la membrana de Descemet además del edema; esto ocurre en el glaucoma congénito (5).

5.-PERMEABILIDAD Y TRANSPORTE DE DROGAS A TRAVES DE LA CORNEA

La permeabilidad de la córnea es importante desde diversos puntos de vista. Primero, la nutrición de la córnea depende de la difusión de O_2 y glucosa y otras sustancias provenientes de los fluidos que la rodean. Segundo, el transporte de drogas a través de la córnea es determinado por la permeabilidad de las capas de la córnea. Esto es clínicamente importante ya que por medio de las preparaciones aplicadas tópicamente se

intenta alcanzar la cámara anterior del ojo o afectar a los procesos patológicos que tienen lugar en las diversas áreas de la córnea. Finalmente, La exquisita inervación de la córnea determina el grado de tolerancia a los medicamentos aplicados tópicamente en las enfermedades del ojo o como agentes humectantes para las lentes de contacto.

Son muchos los factores que afectan la penetración de las drogas a través de la córnea. Estos pueden ser divididos en aquellos relacionados con la solución del fármaco (solvente y soluto) y aquellos determinados por las capas de la córnea.

1) Solución del fármaco

- estructura química del solvente y del soluto.

Existen barreras ricas en lípidos que son atravesadas por compuestos no polares, mientras que hay estructuras ricas en agua que son fácilmente atravesadas por los compuestos polares. El término polar se refiere a su solubilidad en agua o en lípidos. Un compuesto no polar es más soluble en solventes orgánicos (lípidos) que en agua; un compuesto más polar es más soluble en agua que en lípidos.

Las membranas de las células epiteliales y endoteliales, siendo barreras ricas en lípidos, son atravesadas más rápidamente por los compuestos liposolubles, mientras que el estroma es atravesado más rápidamente por los compuestos hidrosolubles. Ya que los fármacos deben de atravesar barreras con diferentes especificidades estructurales, las sustancias que combinan ambas solubilidades penetran más fácilmente.

Así, los agentes anestésicos procaína y tetracaína, aunque tienen misma estructura básica, cambios en la relación entre los grupos polares y los no polares modifican su modo de penetrar en la córnea en forma significativa. La tetracaína, que tiene un grupo polar menos en uno de sus extremos y un grupo polar más que la procaína en el otro extremo de la molécula, penetra en la córnea de forma más rápida que la procaína. La velocidad de penetración de la procaína a través de la córnea es sólo el 14,8% de la que presentó la tetracaína. La diferencia de penetración coincide con el hecho clínico de que la tetracaína es un anestésico corneal efectivo en una concentración del 0,5%, mientras que la procaína

no produce efectos a concentraciones del 2% (5).

- peso molecular y concentración de las moléculas transportadoras.

Como en otras membranas biológicas, el peso molecular y la concentración del fármaco afectan la penetración a través de la córnea.

La velocidad de penetración a través de la córnea y los efectos ejercidos sobre el segmento anterior del ojo de fármacos tales como la pilocarpina, atropina, homatropina, epinefrina y esteroides, dependen de su concentración en la solución. La procaína alcanza el índice máximo de penetración en concentraciones de 1g/100ml. Las preparaciones de tales fármacos empleados en aplicaciones tópicas son muy concentradas, ya que sólo un pequeño porcentaje (generalmente inferior al 5%), llega a la cámara anterior.

- pH y osmolaridad de las soluciones.

El pH afecta a las cargas eléctricas y estabilidad de las soluciones. Los medicamentos oftálmicos más comunmente usados son vehiculizados en soluciones buffer, combinaciones de ácidos débiles y sus sales correspondientes.

Son comunes las soluciones buffer, tales como las combinaciones de ácido-sal: cítricas, acéticas, bóricas o fosfóricas.

Se ha desarrollado el siguiente concepto de cómo una base débil, como el alcaloide de homatropina, puede penetrar en la córnea intacta. En la forma empleada clínicamente, una solución de bromo-hidrato de homatropina consiste en iones homatropina con una carga positiva, $R_3N:H^+$ iones bromuro que llevan una carga negativa, Br^- ; y una pequeña cantidad de homatropina (base libre), R_3N e ión hidrógeno, H^+ .

A un pH de 6, que es el pH aproximado al de la solución habitual de homatropina, la proporción de iones homatropina con respecto a la base libre es de 1.000:1. Cuando se coloca una gota de solución sobre la córnea, el índice de disociación no será el mismo que dentro del frasco, ya que el pH de las lágrimas es aproximadamente 7,4 y no 6; pero la homatropina existirá tanto en la forma cargada como en la de base libre.

La base libre de la homatropina penetra en el epitelio debido a su liposolubilidad, como ya se ha mencionado. El ión homatropina penetra poco en el epitelio, ya que es relativamente insoluble en lípidos. En el estroma, el fármaco alcanza una segunda fase acuosa; el ión homatropina se disuelve rápidamente en el agua contenida en el estroma y el equilibrio se vuelca nuevamente hacia la partícula cargada. El $R_3N:H^+$ se difunde a través del estroma hasta alcanzar el endotelio. En el endotelio se vuelve a repetir el proceso que tuvo lugar en la superficie del epitelio. Finalmente, la homatropina cargada abandona el endotelio y se dirige al humor acuoso (Fig. 10) (5).

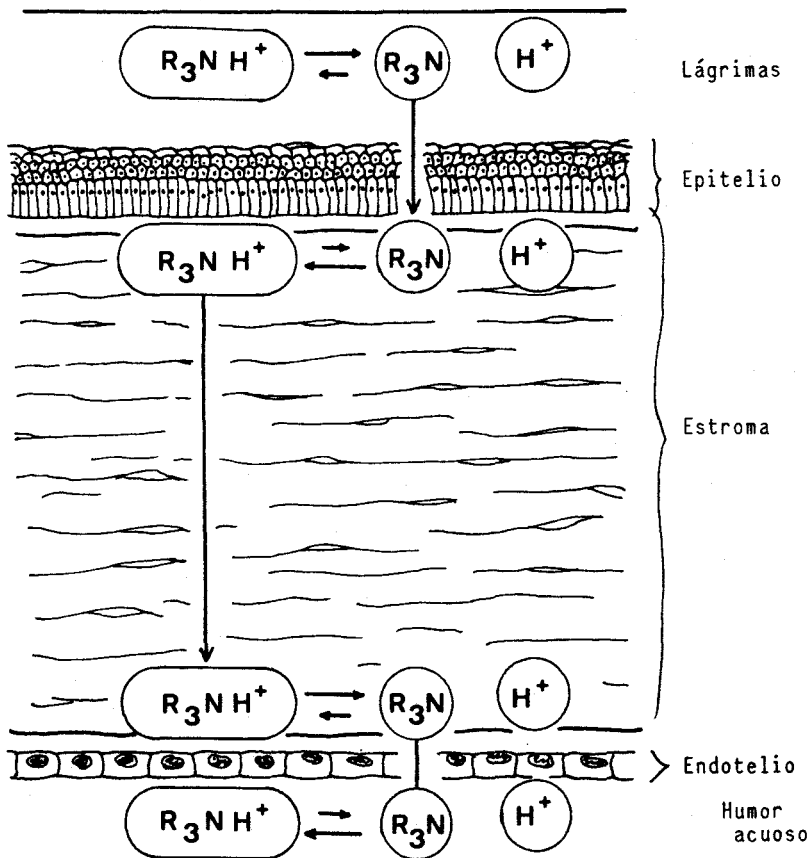


Fig. 10.- Transporte de homatropina a través de la córnea.

(Waltman SR) (5).

En cada uno de estos pasos la sustancia es capaz de penetrar debido a la diferencia de solubilidad de las dos formas en que existe. El proceso no es limitado por el agotamiento de la cantidad de homatropina presente en una de las formas, ya que el equilibrio entre éstas se restablece tan pronto como una partícula de cualquier forma (base cargada o libre), abandona la membrana.

La permeabilidad del epitelio aumenta considerablemente si la solución de las sustancias de prueba es hipotónica, es decir, inferior al 0,9%. La tonicidad que menos daña al epitelio es la del ClNa al 1,35%, que es la tonicidad de las lágrimas. El pH de la solución puede ser variado desde 4 hasta 10 sin que afecte la permeabilidad del epitelio, pero las soluciones que están fuera de estos límites aumentan la permeabilidad (5).

- agentes reductores de la tensión superficial.

Los agentes que reducen la tensión superficial aumentan la permeabilidad de las membranas.

La córnea es generalmente reconocida como la mayor vía de penetración ocular para los medicamentos instilados tópicamente. La mayor resistencia a la difusión a través de esta vía es producida por una unión apical ajustada entre las células de la superficie epitelial. La situación superficial de esta barrera permite una rápida modificación por medios químicos o mecánicos. Se ha sugerido un controlado incremento en la permeabilidad corneal producida por el surfactante, como un medio que facilita la penetración del fármaco (Marsh R y Maurice DM, 1971) (36).

Así, aplicando el cloruro de benzalconio, que es un agente reductor de la tensión superficial, en la superficie corneal a una concentración del 0,0001%, se observa un aumento en el potencial corneal antes de su total inhibición. A la hora de la aplicación, la superficie epitelial aparece desgajada sin un incremento en el número de células con pérdida periférica de microvillis y microplicae (Burstein NL y Klyce SD, 1977) (37).

Los cambios en la permeabilidad, evidenciados por una disminución en la resistencia transcorneal, se acompañaron de una rotura de las

células marginales de la capa superficial y, frecuentemente, por exfoliación de la capa celular superficial, observándose los efectos adversos del cloruro de benzalconio en la locomoción y adhesión celular, pudiendo producir, además, a altas concentraciones un edema corneal (Pfister RR y Burstein N, 1976) (38). Existe, pues, una correlación entre los cambios electrofisiológicos y el daño morfológico (37).

El cloruro de benzalconio es un potente detergente catiónico que destruye a las bacterias después de una atracción iónica. Un efecto detergente en las membranas plasmáticas explica su toxicidad epitelial cuando es usado frecuentemente (38).

2) Capas de la córnea.

El epitelio y el endotelio representan las barreras lipídicas de la córnea y la remoción de estas capas aumentará la penetración de la mayoría de los fármacos dentro del estroma. Como se muestra en la Tabla 6, el fosfato sódico de dexametasona al 0,1%, aplicando 50 μ l en la córnea, penetra en el humor acuoso sólo cuando el epitelio es removido. Sin embargo, si el ojo está inflamado, la dexametasona entrará en el estroma corneal y en el humor acuoso aún cuando el epitelio esté intacto (Tabla 6) (5).

	Inflamación	Estroma corneal (μ g/g)	Humor acuoso (μ g/ml)
Epitelio corneal intacto	No	0	0
Epitelio corneal extraído	No	42	4,8
Epitelio corneal intacto	Si	14	1,5

Tabla 6. Efecto del epitelio y de la inflamación sobre la penetración de dexametasona en la córnea y humor acuoso (Waltman SR, 1981) (5).

La penetración nociva de ácido a través de la córnea es retardada por el epitelio. La precipitación inmediata de proteínas actúa como una barrera a la posterior penetración del ácido. Sin embargo, cuando el ojo es expuesto a soluciones alcalinas fuertes, el primer efecto es el edema, produciéndose luego la descamación del epitelio. Por ello, la remoción previa del epitelio tiene un efecto menor sobre la intensidad de las quemaduras experimentales con álcalis, e incluso el epitelio intacto forma solamente una barrera blanda gelatinosa para impedir el paso del álcali (5).

6.-TRANSPARENCIA DE LA CORNEA

La córnea normal es transparente y cualquier alteración de esta propiedad interfiere seriamente en la claridad de la imagen retiana. Las peculiaridades anatómicas de la estructura de la córnea, como por ejemplo la uniformidad y la regularidad en el ordenamiento de las células epiteliales, las laminillas corneales estrechamente unidas entre sí, de tamaño uniforme que corren paralelas y la ausencia de vasos sanguíneos, contribuyen a la eficiencia del ojo como un instrumento óptico. La transparencia de la córnea depende de su constitución física y de los mecanismos que previenen su edematización.

a) Factores físicos.

Las fibrillas de colágeno del estroma y la sustancia líquida de fondo en la que asienta tienen diferentes índices de refracción. Normalmente, esto daría como resultado la opacidad del tejido, pues las fibrillas dispersarían la luz en todas las direcciones. Este efecto de dispersión se observa claramente en la esclerótica, la cual es mucho menos rica en mucopolisacáridos y que aún teniendo una composición estructural similar a la del estroma corneal, es sin embargo un tejido opaco. Esto se debe a que en la esclerótica las fibras de colágeno están menos uniformemente organizadas que en la córnea. Estas no tienen un diámetro uniforme, y los haces que forman se dividen frecuentemente para volverse a unir, formando de esta manera una estructura imbricada.

Parece probable, por tanto, que la regularidad en la orientación y disposición de los componentes del estroma corneal están íntimamente

relacionados con su transparencia, y ésta desaparece si las fibrillas son desordenadas por medios artificiales.

En 1957, Maurice (Maurice D, 1957) (39), sugirió una teoría: la "teoría del enrejado", para explicar la transparencia de la córnea, y demostró que si las fibras de colágeno del estroma son de diámetro regular y están dispuestas a modo de enrejado dejando entre sí espacios interfibrilares menores que el de la longitud de onda de la luz, las hileras tangenciales de fibrillas, al actuar como un enrejillado de difracción, pueden ocasionar interferencias destructivas de todos los rayos dispersos, pero no producen interferencias de aquellos rayos en la línea de la luz incidente; de tal manera que el haz de rayos incidente perpendicularmente traspasaría el estroma corneal sin interferencias. La figura 11 muestra el ordenamiento de las fibrillas en un retículo regular, estando cada una separada de su vecina por espacios regulares. En la figura 12 se observa el ordenamiento de las fibras cuando la córnea está edematizada o deformada; la distancia existente entre las fibrillas, o sea el espacio reticular, es mayor; no se produce interferencia destructiva, la luz se dispersa y la córnea se opacifica.

Este razonamiento, que requiere que la orientación de las fibras de colágeno se extremadamente regular en la córnea normal, sigue discutiéndose ya que el grado de regularidad de estas fibras en microscopía electrónica es pocas veces suficientemente demostrable para apoyar de manera concluyente la teoría del enrejado, aunque para tener un control preciso sobre la orientación exacta que presentan las fibras de colágeno harían falta estudios "in vivo". Se desconoce, por otra parte, qué grado de irregularidad deben sufrir los haces de laminillas de colágeno para perder la transparencia. Igualmente, la córnea del tiburón, que posee regiones en donde las fibras están desorganizadas y la distribución de los espacios interfibrilares no es uniforme, es bastante transparente.(5)

Por otro lado, si por cualquier causa se altera la organización de las fibrillas, se pierde la transparencia del estroma corneal. También, un estiramiento de la superficie corneal causaría alteraciones en la organización fibrilar: la córnea sometida a tracción se opacifica.

De todas formas, lo que sí parece cierto, es que la organización regular de las fibras de colágeno es imprescindible y debemos suponer que

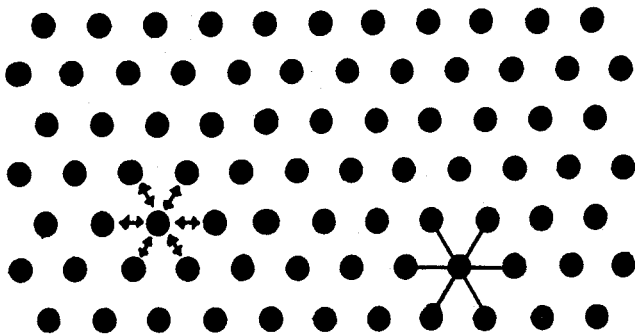
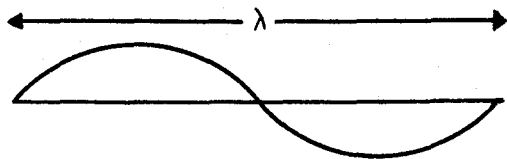


Fig. 11.- Corte transversal de las fibrillas ordenadas (Waltan SR) (5).

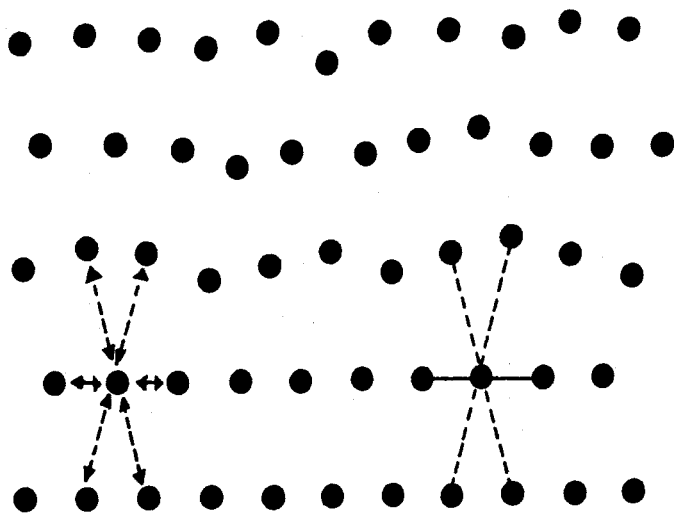


Fig. 12.- Diagrama de la córnea tumefacta (Waltan SR) (5).

en condiciones normales alguna fuerza opera en el mantenimiento de la disposición equidistante de las diferentes laminillas del estroma (3).

Goldman (Goldman JN , 1968) (40), ha propuesto otra teoría acerca de la transparencia de la córnea. Opina que la córnea es transparente debido a que las fibras son pequeñas con respecto a la longitud de onda de la luz y, en consecuencia, la luz incidente no se dispersa tanto como si las partículas en suspensión fuesen mayores.

Cuando sobre la córnea se ejercen presiones anormales, la transparencia de ésta disminuye temporalmente. Durante el aumento de la presión intraocular en el glaucoma agudo, la córnea se vuelve opaca, siendo evidente que esta pérdida de la transparencia no se debe enteramente a la inhibición de fluido que se produce, sino también a las alteraciones físicas del estroma y del edema epitelial, ya que la opacidad desaparece inmediatamente cuando la presión disminuye. Esto puede ser fácilmente demostrado en un ojo extirpado presionando el globo ocular, pues la córnea pierde inmediatamente su transparencia. Cuando se deja de presionar retorna la transparencia (5).

b) Efecto del edema sobre la transparencia de la córnea.

El estroma corneal tiende siempre a la tumefacción. Esto se demuestra al sumergir una córnea en una solución acuosa. La córnea se hincha considerablemente al absorber líquido. La córnea humana absorbe por lo menos una cantidad de líquido equivalente a 2,5 veces su propio peso. Las córneas totalmente embebidas de agua tienen una consistencia muy parecida a la del cuerpo vítreo y dejan de ser transparentes. La hinchazón, consecuencia de la fuerte imbibición de agua, se distribuye equilibradamente por toda la superficie del estroma, pero sólo en dirección perpendicular a su superficie.

La córnea es un sistema liofílico en tal medida que su comportamiento es similar al de la gelatina y de las fibrillas. Son varios los factores que afectan a su transparencia, actuando a través de alteraciones en el índice de refracción de su líquido intercelular, de las fibras corneales o de ambos. El poder de absorción del tejido conectivo se debe probablemente a sus dos componentes principales, el colágeno y los mucopolisacáridos (MPS).

El colágeno, dividido en haces sueltos de fibras delgadas, se encuentra inmerso en los MPS. Los MPS, como un gel, no sólo llenan todos

los espacios existentes entre los haces de fibras, sino que penetran en ellos y toman parte en la formación de las laminillas de la misma sustancia intermedia. Estos dos componentes deben ser considerados en forma separada con respecto a su contribución al poder total de absorción del tejido conectivo.

Cuando córneas secas son expuestas a vapor de agua en concentraciones crecientes de hasta un 30% de agua, ésta es absorbida por las fibras de colágeno, provocando una expansión del retículo cristalino. La absorción ulterior de agua es atribuida en su mayor parte al MPS interfibrilar, ya que éste es enormemente hidrófilo y podrá absorber, si se le permite, gran cantidad de agua (5).

La imbibición de colágeno es intensificada por la adición de ácidos y la imbibición de MPS por la adición de álcalis. De estas observaciones debe deducirse que el MPS de la córnea es muy importante para su transparencia.

Cuando una córnea se hincha y embebe líquido, la presión de tumefacción decrece rápidamente según sea la "sed" de los MPS, ya que al mismo tiempo las fibras de colágeno pierden su ordenación regular y el estroma corneal se vuelve opaco. Esto indica que, conforme decrece la presión de tumefacción, las fuerzas interfibrilares también se debilitan.

Existe, pues, una relación compleja entre el colágeno y los MPS, y estas sustancias no son fisicoquímicamente independientes (5).

Para mantener su transparencia, la córnea debe ser bañada con un líquido que posea un presión osmótica tan elevada como la del líquido intersticial. Si la córnea es bañada con una solución hipotónica, se vuelve opaca debido a la pérdida de fuerzas osmóticas que actúan en el epitelio corneal. Cuando la córnea está opaca debido a la imbibición, puede ser temporalmente aclarada bañando el ojo con una solución hipertónica, como por ejemplo una solución de sal o glicerina al 10%. Las soluciones del fármaco empleadas en terapias oculares deben ser equivalentes a una solución salina de 1 a 1,5% (5).

En distintas condiciones patológicas, como por ejemplo en el glaucoma o la distrofia endotelial, se acumula líquido en las células epiteliales en tal cantidad que provoca la formación de bullas. Esto

ocurre ya que el epitelio es mucho más resistente al movimiento del agua que el estroma. El humor acuoso pasa fácilmente a través del estroma corneal, pero su escape es retardado por el epitelio que se edematiza. Normalmente, la película lagrimal que yace sobre la superficie de la córnea es concentrada por la evaporación. Cuando no se produce evaporación en la superficie, el edema empeora considerablemente (5).

PARTE 3ª.-ULCERAS CORNEALES Y MECANISMOS DE REPARACION

1.-ULCERACION CORNEAL

Los padecimientos corneales tienen especial importancia porque la cicatrización debida a la ulceración corneal deja con frecuencia opacidades permanentes que disminuyen seriamente la agudeza visual, y porque las complicaciones que muchas veces las acompañan pueden producir pérdida del ojo, siendo, pues, una causa importante de ceguera y alteración de la visión en todo el mundo. La mayor parte de esta pérdida de la agudeza visual se puede prevenir, pero sólo si se hace un diagnóstico etiológico en etapa temprana y se aplica el tratamiento apropiado.

La inflamación de la córnea, denominada queratitis, tiene tres orígenes:

- 1) Infecciones exógenas. En estos casos la córnea se afecta de manera primaria.
- 2) De los tejidos oculares. Por continuidad anatómica directa, los padecimientos de la conjuntiva se extienden rápidamente al epitelio corneal, los de la esclera al estroma y los del cuerpo vítreo al endotelio.
- 3) Infecciones endógenas. Son raras y debido a la avascularidad de la córnea suelen ser de naturaleza típicamente alérgica.

Clínicamente, las inflamaciones corneales se dividen mejor en dos categorías: superficiales y profundas. Las primeras pueden ser purulentas (úlceras corneales) o no purulentas (Cotlier E, 1980) (41).

1) ULCERAS CORNEALES CENTRALES

Las úlceras centrales son úlceras infecciosas que se presentan después del daño epitelial. La ruptura en el epitelio puede ser periférica pero la úlcera siempre emigra hacia el centro de la córnea, lejos del limbo vascularizado (Vaughan D y Asbury T, 1984) (42).

En la úlcera corneal hay necrosis localizada en las capas más

anteriores de la córnea. El secuestro se desintegra parcialmente, se desprende hacia el saco conjuntival, y en parte se adhiere a la superficie de la úlcera. Generalmente el epitelio se descama en un área mucho mayor que la misma úlcera. El epitelio, sin embargo, crece rápidamente hacia la úlcera, pasa sobre sus bordes e inclusive sobre la zona necrótica o sobre el infiltrado purulento que constituye el piso (41).

El área circundante a la úlcera está infiltrada por leucocitos, y aparece de color gris. Esto corresponde a la etapa progresiva. Se produce una línea limitante igual que en cualquier zona de necrosis del organismo. Una muralla de leucocitos polimorfonucleares forman una segunda línea de defensa, y estos ejercen sus funciones digestivas macerando y disolviendo los tejidos necróticos (41).

Mientras tanto se desarrolla la vascularización. Vasos superficiales mínimos crecen hacia dentro desde el limbo cercano a la úlcera y proporcionan material para la reconstrucción de la sustancia perdida, además de anticuerpos; en consecuencia, desempeñan importante papel en la lucha contra la infección bacteriana.

Cada úlcera corneal se acompaña de cierto grado de iritis a causa de la difusión al interior del ojo de toxinas elaboradas por las bacterias; la iridociclitis resultante puede ser tan grave y la producción de leucocitos tan intensa que estas células se sedimentan en el fondo de la cámara anterior formando un hipopión o acumulación de células inflamatorias, predominantemente leucocitos polimorfonucleares, con algunas células mononucleares y macrófagos, en el ángulo inferior de la cámara anterior, que posteriormente se organiza en una red de fibrina. (Fig. 13) (41).

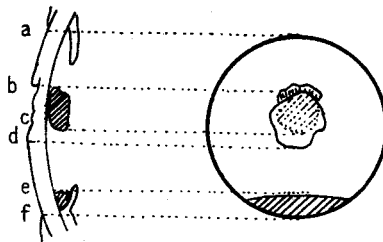


Fig. 13.-Úlcera de hipopión. b-d, extensión de la úlcera; b, margen activamente progresivo; b-c, masa de leucocitos y fibrina adherente a la superficie endotelial; e-f, hipopión (Cotlier E) (41).



El hipopión, por lo general (no siempre), acompaña a la úlcera. El hipopión suele ser estéril, ya que los leucocitos provienen de toxinas, y no de una verdadera infección de bacterias, esto explica la facilidad y rapidez con que suele absorberse un hipopión; aunque las úlceras micóticas a menudo contienen elementos fungales, debido a que los hongos pueden penetrar una membrana de Descemet intacta.

Para que los gérmenes oportunistas produzcan enfermedad deben satisfacerse dos condiciones: debe de haber cierta disminución de resistencia por parte de los tejidos, por haber estado el huésped bajo inmunosupresión local mediante anestésicos, medicamentos citotóxicos o una preparación de corticosteroides o por ser pacientes débiles, viejos o alcohólicos, o existir una especial virulencia del germen infeccioso.

Las úlceras de hipopión varían según el agente infeccioso y la edad del paciente. En adultos, la causa más común es el neumococo, produciendo una úlcera característica denominada serpiginosa, por su tendencia a propagarse sobre la córnea en trayectoria sinuosa (41).

Úlcera corneal neumocócica (úlceras serpiginosa aguda)

El neumococo está presente en el saco conjuntival normal y sobre todo cuando hay una inflamación del saco lagrimal (dacriocistitis). El neumococo todavía debe considerarse como el único microorganismo que es un verdadero patógeno corneal, siendo en algunas poblaciones casi la única causa bacteriana de úlcera corneal (42).

La úlcera corneal suele presentarse 24-48 horas después de la inoculación de una córnea excoriada. De manera típica produce una úlcera gris, muy bien circunscrita que tiende a generalizarse en forma errática desde su sitio original de infección hacia el centro de la córnea. La úlcera crece en tamaño y profundidad. En el lado de la infiltración más densa, que con frecuencia parece una media luna amarillenta, los tejidos se necrosan y la úlcera crece (Fig. 13).

Por el lado contrario puede haber cicatrización simultánea y los bordes pueden cubrirse de epitelio nuevo, así va avanzando la lesión. El borde progresivo muestra ulceración activa e infiltración a medida que el borde rezagado comienza a cicatrizar (este efecto de progresión

sugirió el término de "úlceras serpiginales agudas"). Primero son afectadas las capas corneales superficiales y luego el parénquima profundo. La córnea circundante a la úlcera no suele estar afectada (42).

Por lo general se forma un hipopión de tamaño moderado; si prosigue su curso natural el hipopión aumentará y se hará fibrinoso y la úlcera se perforará, pudiendo producirse un prolapso del iris y necrosarse toda la córnea produciéndose un panofthalmía que destruye el ojo. En otros casos se pierde la vista por formarse una cicatriz extremadamente densa que incluye el iris (leucoma adherente) (41).

Úlcera corneal por Pseudomonas

La úlcera corneal por Pseudomonas comienza por un infiltrado gris o amarillento en el sitio de ruptura del epitelio corneal. Por lo general se acompaña de dolor intenso y la lesión tiende a diseminarse rápidamente en todas direcciones debido a las enzimas proteolíticas producidas por los microorganismos. Aunque en un principio suele ser superficial, la úlcera puede afectar a toda la córnea. Con frecuencia hay un hipopión grande que tiende a aumentar de tamaño a medida que la úlcera avanza (42).

Este tipo de úlcera se suele originar por el uso de una solución de fluoresceína contaminada o por medicamentos contaminados que se utilizan para examinar o tratar una lesión corneal.

Úlcera corneal por Moraxella Liquefaciens

La Moraxella Liquefaciens produce una úlcera oval indolente que por lo general afecta a la parte inferior de la córnea y progresa hacia el estroma profundo en el transcurso de varios días. Por lo general, el hipopión, si se presenta, es pequeño y la córnea circundante no suele estar afectada. Casi siempre se presenta en pacientes con alcoholismo, diabetes u otra enfermedad inmunosupresora (42).

Úlcera corneal por Estreptococo Pyogenes

Las úlceras corneales centrales producidas por estreptococos-beta-hemolíticos no tienen características que permitan identificarlas. El

estroma corneal circundante a menudo presenta infiltración y edema y suele haber un hipopión moderadamente grande (42).

Úlcera corneal por Klebsiella Pneumoniae

La úlcera corneal por Klebsiella Pneumoniae suele ser indolente y a menudo no presenta hipopión, pudiendo haber edema del estroma circundante (42).

Úlceras corneales por Estafilococo Aureus, Estafilococo Epidermidis y Estreptococo Viridans

Las úlceras corneales centrales producidas por estos microorganismos se ven hoy en día con mayor frecuencia, sobre todo en córneas expuestas al riesgo por el uso de corticosteroides locales. Las úlceras a menudo son indolentes y pueden acompañarse de hipopión y algo de infiltración corneal circundante. Suelen ser superficiales y el lecho de la úlcera se siente firme al rasparse (42).

Úlceras corneales por Mycobacterium Fortuitum y Nocardia

Estas úlceras son raras. Con frecuencia se presentan después de traumatismos y a menudo son causadas por el contacto con tierra. Las úlceras son indolentes y el lecho de la úlcera suele tener líneas radiales. Puede haber o no hipopión (42).

Úlcera central caquética

Son úlceras centrales simétrica de tipo indolente que se presentan en niños desnutridos. Pueden ser superficiales, mostrando poco infiltrado y vascularización, o por el contrario, pueden ser rápidamente perforantes, con prolapso de un segmento de iris, que no debe seccionarse por lo grande del orificio corneal y por lo debilitados que están los mecanismos de reparación del paciente caquético (41).

2) ÚLCERA CORNEALES POR HONGOS

La úlcera corneales por hongos, que en un tiempo sólo se observaban en agricultores, han llegado a ser comunes en la población urbana desde la introducción de los corticosteroides para uso en oftalmología en 1952.

Antes de la era de los corticosteroides, las úlceras corneales por hongos sólo se presentaban si un inóculo superabundante de microorganismos se introducía en el estroma corneal, ya que la córnea ilesa parece poder controlar los pequeños inóculos a los que ordinariamente estamos expuestos (42).

Las úlceras por hongos son indolentes y tienen un infiltrado gris, a menudo hipopión, inflamación intensa del globo ocular, ulceración superficial y lesiones satélites (por lo general infiltrados en sitios distantes de la principal zona de ulceración). La lesión principal, y a menudo también las lesiones satélite, es una placa endotelial con bordes irregulares subyacentes a las lesiones corneales principales y que se acompaña de una reacción intensa de la cámara anterior, así como de un absceso corneal.

La mayor parte de las úlceras corneales por hongos son causadas por gérmenes oportunistas como *Cándida*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium* y otros más (42).

3) ULCERAS CORNEALES VIRALES

Las erosiones epiteliales puntiformes (erosiones superficiales múltiples) son las manifestaciones más comunes de infección viral. En este estado la córnea muestra pequeños defectos del epitelio que se tiñen con fluoresceína y suelen acompañarse de un principio agudo con conjuntivitis; hay dolor intenso, lagrimeo y fotofobia. Por regla general, la infección se caracteriza por recidivas, durante las cuales aparecen nuevas erosiones en brotes sucesivos una vez apagadas las lesiones iniciales o curadas las erosiones originales. Si estas recurrencias persisten mucho tiempo, puede haber invasión corneal por vasos superficiales (41).

Herpes simple

La queratitis por el virus herpes simple (VHS), ocurre en dos formas: primaria y recurrente. La enfermedad primaria es una queratoconjuntivitis y la enfermedad recurrente es un queratitis ulcerativa, generalmente dentrítica. Antiguamente todos los casos de queratitis herpética eran causados por el VHS tipo 1, pero actualmente también se

observan las producidas por el VHS tipo 2 (42).

Como lesión primaria, el herpes puede manifestarse bajo la forma de queratoconjuntivitis folicular intensa, pero en las formas recurrentes ordinarias la conjuntiva se ve libre de la aparición de conjuntivitis. Esencialmente es la córnea la comprometida, y la lesión inicial es una queratitis punteada superficial. Aparecen muchas pequeñas placas blanquecinas de células epiteliales sobre la córnea, con frecuencia dispuestas en filas o en grupos. Se descaman rápidamente, produciendo erosiones que pueden curar pronto sin dejar opacidad, aunque generalmente aparecen nuevos brotes y el padecimiento puede hacerse muy rebelde (41)

Los ataques de queratitis herpética de tipo recurrente común son desencadenados por fiebre, exposición excesiva a la luz ultravioleta, traumatismo, tensión psíquica, el inicio de la menstruación o alguna otra causa local o general de inmunosupresión. Por regla general se presenta en un solo lado, pero en el 4-6% de los casos se presentan lesiones bilaterales. Suele haber un antecedente de vesículas febriles u otra infección herpética, pero en ocasiones la úlcera corneal puede ser el único signo de una infección herpética recurrente.

En formas graves se desarrolla la úlcera dentrítica, que es la lesión más característica. Los infiltrados, que se diseminan en todas direcciones, confluyen y forma una gran úlcera superficial de bordes dentados. Con mayor frecuencia se observan estrías grisáceas que se extienden en una o más direcciones, aumentan de longitud y emiten ramificaciones laterales, con lo que se produce un típica figura dentrítica de aspecto arborescente (41).

El estroma puede comprometerse y aparecer una queratitis disciforme que es la complicación más común por virus del herpes simple y suele asociarse a inmunosupresión local o general (42).

El virus herpes simple también puede producir opacidades subepiteliales y queratitis intersticial avascular focal. Las lesiones periféricas de la córnea también pueden presentarse, siendo por lo general lineales. El hipopión es poco común y, generalmente, indica infección bacteriana o micótica secundaria (42).

Virus varicela zoster

La infección por el virus varicela zoster (VVZ), ocurre en dos formas: primaria (varicela) y recurrente (zoster). Las manifestaciones oculares son raras en la varicela pero comunes en el zoster oftálmico. En la varicela, las lesiones oculares comunes suelen consistir en pústulas en los párpados y los bordes palpebrales. Raras veces ocurre queratitis.

El zoster oftálmico suele acompañarse de queratouveítis de gravedad variable de acuerdo al estado inmunitario del paciente. El foco principal de infección está en el ganglio de Gasser, desde el cual viaja el virus por una o más de las ramas de la rama oftálmica del quinto par, con lo que su área de distribución queda señalada por hileras de vesículas o cicatrices dejadas por ellas. Casi siempre están complicadas las ramas supraorbitaria supra e infratoclear, con frecuencia la nasal, y rara vez la infraorbitaria. Pueden preverse las complicaciones corneales en el zoster oftálmico cuando hay una erupción cutánea a lo largo de las ramas del nervio nasociliar. Muy raramente es bilateral (42).

La etapa de erupción activa de vesículas dura unas tres semanas y es seguida de cierta anestesia cutánea. Las complicaciones oculares aparecen durante la fase regresiva de la erupción, pero pueden pasar inadvertidas durante la etapa aguda debido a la dificultad para examinar al ojo (41).

En el epitelio se observan manchas redondeadas compuestas de puntos blancos pequeños, que pronto invaden el estroma para producir una queratitis punteada subepitelial. En ocasiones la infiltración profundiza y se difunde por el estroma, acompañada de iridociclitis. Por lo común la córnea es insensible; esta pérdida de la sensación corneal siempre es una característica notoria y suele persistir durante meses después de haber desaparecido la enfermedad. En la esclera pueden aparecer nódulos similares (41).

Queratitis por la vacuna

La queratitis afecta al ojo comúnmente por inoculación accidental en niños recién inmunizados. Por lo general, los párpados presentan lesiones, pero si hay complicaciones en conjuntiva y córnea se presenta un cuadro clínico alarmante, con tumefacción palpebral tan intensa que

puede ser difícil el examen. Siempre hay infartos de los ganglios pre y retroauriculares. La lesión conjuntival típica es una ulceración extensa y en la córnea una queratitis punteada subepitelial que puede progresar en forma de úlcera geográfica y abscesos del estroma. Posteriormente puede aparecer una queratitis disciforme (41).

Queratitis por adenovirus

La queratitis suele acompañar a todos los tipos de conjuntivitis adenoviral, alcanzando su grado máximo de intensidad a los 5-7 días después del inicio de la conjuntivitis. Es una queratitis epitelial fina, cuyas lesiones diminutas se pueden agrupar para formar otra de mayor tamaño.

La queratitis epitelial a menudo se acompaña de opacidades subepiteliales (42).

Otras queratitis virales

Puede observarse una queratitis epitelial fina en otras infecciones virales como en el sarampión, rubeola, parotiditis, mononucleosis infecciosa, etc.

4) QUERATITIS POR CLAMIDIAS

Sólo en el tracoma y en el linfogranuloma venéreo se ha producido ceguera o daño visual. Las lesiones oculares del tracoma han sido las más estudiadas y tienen gran importancia diagnóstica. En orden de aparición consisten en:

- microerosiones epiteliales
- micropannus
- opacidades subepiteliales redondas
- folículos límbicos y sus restos cicatriciales
- pannus macroscópico
- cicatrización subepitelial extensa y difusa

Los casos raros de linfogranuloma venéreo han demostrado un menor número de cambios característicos. Los demás tipos de infecciones por clamidias sólo producen micropannus, queratitis epitelial y opacidades subepiteliales, que no son importantes en el aspecto visual (42).

5) QUERATITIS INDUCIDAS POR MEDICAMENTOS

Se puede observar una queratitis epitelial en pacientes que usan medicamentos antivíricos (idoxuridina y vidarabina) y los antibióticos de amplio espectro. Por lo general es un queratitis pustulosa que afecta principalmente a la mitad inferior de la córnea y a la fisura interpalpebral (42).

6) QUERATOCONJUNTIVITIS SECA (Síndrome de Sjögren)

Los signos primordiales de esta enfermedad autoinmunitaria en la cual disminuye o desaparece la secreción de las glándulas lagrimales y las glándulas lagrimales accesorias, son los filamentos epiteliales de los cuadrantes inferiores de la córnea. Hay una queratitis epitelial pustulosa que afecta principalmente a los cuadrantes inferiores. Los casos graves muestran seudofilamentos mucoides que se adhieren al epitelio corneal.

Esta queratitis del síndrome de Sjögren debe diferenciarse de la queratitis seca de enfermedades cicatrizantes como el tracoma y el penfigoide, en las cuales las células caliciformes de la conjuntiva han sido destruidas. Tales casos a veces todavía producen lágrimas, pero sin moco el epitelio corneal desprende las lágrimas y continúa seco (42).

7) ULCERAS CORNEALES PERIFERICAS

Infiltrados y úlceras marginales

La mayor parte de las úlceras corneales marginales son benignas aunque extremadamente dolorosas y suelen ser consecutivas a conjuntivitis bacterianas agudas o crónicas, sobre todo a blefaroconjuntivitis estafilocócica y por *Moraxella* o *Haemophilus aegyptus*.

Los infiltrados y úlceras corneales generalmente son superficiales, iniciándose en forma de infiltrados ovalados o lineales, con mucha frecuencia múltiples, que después pueden ulcerarse y vascularizarse; pueden acompañarse de dolores neurálgicos en cara y cabeza. En ocasiones curan con rapidez, pero recidivan de la misma manera.

Debe diferenciarse esta enfermedad, antiguamente conocida como "úlceras corneal catarral", de la queratitis herpética marginal. Puesto que la queratitis herpética marginal por lo general es casi asintomática debido a la anestesia corneal que produce, no resulta difícil, pues, diferenciarla de la úlcera marginal dolorosa producida por hipersensibilidad (42).

Úlceras anulares

Las úlceras anulares son raras pero más destructivas que las úlceras marginales. En ocasiones se deben a confluencia de múltiples úlceras marginales, pero también se han observado en personas ancianas y en el período convalescente de enfermedades infecciosas y como una complicación de la enfermedad autoinmunitaria. A veces es causa de necrosis total de la córnea (42), (41).

Úlcera de Mooren

También llamada úlcera serpiginosa crónica, es una úlcera marginal de origen autoinmunitario, unilateral en el 60 a 80% de los casos, que se caracteriza por excavación progresiva dolorosa del limbo y de la córnea periférica. Se suele observar en viejos y se acompaña de dolor neurálgico intenso y persistente lagrimeo. La lesión excava el epitelio y la lámina superficial en el lado invasor produciendo un borde sobresaliente blanquecino, mientras la base se vasculariza rápidamente (42), (41).

Queratoconjuntivitis flictenular

Es una enfermedad de hipersensibilidad (debida a hipersensibilidad retardada a productos bacterianos, principalmente del bacilo tuberculoso humano). El padecimiento es esencialmente conjuntival, y en caso de afectarse la córnea, en realidad está enfermo su componente conjuntival, epitelio y capas superficiales subyacentes.

Las flictenas son acúmulos localizados de linfocitos, monocitos, macrófagos y neutrófilos. Aparecen primero en el limbo, pero en los ataques recurrentes puede afectar a la conjuntiva bulbar y a la córnea (42). Las flictenas corneales son infiltrados localizados que producen mucho dolor y que pueden reabsorberse sin destrucción de las capas superficiales del estroma; sin embargo, el epitelio se destruye con

rapidez y la superficie descubierta se infecta fácilmente, de ordinario por estafilococos, produciéndose una úlcera superficial. La úlcera puede profundizarse rápidamente y perforarse, aunque ésto es poco común. También puede desarrollar como complicaciones una úlcera fascicular, úlcera anular y pannus flictenular (41).

Queratitis marginal y enfermedad autoinmunitaria

La conjuntiva perilímbica parece jugar un importante papel en la patogénesis de las lesiones corneales originadas por enfermedad ocular local o por padecimientos generales, particularmente los de origen autoinmunitario. Hay una notable similitud entre la red capilar límbica y la de los glomérulos renales, depositándose en las membranas basales endoteliales de los capilares de ambas redes complejos inmunitarios que producen la enfermedad inmunitaria (42).

Así pues, la córnea periférica suele participar en enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoidea, poliarteritis nodular, lupus eritematoso diseminado, esclerodermia, granulomatosis de Wegner, colitis ulcerosa, enfermedad de Cronh, psoriasis, policondritis recurrente y síndrome de Reiter. Estas enfermedades característicamente se acompañan de infiltración, ulceración, adelgazamiento, y, raras veces, perforación de la córnea periférica. La gravedad de las lesiones corneales varía desde benigna hasta la perforación y pérdida del ojo (42).

8) ULCERAS CORNEALES DEBIDAS A LA DEFICIENCIA DE VITAMINA A

Estas úlceras se presentan en personas desnutridas con deficiencia de Vit A, siendo de localización central y bilateral. Los cambios corneales y conjuntivales por déficit de Vit A se conocen como xeroftalmía; la conjuntiva se queratiniza y se seca, apareciendo las manchas xeróticas triangulares de Bitot, y la córnea se hace gruesa e insensible, se resblandece y se necrosa (de ahí el término "queratomalacia"), y con frecuencia se perfora (42), (41).

9) ULCERAS ATEROMATOSAS

Se observa en leucomatosis densa vieja, especialmente en casos que han sufrido cambios degenerativos con la formación de depósitos

hialinos o calcáreos. Tales cicatrices tienen poca vitalidad y los depósitos actúan como cuerpos extraños.

Ceden rápidamente a las infecciones, por lo que una vez iniciada la ulceración avanza rápida y profundamente con pocos o ningún signo de reparación; la perforación suele ir seguida de panoftalmía (41).

10) ACNE ROSACEA

Esta afección se observa generalmente en mujeres maduras, pudiendo haber un queratitis asociada con gran irritabilidad y lagrimeo. Además de la conjuntivitis mucopurulenta, aparecen en la córnea infiltrados blanco amarillentos y pequeñas úlceras que siempre se vascularizan. Son muy rebeldes y por lo general recidivan. En los casos graves hay además iritis (41).

11) QUERATITIS NEUROPARALITICA

Si el nervio trigémino que inerva la córnea es lesionado por traumatismos, cirugía, tumores, inflamaciones u otras causas, se producirá la pérdida de la sensibilidad corneal, una de sus mejores defensas contra la degeneración, ulceración e infección (42). Es probable que la enfermedad se deba a cambios irritativos y metabólicos en los nervios degenerados o en sus cercanías. El empeoramiento de la enfermedad por exposición y su mejoría por protección indican que la falta de reflejo palpebral desempeña un papel importantísimo en su etiología, como lo hace también, con toda probabilidad, la desecación corneal (41).

Lo característico de la queratitis neuroparalítica es la descamación del epitelio corneal. La superficie corneal se pone opaca y el epitelio se desprende. La sustancia propia se torna opaca, dando origen a una gran úlcera, casi siempre acompañada de hipopión. No hay dolor debido a la anestesia corneal, y si el caso no se atiende con rapidez, puede sobrevenir una gran perforación.

12) QUERATITIS POR EXPOSICION

Puede aparecer en cualquier condición en que la córnea no esté humedecida ni protegida por los párpados adecuadamente, como por ejemplo en el exoftalmos, el ectropión, la ausencia de una porción de párpado

como resultado de traumatismos y por imposibilidad de cerrar los párpados en forma apropiada, como en la parálisis de Bell. Los factores que intervienen son la resequedad corneal y su exposición a traumatismos de poca intensidad, pudiendo haber una ausencia del reflejo palpebral y un cierre defectuoso de los párpados durante el sueño.

El epitelio de la córnea así expuesto se deseca y posteriormente se descama permaneciendo estéril a menos que se presente una infección secundaria (42).

13) FOTOFTALMIA

La fotoftalmía causado por rayos ultravioleta, especialmente de 290 a 311 nm, produce una descamación del epitelio que causa erosiones múltiples y se caracteriza clínicamente por dolor intenso, lagrimeo, fotofobia, blefarospasmo y edema de la conjuntiva palpebral.

La fotoftalmía es el cuadro clínico más frecuente en relación a las lesiones oculares debidas a las radiaciones ultravioletas, siendo la lesión corneal el resultado final para la mayoría de las radiaciones de longitudes de onda inferior a los 320 nm.

Las radiaciones ultravioletas presentan período de latencia y efecto acumulativo, produciendo especialmente 4 tipos de reacciones características:

- 1.-Inhibición de la mitosis, tras pequeñas dosis de radiación.
- 2.-Fragmentación nuclear, tras altas dosis, implicando una destrucción celular.
- 3.-Reacción eosinofílica.
- 4.-Pérdida de la capa epitelial, debido a la pérdida de la cohesión con la capa inferior; esto ocurre con todo el epitelio que acaba por desprenderse y caer, distinguiéndose este proceso de la exfoliación porque es este último se produce una muerte celular como consecuencia de la fragmentación nuclear.

Después de una exposición no muy intensa, los cambios abióticos pueden detenerse en cualquier estado y las células volver a la normalidad.

El fenómeno de emigración celular para cubrir los pequeños defectos

epiteliales no parece alterarse en su intensidad, en relación con el tiempo (Montero J, 1980) (43).

En general, la mayoría de las bandas de radiación ultravioleta con actividad biótica, corresponde a la máxima absorción por núcleo/proteínas (265 milimicras), o albúminas y globulinas (280 milimicras).

El umbral de exposición para una radiación capaz de lesionar la córnea del conejo es de 15 mJ/cm^2 , con el máximo de sensibilidad localizado en los 288 nm (43).

2.-FACTORES DEMOGRAFICOS Y PREDISPONENTES EN LA ULCERA CORNEAL

Musch y cols. en 1983 (Musch DC, Sugar A y Meyer R, 1983) (44), realizaron un estudio durante un período de seguimiento de 6 años y establecieron que las causas de úlceras corneales fueron las siguientes (Tabla 7):

Causa	Nº (%)
Bacteriana	35 (35)
Postherpética	17 (17)
Postraumática	8 (8)
Neurotrófica	5 (5)
Fúngica	3 (3)
Neuroparalítica	2 (2)
Misceláneas	12 (12)
Desconocida	18 (18)

Tabla 7.- Causas de úlceras corneales (Musch DC y cols.) (44)

Encontrando que la etiología bacteriana era la causa más frecuente de provocación de úlceras corneales. En las causas misceláneas se incluyen úlceras estériles asociadas con síndromes (Sjögren y Steven Johnson), alteraciones anatómicas (exoftalmos y lagofthalmos), inflamaciones (blefaritis y queratitis) y quemaduras alcalinas.

Los organismos aislados de estas úlceras corneales bacterianas se muestran en la Tabla 8, observándose una incidencia mucho más elevada de cocos Gram +, y en especial del estafilococo aureus, coincidiendo con el estudio realizado por Asbell y Stenson (Asbell P y Stenson S, 1982) (45), quienes observan que hay una gran diferencia en la frecuencia de patógenos

en diferentes lugares dentro de un mismo país y que la mayoría de las lesiones marginales fueron causadas por estafilococos, mientras que las úlceras por Moraxella, Pseudomonas y Neumococos estaban localizadas más centralmente. Las úlceras complicadas y con hipopión o perforación, fueron más comunmente producidas por Gram -, teniendo la Moraxella la incidencia individual más alta en su estudio (Tabla 9), encontrándose esta infección casi exclusivamene en pacientes malnutridos.

Organismos	nº (%) de aislamientos
Cocos Gram positivos	21 (55,3)
Estafilococo aureus	9 (23,7)
Estreptococo pneumoniae	4 (10,5)
Estafilococo epidermidis	4 (10,5)
Estreptococo β -hemolítico grupo A	2 (5,3)
Enterococo	2 (5,3)
Cocos Gram negativos	2 (5,2)
Neiseria	1 (2,6)
Moraxella	1 (2,6)
Bacilos Gram negativos	15 (39,5)
Pseudomona aeruginosa	12 (31,6)
Serratia marcescens	2 (5,3)
Haemophilus influenzae	1 (2,6)
Nº total de aislamientos	38 (100)

Tabla 8.- Organismos aislados en úlceras corneales bacterianas (Musch DC y cols.) (44).

Organismo	Localización			
	Central	Periférica	Hipopión	Perforación
Todo en conjunto, %	51	49	19	2,8
Organismos Gram positivos, %	42	58	11	2,5
Organismos Gram negativos, %	71	29	33	3,5
Estafilococos, %	37	63	8	2,1
Moraxella, %	77	23	40	4,9
Pseudomonas, %	69	31	24	2,6
Neumococos, %	67	33	23	0

Tabla 9.- Características clínicas de las úlceras corneales (Asbell P y Stenson) (45).

Los factores oculares predisponentes se encontraron en una mayoría de casos, y la frecuencia de los factores identificados están expuestas en la Tabla 10 (44):

Condiciones oculares predisponentes	% de pacientes
Trauma	49
postcirugía	15
lentes de contacto	11
abrasión aguda	10
penetración/laceración	5
quemaduras térmicas	3
inespecífico	5
Enfermedades corneales	42
queratitis herpética	18
queratitis seca	8
queratopatía bullosa	7
otras queratitis	6
anestesia	3
Obstrucción lagrimal	4
dacriocistitis	2
inespecífica	2
Entropión	4
espástico	1
cicatricial	1
inespecífico	2
Exoftalmos	4
Enfermedades conjuntivales	8
síndrome de Sjögren	5
síndrome de Stevens-Johnson	2
xeroftalmía	1
Blefaritis	2
Lagoftalmos	2

Tabla 10.- Frecuencia de los factores oculares predisponentes (Musch DC y cols) (44).

También se encontraron los siguientes factores químicos o farmacológicos potencialmente predisponentes (44):

- terapia corticosteroidea (11%)
- abuso anestésico (3%)
- radioterapia (2%)
- quemaduras alcalinas(1%)
- reacciones tóxicas a fármacos (1%)
- con menor frecuencia: exposición a antimetabolitos, antibióticos o cauterización química.

Los factores sistémicos o psicosociales incluyeron (44):

- diabetes (8%)
- artritis reumatoidea (8%)
- discrasias sanguíneas (4%)
- alcoholismo (3%)
- exantemas agudos (1%)
- diátesis alérgica (1%)
- estados comatosos moribundos (1%)
- otros factores con menor frecuencia: acné rosácea, adición a drogas, malnutrición, prematuridad, psicosis y deficiencia vitamínica.

La existencia de distintos picos en las edades de distribución en las úlceras corneales incitan a evaluar la frecuencia de los factores predisponentes en los pacientes y las edades correspondientes (44) (Fig. 14).

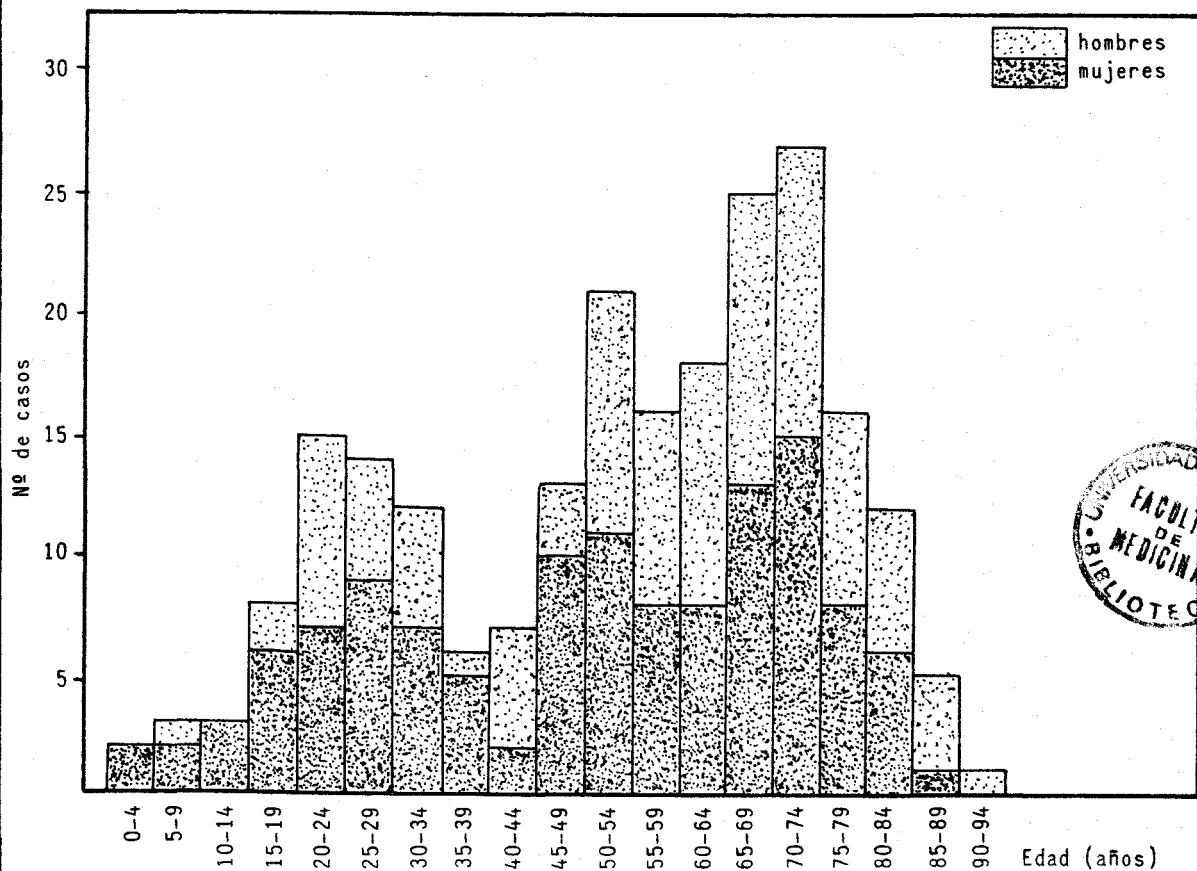


Fig. 14.- Distribución de la edad y el sexo de los pacientes con úlceras corneales. (Musch DC y cols.) (44).

El factor predisponente más prevalente en los hombres de 20 a 29 años de edad fue el trauma ocular (abrasión aguda y laceración o penetración), mientras que en las mujeres en este grupo de edad fueron el trauma ocular y la ulceración asociada con el uso de lentes de contacto.

El pico de edad correspondiente a los 65-74 años incluye pacientes con factores predisponentes, ej.: complicaciones postquirúrgicas, queratitis herpética, queratopatía bullosa o entropión cicatricial (44).

Aunque el número de casos disminuye progresivamente después de los 75 años de edad, puede deberse a la disminución de la población en estas edades.

Mientras no se observa un exceso de mujeres con respecto a hombres que padecen úlceras corneales, el trauma ocular agudo (abrasión, laceración, penetración o quemaduras térmicas), fue un factor predisponente en 16 pacientes menores de 45 años, de los que 14 fueron hombres ($p=0,004$). Esto refleja un mayor riesgo en varones para la injuria traumática del ojo en situaciones ocupacionales y/o recreativas (44).

El uso de lentes de contacto se ha extendido en la población y con ello las complicaciones de su uso. Aunque la mayoría de las complicaciones son menores y no representan una amenaza para la visión o para la integridad del ojo, la queratitis bacteriana fúngica es una excepción y representa la complicación más seria del uso de lentes de contacto.

Galentine y cols. (Galentine PG, Cohen EJ, Laibson PR, Charles PA, Rollande M y Arentsen JJ; 1984) (46), en un reciente estudio de 322 casos de queratitis ulcerativa, observó que 56 casos (17%) estaban asociadas con el uso de lentes de contacto. El 52% de las úlceras asociadas con lentes de contacto tuvieron cultivo positivo, siendo la *Pseudomona* el germen más frecuentemente aislado, presentándose en el 20% de los casos.

Las úlceras asociadas con lentes de contacto fueron observadas más frecuentemente en aquellos que usaban lentes blandas (86%) y en aquellos con lentes afáquicas (57%), ya que en el paciente afáquico las lentes de contacto eliminan enormemente los problemas ópticos (46).

En animales deficientes de Vitamina A, los cambios en la córnea son secundarios a la invasión bacteriana (Sendele DD, Kenyon KR, Wolf

G y Hannine LA; 1982) (47).

El papel de la deficiencia de la Vit A en el desarrollo de la xeroftalmía está bien establecido. Sin embargo, la deficiencia de Vit A sólo, sin deplección proteica o trauma se considera insuficiente para producir la queratomalacia, pero estas córneas tienen un mayor riesgo para ulcerarse si son expuestas al medio ambiente u otra injuria (47).

Estudios microscópicos de córneas deficientes de Vit A revelaron desorganización en el epitelio y en el estroma. Las fibras de colágeno parecen ser degradadas, dejando restos de fibras amorfas y observándose una abundancia de bacterias en las capas epiteliales remanentes y en el estroma, siendo el estafilococo aureus y el estreptococo fecalis los patógenos más frecuentes cultivados de estos ojos ulcerados, demostrando una disminución en la regeneración epitelial y en la curación de la úlcera en estos animales (47).

3.-MECANISMOS DE REPARACION DE LAS ULCERAS CORNEALES

El trauma accidental o quirúrgico de una o todas las capas de la córnea ocasiona un aumento de la hidratación y pérdida de la transparencia. Debido a esto es necesaria la rápida y correcta cicatrización de las heridas para evitar la formación de escaras u opacidades de la córnea (leucomas). Sin embargo, las úlceras producidas por infección viral, bacteriana o micótica, o las que afectan a las capas profundas del estroma, pueden tardar semanas en cicatrizar. En forma similar, mientras que una laceración superficial de la córnea cicatriza rápidamente en 3 a 5 días, una laceración corneal profunda o una incisión quirúrgica tarda varias semanas en curar completamente.

la velocidad y el tipo de cicatrización de las heridas de la córnea vienen determinadas por los siguientes factores:

- localización anatómica de la herida de la córnea (central, paracentral o periférica)
- tamaño de la herida
- capa de la córnea afectada
- presencia o ausencia y tipos de suturas
- posible infección sobrañadida
- fármacos administrados tópicamente con fines terapéuticos (esteroides, antivíricos, etc.)

En síntesis, la respuesta citológica e histológica a una herida central de la córnea implica (5):

- 1) edema estromático
- 2) mitosis y desplazamiento de células epiteliales
- 3) migración de polimorfonucleares y monocitos
- 4) aparición de nuevos fibroblastos y mitosis
- 5) formación de precolágeno
- 6) formación de colágeno

Los cambios químicos asociados con la respuesta citológica implican:

- 1) hidratación inicial
- 2) aumento en la actividad de hidrolasas lisosómicas (glucosidasas, colagenasas, 5-nucleotidasas, oxidasas) (Weimar VI y Haraguchi KH, 1965) (48); (Weimar VL y Haraguchi KH) (49).
- 3) disminución en los niveles de mucopolisacáridos (queratán sulfato y condroitín sulfato)

Aproximadamente después de 4 semanas aparece un nuevo mucopolisacárido, que no se encuentra normalmente en la córnea del conejo, el dermatán sulfato (5). Tabla 11.

Estado	Respuesta citológica y tisular	Respuesta bioquímica e histoquímica
I	Edema estromal, mitosis en las células epiteliales	Edematización
II	Invasión estromal de polimorfonucleares y mononucleares	Incremento de la actividad de las hidrolasas: degradación de MPS y colágeno
III	Nuevos fibroblastos	Igual al II, más nueva formación de precolágeno; aparición de un nuevo MPS (dermatán sulfato)
IV	Colágeno	Formación de colágeno
V	Estroma cicatrizado	Actividad normal de las hidrolasas; concentraciones normales de MPS y colágeno

Tabla 11.- Cicatrización de la herida corneal (Waltman SR) (5).

La reacción de la córnea frente a las lesiones mecánicas o las infecciones es variable en cada uno de los segmentos del órgano, pero nosotros nos ceñiremos más concretamente a los mecanismos que acontecen en el epitelio corneal en los procesos de regeneración epitelial en el curso de la curación de la úlcera corneal, por ser éste el objeto de nuestro estudio y por la gran importancia que el epitelio desempeña en estos procesos.

El epitelio corneal representa la principal barrera protectora de la córnea subyacente frente a las toxinas; por ello, cuando se halla intacto las bacterias que se encuentran en el saco conjuntival no ofrecen generalmente peligro alguno, produciéndose las infecciones en casos de defectos epiteliales. Para que esta barrera protectora mantenga su integridad y funciones eficientemente ha de cumplir dos requisitos importantes:

- 1.-Mantener una capa intacta de células sobre la superficie corneal.
- 2.-Mantener una firme adhesión a la membrana basal y a la membrana de Bowman.

El epitelio posee una capacidad de regeneración extraordinaria. Cuando el epitelio corneal es objeto de lesión física o química, el proceso de curación de la herida producida se dirige primariamente hacia el restablecimiento de una continuidad del recubrimiento epitelial de la córnea, y más tarde se dirigirá hacia el desarrollo de una firme adhesión al tejido subyacente.

La reepitelización tiene lugar tanto desde la periferia como desde las células residuales ubicadas en el suelo del defecto. En el caso de abrasión total de la córnea, la regeneración comienza en los límites de la conjuntiva. Esta reepitelización puede producirse con gran rapidez, sin embargo, al principio el epitelio nuevo no tiene todavía capacidad de resistencia y sólo está integrado por una a dos capas celulares.

En la regeneración del epitelio corneal en respuesta inicial a la curación de las heridas de la córnea, se aprecian fundamentalmente dos procesos:

-el primero es el deslizamiento o "corrimiento epitelial", mediante el cual las células epiteliales vecinas al área denudada migran

rápidamente para cubrir el defecto epitelial. Es generalmente aceptado que la respuesta inicial en la curación de la herida corneal es la emigración de células epiteliales hacia el defecto. El modo de emigración de las células depende algo de la extensión y el tipo de úlcera provocada. Cuando se usa una fina aguja para producir la úlcera en la córnea, las células marginales se extienden emitiendo prolongaciones protoplasmáticas a modo de pseudópodos, alcanzando el defecto (Hanna Calvin, 1966) (50).

Las células basales epiteliales emigran hacia el cráter de la úlcera y lo rellenan por movimientos ameboides. Esta evidencia ha sido extrapolada indicando que las células epiteliales en el cráter de la úlcera son células basales en origen, siendo éstas en el cráter de apariencia esférica (50), (Hanna Can O'Brien JE, 1960) (51).

El proceso de deslizamiento epitelial comienza aproximadamente una hora tras la injuria y continúa hasta que el área desnuda es completamente cubierta por una monocapa de células epiteliales. Cada capa de célula epitelial participa suministrando células para cubrir un defecto de tamaño moderado, posiblemente por deslizamiento hacia la úlcera. (Fig. 15) (50).

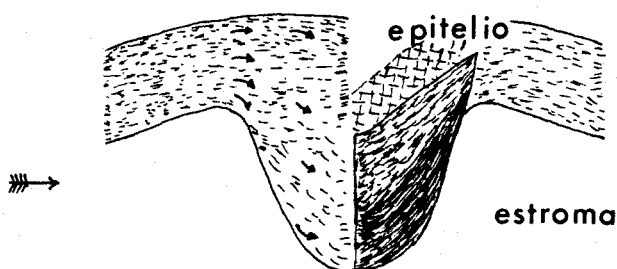


Fig. 15.- Representación gráfica del movimiento de las células epiteliales corneales hacia el cráter de la úlcera. Cada tipo celular, esto es, basal, intermedio y superficial, emigra hacia la úlcera de acuerdo con su posición inicial, como se indica por la flecha (Hanna Calvin) (50).

Cada célula, por aplanamiento de su morfología, puede cubrir varias veces su área normal, para que un pequeño defecto pueda ser reparado rápidamente, incluso sin multiplicación celular (Khodadoust AA, Silverstein AM, Kenyon KR y Dowling JE; 1968) (52), (Kuwabara T, Perkins DG y Cogan DG; 1976) (53).

-el segundo proceso generalmente aceptado en la curación de la herida corneal es la división celular, que rellena la pérdida de células mediante un incremento de la actividad mitótica, recobrando así la córnea su grosor habitual. Esta fase proliferativa comienza varias horas más tarde, generalmente en los dos capas más profundas del epitelio e incluso a alguna distancia del lugar del defecto, y se puede prolongar incluso hasta el 4º día, existiendo pues una disociación entre la migración y la proliferación celular en la curación de la herida corneal (50).

Mediante este recubrimiento epitelial no sólo se restaura su papel de barrera protectora, sino que también contribuye a la curación del estroma subyacente (50), (52).

Moses y cols. (Moses RA, Parkinson G y Schuchardt R; 1979) (54), aplicaron un método de cauterización de vapor de yodo a córneas de conejo, produciendo un área desnuda de epitelio aproximadamente circular y de tamaño uniforme, observando una muy rápida proporción media de curación de $1,42 \text{ mm}^2 / \text{hora}$, demostrando el hecho de que los dos ojos de un mismo conejo responden a una lesión estandar de forma más semejante y uniforme que ojos de diferentes conejos. (Fig. 16)

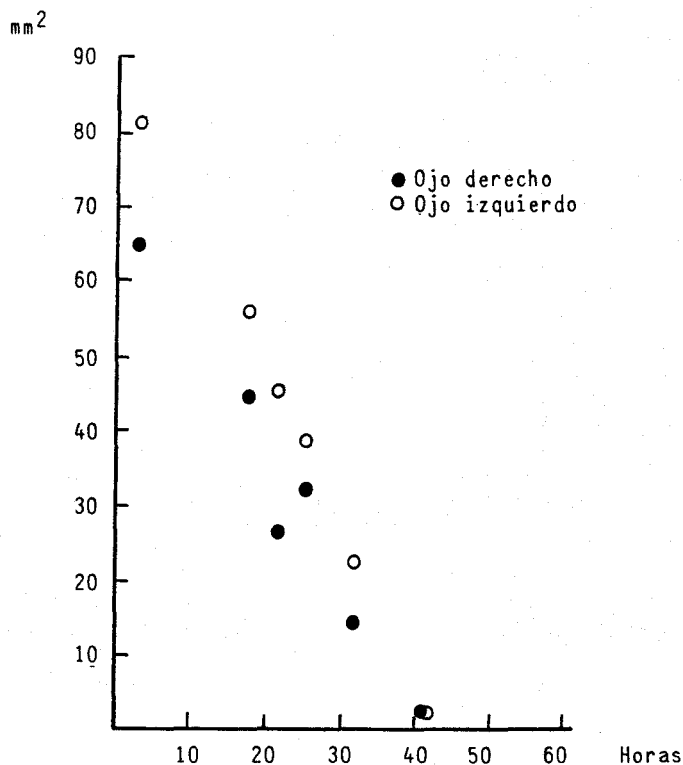


Figura 16.- Curación de dos córneas de un conejo. Las curvas de curación son aproximadamente lineales (Moses RA y cols.) (54).

La proporción media de curación en este estudio ($1,42 \text{ mm}^2/\text{hora}$), es más rápida que la proporción registrada por Tfoft y Friend (Thoft R y Friend J, 1977) (55), que fue de $1,0 \text{ mm}^2/\text{hora}$. Puede ser que la evitación de la injuria mecánica a la membrana basal por el procedimiento presente permita una curación más rápida.

La estructura papilar límbica sirve como un órgano generativo de las células epiteliales corneales. La capacidad generativa de la capa celular basal de la propia córnea es insuficiente para hacer frente a la pérdida de células de la superficie. Para completar este déficit, una parte de la población celular generativa se sitúa en el limbo (Davanger M y Evensen A, 1971) (56).

Aunque pequeños defectos epiteliales (de 2-3 mm de diámetro) puedan curar sólo con migración celular, la remoción de todo el epitelio corneal requiere una proliferación celular del epitelio conjuntival para cubrir y restaurar el epitelio corneal (Kinoshita S, Frien J y Thoft RA; 1983) (57).

Está bien establecido que las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del epitelio conjuntival son completamente diferentes de las del epitelio corneal. Así, histológicamente el epitelio conjuntival es más delgado y las células están mucho menos fuertemente unidas, con pocos desmosomas y hemidesmosomas, que en el epitelio corneal. Más notable, sin embargo, es la presencia de células caliciformes productoras de mucina y el potencialmente voluminoso suministro sanguíneo, ambas cosas totalmente desaparecidas en el epitelio corneal (55).

Estudios histoquímicos y bioquímicos muestran que, al contrario que el epitelio corneal que tiene grandes depósitos de glucógeno, el epitelio conjuntival tiene poco glucógeno. El epitelio conjuntival también tiene alta actividad de enzimas glucolíticos, ciclo de los ácidos tricarbónicos y enzimas de la cadena respiratoria, pero una relativamente baja actividad del shunt de las hexosas monofosfato; en contra, el epitelio corneal tiene un alto nivel de actividad de este shunt y un ciclo relativamente lento del ácido tricarbónico (55).

La metaplasia del epitelio conjuntival a epitelio corneal puede, por tanto, acompañarse de marcados cambios en la estructura y función de estos epitelios (Liu SH, Tagawa Y, Prendergast RA, Franklin RM y

Silverstein AM; 1981) (58).

El área del epitelio límbico es sólo aproximadamente el 24% de la del total de la córnea. Sin embargo, el cubrimiento total puede ser posible ya que las células emigrantes del epitelio se aplanan y se extienden muchas veces su tamaño original (Kinoshita S, Kiorpes TC, Friend J y Thoft RA; 1982) (59).

Precoces estudios sobre la curación de úlcera corneal descubrieron los cambios morfológicos y fisiológicos que tienen lugar cuando el epitelio conjuntival se desliza sobre la superficie corneal. Más recientemente, Thoft y Friend (55), han intentado correlacionar estos cambios bioquímicos en la célula epitelial y demostraron alteraciones en la actividad enzimática durante los procesos de metaplasia. Estos investigadores también han demostrado que el cambio metaplásico es aparentemente incompleto y que el epitelio "corneal" de origen conjuntival puede volver a la forma y función conjuntival bajo ciertas condiciones (58).

El epitelio regenerante de origen corneal muestra un incremento en la actividad de la hexoquinasa y aldolasa y una ligera disminución de la actividad láctico dehidrogenasa y glutatión reductasa un día después de la curación (55).

La curación desde el epitelio conjuntival se sigue de un deslizamiento de una simple capa de células y progresa a una capa de aspecto conjuntival cubriendo el estroma en 2-3 semanas. En este período de tiempo, el epitelio tiene 2-3 capas de espesor y contiene células caliciformes. En 6 semanas, sin embargo, las células caliciformes desaparecen y el epitelio parece ser corneal, lo que implica que el epitelio conjuntival puede transformarse en corneal en 5-6 semanas (55).

La transformación bioquímica puede no ocurrir tan rápidamente como la histológica. El deslizamiento de las células epiteliales en la regeneración usa glucógeno, y el déficit de glucógeno está asociado con la degeneración celular (55).

Así pues, las características del epitelio regenerado a partir de la córnea y de la conjuntiva bulbar tras una remoción mecánica o química del epitelio corneal, sugiere que hay marcadas diferencias entre

estos dos tipos de epitelio regenerado de la superficie ocular.

En suma a estas dos procedencias del epitelio para volver a cubrir la superficie de la córnea, hay una estrecha zona transicional entre el epitelio corneal y conjuntival que usualmente permanece después del debridamiento corneal. Este epitelio es histológicamente diferente del epitelio bulbar conjuntival y del epitelio corneal (59).

Se ha sugerido que incluso una pequeña cantidad de epitelio límbico puede recubrir la córnea y que el epitelio regenerado a partir del epitelio límbico tienen un aspecto histológicamente normal a las 2-3 semanas tras la injuria (59).

Kinoshita y cols. (59), describen tres tipos de epitelio en la superficie ocular y una marcada diferencia entre el epitelio regenerado de estos tres tipos cuando recubren una córnea totalmente desnuda. El epitelio regenerado del limbo actúa de forma semejante al epitelio regenerado de la córnea mejor que el de la conjuntiva bulbar. Este epitelio regenerado del limbo no muestra células caliciformes en ningún estado de la curación. Sin embargo, análisis bioquímicos indican que el epitelio regenerado del limbo no es idéntico al epitelio regenerado de la córnea ni de la conjuntiva bulbar. Por ejemplo, el contenido de glucógeno del epitelio regenerado de las células límbicas es intermedio entre el del epitelio regenerado de la córnea y de las células de la conjuntiva bulbar. Los análisis de las proteínas también muestran una diferencia entre los tres tipos de epitelio regenerado (59). (Tabla 12 y Fig. 17).

Origen del epitelio regenerado	Nº de muestras	Glucógeno*
Epitelio corneal	6	271,0 ± 8,7
Epitelio límbico	4	199,7 ± 31,3
Epitelio coonjuntival bulbar	8	116,1 ± 12,1
Epitelio corneal normal	14	273,9 ± 6,1
* promedio μM glucosa por gramo de peso de epitelio ± desviación típica		

Tabla 12.- Contenido de glucógeno en el epitelio regenerado de la superficie ocular 14 días después de la curación (Kinoshita y cols.) (59).

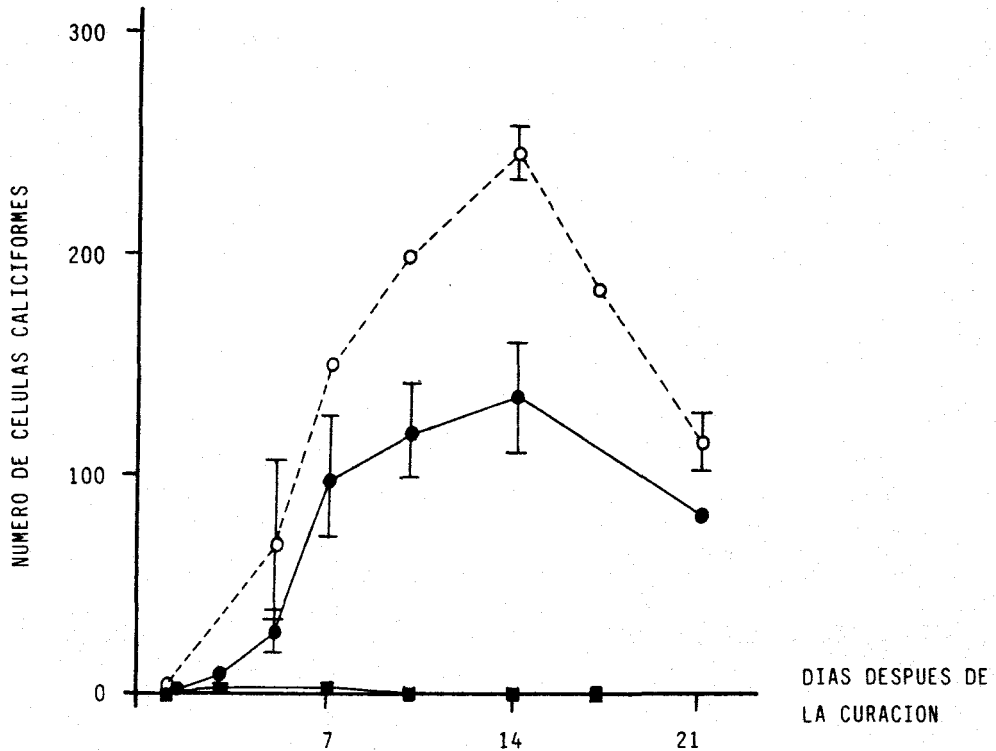


Fig. 17.—Recuento de células caliciformes del epitelio regenerado de la superficie ocular en la córnea después de la curación. El número total de células caliciformes es el correspondiente a una sección de la córnea del limbo al limbo en la zona de mayor diámetro. Se muestra el epitelio regenerado de origen limbico tras debridamiento mecánico (■), y el epitelio regenerado de origen conjuntival bulbar tras debridamiento mecánico (●) y mediante n-heptanol (○). Cada punto representa la media \pm E.S. (Kinoshita y cols.) (59).

La inmunoglobulina de secreción A es el principal componente de un sistema inmunológico que protege todas las superficies mucosas del cuerpo. Un estudio reciente realizado por Franklin y cols. (Franklin RM, Prendergast RA y Silverstein AM; 1979) (60), descubrió la inmunoglobulina de secreción en los anejos oculares del conejo, y aisló aquellas células oculares que producen componente secretor. Esta cadena polipeptídica está presumiblemente implicada en el pasaje transepitelial de la Ig A y es producida por las mismas células epiteliales. Estos estudios demuestran que el epitelio conjuntival produce componente secretor en abundancia y que está ausente en el epitelio corneal. Este especial polipéptido puede, por lo tanto, proveer un buen marcador para estudiar la metaplasia del epitelio conjuntival corneal.

Liu y cols. (58), usando este marcador, demuestran que las células del epitelio conjuntival pierden su componente secretor en 1 a 2 días tras el deslizamiento sobre la superficie corneal para curar una córnea desnuda. La pérdida de este marcador bioquímico es mucho más rápida que

la transición morfológica u otros tipos de marcadores bioquímicos que han sido descritos (55). También encuentran que:

- la ausencia de vascularización, aunque necesaria, puede no ser suficiente para inducir la metaplasia del epitelio.
- la naturaleza del epitelio de la superficie ocular puede jugar un papel regulador en la proliferación vascular.

El punto más significativo es que aparentemente el cambio de epitelio conjuntival a epitelio corneal en la regeneración de una córnea totalmente desnuda es incompleto, y así las células conjuntivales alteradas no manifiestan, al menos hasta las 6 semanas, funciones idénticas a las células del epitelio corneal. A pesar del cambio a la morfología corneal aparentemente típica, la pérdida de función del gen que controla la producción del componente secretor y la obtención de niveles corneales de algunas sustancias como el glucógeno y láctico-dehidrogenasa, está claro que todas las células del epitelio de origen conjuntival prontamente retroceden hacia la forma y función conjuntival tras la neovascularización, mientras que esto no ocurre en las células epiteliales corneales (58).

Estos diferentes resultados sugieren que el proceso de la metaplasia no es brusco, sino que puede implicar una expresión o represión secuencial de los diferentes genes (58).

Durante esta reepitelización corneal desde la conjuntiva, Shapiro y cols. (Shapiro MS, Friend J y Thoft RA; 1981) (61), identificaron 5 distintos estados de transdiferenciación morfológica (Fig. 18):

- Estado 1.-inmediatamente después de la curación, el epitelio consiste en 2-3 capas de células escamosas sin que se aprecien células caliciformes.
- Estado 2.-en los siguientes 10 días el epitelio se adelgaza a 1-2 capas y aparecen células caliciformes.
- Estado 3.-las células caliciformes alcanzan una distribución uniforme a través de la córnea.
- Estado 4.-posteriormente retroceden hacia el limbo.
- Estado 5.-dejando un epitelio de 5-6 capas con aspecto morfológico normal.

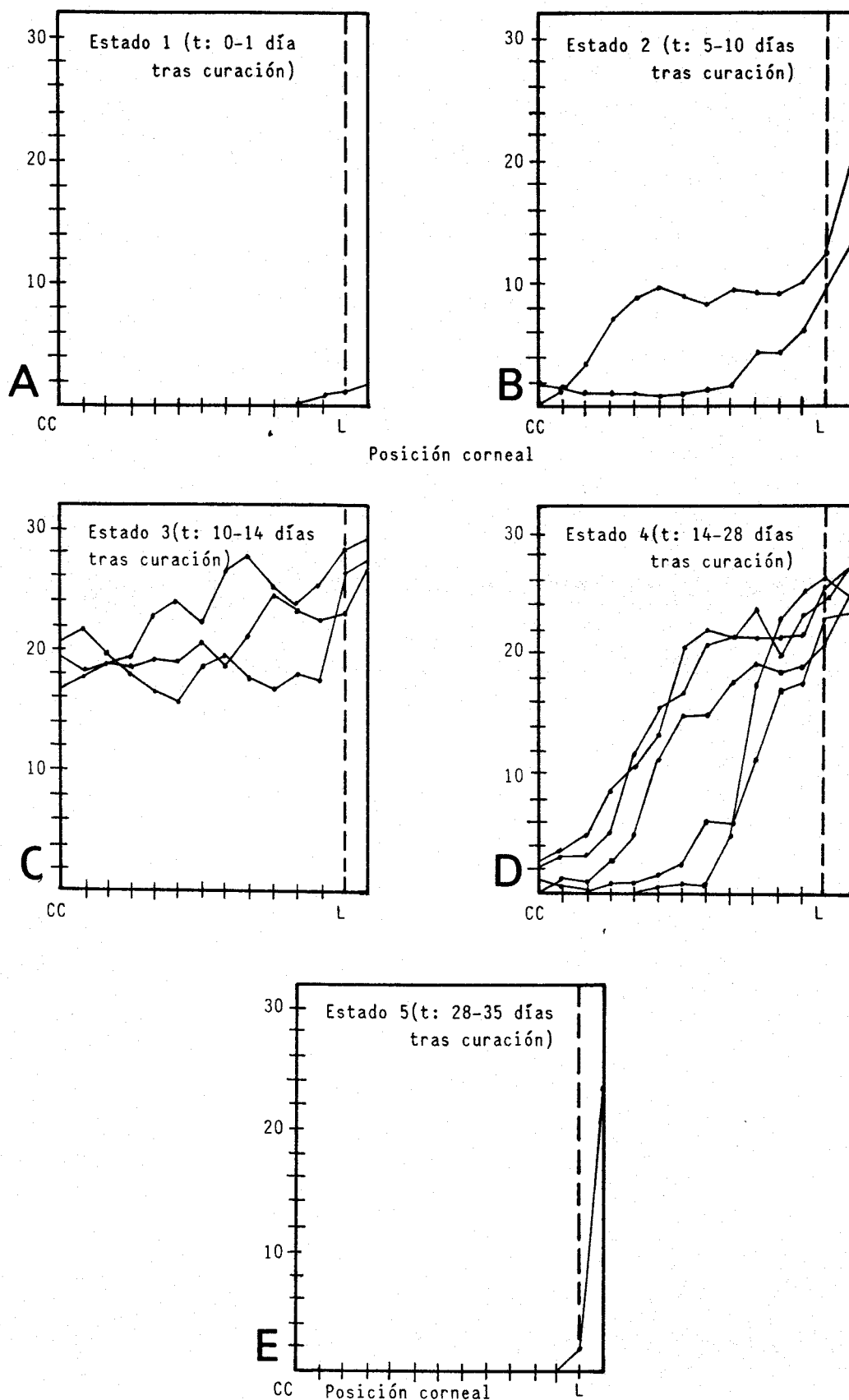


Figura 18.- Poblaciones de células caliciformes en la córnea durante los estados 1 a 5 de la transformación del epitelio conjuntival. El número de células caliciformes depende de la posición corneal y del tiempo tras la curación (de 0 a 35 días tras el cierre de la úlcera corneal). La abscisa representa la distancia desde el centro de la córnea (CC) al limbo (L, marcado por una línea vertical discontinua). Los valores de la línea vertical derecha son el número de células caliciformes en las 630 μ m de la conjuntiva inmediatamente periférica al limbo (Shapiro MS y cols.) (61).

Posteriormente, Kinoshita y cols. (57), demostraron que durante esta transdiferenciación conjuntival en corneal, hay una relación inversa entre el número de células caliciformes y la proporción de mitosis celulares. Así, durante el estado 1, donde hay una alta proporción de mitosis celulares y células deslizándose para cubrir el defecto, hay pocas células caliciformes. En el estado 2 hay un aumento en el número de células caliciformes a medida que disminuye el número de células en mitosis. Posteriormente, durante el estado 3 hay un gran número de células caliciformes y la proporción de mitosis del epitelio es más baja que en el epitelio corneal normal. En el estado 4, la desaparición de células caliciformes está asociada con otro aumento de actividad mitótica en las células. Finalmente, en el estado 5 el aspecto morfológico y la proporción mitótica son como las del epitelio corneal normal (Fig. 19) (57).

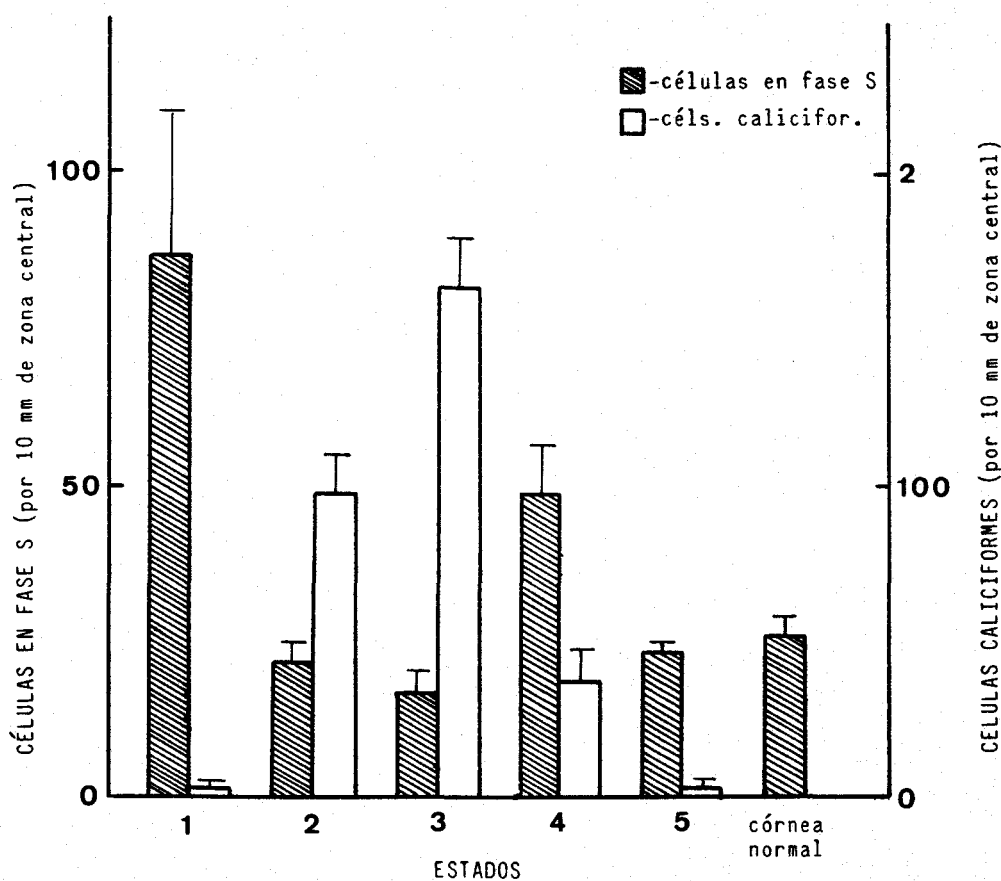


Fig. 19.-Frecuencia de células en fase S y de células caliciformes del epitelio conjuntival regenerado en la córnea. Las barras indican el error estandar de la media (Kinoshita y cols.) (59).

Así pues, hay una relación inversa entre el número de células caliciformes y la proporción de mitosis. Este dato implica que la alta proporción inicial de replicación celular está asociada con la curación inicial del epitelio regenerado, mientras que el segundo aumento de la mitosis está asociado con la transdiferenciación histológica del epitelio conjuntival en corneal, transdiferenciación que puede ser esencial para la regeneración del epitelio (57).

Toft y Friend (Toft R y Friend J; 1983) (62), desarrollaron la hipótesis X,Y,Z sobre el mantenimiento del epitelio corneal. Según estos autores, la masa del epitelio corneal probablemente no cambia bajo circunstancias normales. Como se muestra en la Fig. 20, la masa celular epitelial puede ser considerada como el resultante de 3 fenómenos independientes. Así, "X" corresponde a la proliferación de las células basales epiteliales; "Y", a la contribución de la masa celular por movimiento centrípeto de las células periféricas, y "Z", a la pérdida de las células epiteliales de la superficie. Según esta hipótesis, el mantenimiento del epitelio corneal puede ser definido mediante la ecuación $X + Y = Z$, en la que la pérdida celular puede estar en equilibrio por el reemplazamiento celular.

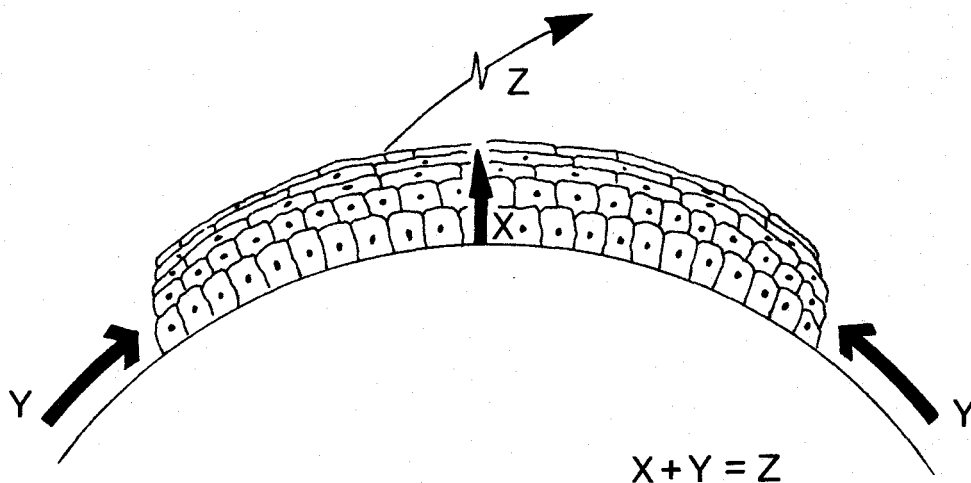


Fig. 20.- La hipótesis X, Y, Z de mantenimiento del epitelio corneal (Toft y Friend) (62).

La presencia del componente "X", ha sido establecida marcando las células epiteliales con timidina tritiada (H^3), identificando la activa división de las células basales.

El componente "Y", es un lento movimiento centrípeto que ocurre incluso en ausencia de un defecto corneal agudo. Es importante no confundir el componente "Y" con otro fenómeno: el rápido movimiento de

células periféricas en respuesta a un defecto corneal central agudo. Este componente se ha medido utilizando marcadores específicos y se ha comprobado que esta proporción de migración celular es sólo 1/10 de la observada en la parte periférica de las córneas reparando un defecto epitelial (Buck RC, 1985) (63).

El componente "Z", correspondería a la pérdida de células desde la superficie. Esta pérdida ocurre de modo incrementado en casos especiales de fallo de adhesión del epitelio al estroma en algunas condiciones anormales.

Utilizando la hipótesis X,Y,Z, es posible categorizar las enfermedades y las terapias de acuerdo al componente específico implicado. Así, una enfermedad epitelial puede ser el resultado de una inadecuada producción celular basal (disminución de "X"), deficiente movimiento celular centrípeto (disminución de "Y"), o una pérdida celular aumentada (aumento de "Z"). Identificando los procesos biológicos anormales, la terapia se dirigirá a corregir el componente anormal y los esfuerzos terapéuticos podrían separarse en aquellos que afectan la proliferación celular basal (ej. mitógenos o cambios en los niveles de AMP cíclico), aquellos que afectan el movimiento celular centrípeto (ej. transplatación conjuntival) y aquellos que afectan la pérdida celular (ej. medidas protectivas, como lentes de contacto blandas) (62).

Para completar el proceso de la reepitelización de la zona ulcerada se requiere la firme adhesión del epitelio al tejido corneal subyacente.

Cuando el epitelio corneal está expuesto a injuria física o química los procesos de curación de la úlcera se dirigen primeramente al restablecimiento de la continuidad del epitelio para cubrir la córnea, y sólo después hacia el desarrollo de una estrecha adhesión con el tejido subyacente.

Esta fase del proceso de curación, la de la estrecha unión del epitelio formado con los tejidos subyacentes, es de gran importancia en la patogénesis de algunas enfermedades, como la erosión corneal recurrente. En esta condición clínica, el epitelio es aparentemente capaz de regenerar normalmente y cubrir las úlceras, pero por algunas razones falla en recobrar su normal adhesión al tejido subyacente, produciendo erosiones corneales recurrentes en el sitio inicial de la injuria.

Cuando la córnea de conejo es denudada mecánicamente mediante raspado, las fuerzas de adhesión son tales que las células basales se rompen transversalmente y sus remanentes permanecen unidos a la membrana basal. Las nuevas células epiteliales que migran hacia el área ulcerada aparentemente reutilizan la antigua membrana basal, pero sin formar inmediatamente una estrecha unión con ella; así se observa que el epitelio recientemente regenerado puede ser fácilmente levantado en forma de laminilla donde se produjo la desepitelización, pero se desgarró donde el epitelio no había sido lesionado. Después del período de 2-3 días tras el recubrimiento del área denudada, la adhesión de la capa epitelial a su membrana basal puede ser comparada con la de una córnea normal (52).

En el epitelio corneal normal, la adhesión célula-célula y célula-membrana basal son tan fuertes que el raspado mecánico produce un rotura de las células basales, mejor que la separación de sus capas. Cuando se interrumpe la adhesión del epitelio a la membrana basal, la adhesión célula-célula es lo bastante fuerte (incluso en las monocapas epiteliales) para soportar el levantamiento de la capa intacta de las células epiteliales. Esto es lo más sorprendente cuando se considera la muy rápida rotura y su separación de la unión célula-célula que puede estar implicada cuando las células epiteliales se deslizan una sobre otra para efectuar la precoz curación de la úlcera (52).

Sin embargo, cuando son removidos el epitelio, la membrana basal y las fibras superficiales del estroma, mediante una queratectomía superficial, es necesario la formación de una nueva membrana basal por las células epiteliales regeneradas, para la restauración de una adhesión epitelial normal, requiriendo este proceso varias semanas (52).

Por lo tanto, la membrana basal juega un importante papel en la adhesión del epitelio corneal al estroma. La rapidez en que es restablecida la adhesión normal depende del grado de extensión en que haya sido implicada la membrana basal en los procesos de ulceración.

La cauterización térmica de córneas en monos produce un retraso en la curación epitelial, cicatrización del estroma y neovascularización periférica. El restablecimiento de la firme adhesión del epitelio regenerado a la membrana de Bowman requirió un tiempo aproximado de 6 semanas. Estudios con microscopía electrónica revelan que la membrana basal parece estar relativamente intacta después de la cauterización, pero

desaparece en una semana. La regeneración de nuevos complejos de membrana basal empieza a partir de una semana con la aparición de pequeños segmentos discontinuos con hemidesmosomas y, similarmente, requirió aproximadamente 6 semanas para la completa restauración, observándose que la regeneración de la membrana basal corre paralela en el tiempo con la restauración de la firme adhesión entre el epitelio y la membrana de Bowman (15).

Produciendo una quemadura química de la córnea del macacus mediante ácido sulfúrico, Hirst y cols. (Hirst LW, Fogle JA, Kenyon KR y Stark W; 1982) (64), observaron que aunque la membrana basal original permanece "in situ" tras la quemadura, la adhesión epitelial se retrasó a 8 semanas en las quemaduras centrales. Esto está en contra a la rápida utilización de la membrana basal original para la curación corneal en el conejo tras el raspado epitelial y el restablecimiento de la firme adhesión en una semana, como describió Khodadoust y cols. (52). La persistencia prolongada de esta membrana basal inservible funcionalmente puede explicar el retraso en la formación de la nueva membrana basal con concomitante retraso de la readhesión epitelial. Una posible causa que contribuye a la pobre adhesión epitelial es este modelo es el suave, pero persistente, edema estromal como un resultado del daño endotelial (64).

En las quemaduras anulares (de la misma área que las centrales), hubo una rápida cobertura epitelial en 2 días o menos, y una inmediata y firme adhesión del epitelio, con reutilización de la membrana basal existente. La velocidad de cobertura epitelial en las series de úlceras anulares fue posiblemente aumentada por la mayor longitud de los bordes del epitelio regenerante; la falta total de vascularización, la ausencia de infiltrado inflamatorio y el mantenimiento de una membrana de Bowman normal, podrían ser también factores en este tipo de quemaduras. Finalmente, la posible protección del endotelio corneal por el espesor aumentado de la córnea periférica, explicarían la ausencia del edema corneal (64).

4.-FACTORES RELACIONADOS CON LA REPARACION DE LA ULCERA CORNEAL

En quemaduras alcalinas con NaOH 4N en córneas de conejos, se produce un úlcera que es recubierta completamente por epitelio e 3 a 5 días tras la quemadura; después, sin embargo, se desarrolla un

persistente defecto epitelial seguido de ulceración estromal.

La ulceración corneal tras quemadura alcalina se sigue del fracaso del progreso de la curación de la úlcera, habiendo una fase de desbridamiento proteolítico relacionado con un defecto epitelial persistente. Parece probable que el activador del plasminógeno (AP) sistema plasmina inicia la destrucción estromal y la reparación (ej. vascularización) tras quemadura alcalina. Sin embargo, todavía no se comprende la relación que existe entre los mediadores implicados en la destrucción estromal y un defecto epitelial persistente (Berman M, Leary R y Gaje J), (65).

La remoción por raspado del epitelio en la córnea normal de conejo da como resultado la aparición en la superficie estromal de fibrina (fibrinógeno) o fibronectina. Esto sugiere así la posibilidad de que algunas macromoléculas también serían polimerizadas en la superficie estromal tras quemaduras alcalinas, y que la reepitelización corneal puede implicar interacción entre el epitelio y una matrix subyacente de fibrina-fibronectina durante el recubrimiento corneal. Por lo tanto, la fibrina y fibronectina, presumiblemente derivadas por extravasación de los vasos sanguíneos del limbo, aparecen en la superficie anterior del estroma tras una quemadura alcalina y la ulceración está relacionada con un defecto epitelial persistente, la aparición de activador del plasminógeno (AP) en la superficie estromal y con la pérdida de fibrina y fibronectina subepitelial (Berman M, Manseau E, Low M y Aiken D; 1983) (66).

Las células epiteliales corneales fibrinolíticamente activas, pueden ayudar en la reparación del tejido suministrando a la superficie de la córnea avascular con suficiente activador del plasminógeno, previniendo el depósito excesivo o permanente de fibrina por la exudación tras la injuria (66).

El hecho de que el epitelio de una úlcera corneal por quemadura alcalina libera AP (65), de que la plasmina se sabe que es capaz de degradar la fibrina y la fibronectina, y la corriente observación de que la fibrina subepitelial y la fibronectina aparentemente son reabsorbidas en regiones en que se localiza el AP, podrían sugerir que el AP inicia el sistema que media la desaparición de fibrina y fibronectina. Aunque no se han hecho ensayos directos de la producción de AP por células

adyacentes al defecto, se ha hipotetizado que el AP es segregado crónicamente por las células epiteliales próximas al defecto y, quizás, en respuesta a la fibrina y fibronectina que son polimerizadas continuamente en la superficie estromal de las úlceras profundas (66).

Tras una quemadura alcalina, en presencia de un defecto epitelial persistente y después de que la membrana basal subepitelial haya sido degradada, el proceso AP/plasmina dependiente podría, en esta hipótesis, iniciar también los sucesos que conducen a la destrucción estromal y la reparación eventual.

La fibrina y fibronectina que aparecen en la superficie estromal tras la injuria por raspado desaparece gradualmente en varias semanas tras el cierre completo del defecto epitelial.

Se ha publicado que la fibrina estimula la secreción de AP en varios sistemas y que la presencia continua de fibrina/fibronectina puede estimular a las células epiteliales corneales a la secreción de AP crónicamente. Aunque quizás no se requiera para la reepitelización, se puede sugerir que el sustrato fibrina/fibronectina sería necesario para la formación de estructuras adhesivas, tipo hemidesmosomas, entre el epitelio y el estroma anterior (66).

Después de quemaduras alcalinas, la fibrina y fibronectina aparentemente son reabsorbidas mucho más rápidamente que tras simple debridamiento por raspado de la córnea normal; esto podría sugerir que el epitelio que recubre la córnea tras una quemadura alcalina, segrega niveles más altos de AP que los producidos por el epitelio tras una simple injuria por raspado.

Tras el desarrollo de un defecto en el epitelio se observan cambios ultraestructurales en la membrana basal subepitelial, y entonces la membrana basal no se detecta al microscopio electrónico. Esta secuencia de cambios morfológicos es consistente con la impresión clínica de que una vez que la membrana basal no está presente, el estroma se ulcera rápidamente (66).

Para probar la hipótesis de que el sistema AP/plasmina tiene un importante papel en la ulceración estromal, se añadió plasminógeno a cultivos de córneas de conejos ulceradas. Tras la adición de plasminógeno

a tales cultivos, se encontró que el plasminógeno era convertido en plasmina por el AP segregado por las córneas (65); el AP fue segregado precozmente y la colagenasa fue segregada por los fibroblastos en cantidades crecientes. Se encontró que la plasmina activa la colagenasa que fue segregada en un forma latente, y los niveles aumentados de colagenasa activa, produciendo un incremento en la degradación de colágeno estromal (65). También se ha encontrado que la plasmina degrada la fibronectina asociada a la célula y que estimula la secreción de colagenasa por los fibroblastos de la córnea en cultivo celular (66).

Además de los fibroblastos, los leucocitos polimorfonucleares (PMN), también participan en la ulceración estromal. Los PMN son fagocíticamente activos en la ulceración estromal tras quemaduras alcalinas, y la adhesión de una lente de metilmetacrilato, que previene la reepitelización de la córnea, también previene la infiltración de PMN del estroma, así como la ulceración estromal. Basados en estos datos de que una proteasa sérica produce la infiltración de PMN de la córnea tras la injuria y que la plasmina divide el 3º componente del complemento produciendo fragmentos quimiotácticos hacia los PMN, se ha hipotetizado que el sistema AP/plasmina es también responsable de la atracción de PMN hacia el estroma corneal. Eventuales detenciones de la ulceración producen neovascularización del estroma en respuesta al AP que es angiogénico (Berman M, Winthrop S, Ausprunk D, Rose J, Ranger R y Gage J; 1982), (67). Así, se ha pensado que el sistema AP/plasmina, posiblemente inicia la reabsorción de fibrina y fibronectina en la superficie corneal tras la injuria (66) (Fig. 21).

Los datos son consistentes con la hipótesis de que el sistema AP/plasmina tiene un importante papel en la reabsorción de fibrina y fibronectina en la superficie corneal, la generación de un defecto epitelial persistente y la estimulación de la secreción y activación de la colagenasa en el estroma, contribuyendo a la ulceración estromal (66).

El AP de las células corneales, como el de otro tipo de células, existe en una forma latente (proactivador de plasminógeno) y en una forma activa. La existencia de un forma activable demuestra que, como con la colagenasa latente corneal, hay otro nivel de regulación importante en las cascadas que conducen a la ulceración estromal. Se piensa que el AP inicia la secuencia que se produce en la destrucción estromal (Wang HM,

Berman M y Law M; 1985) (68).

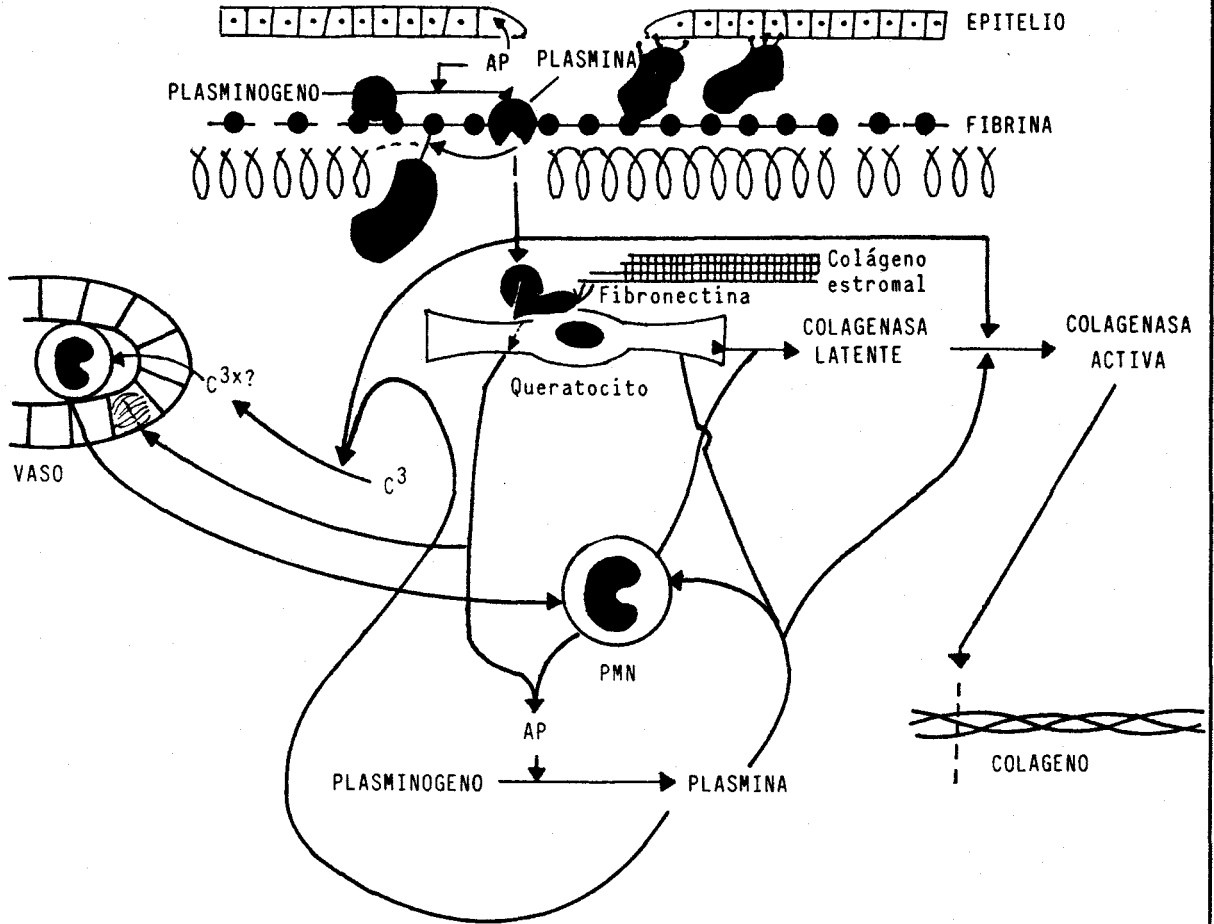


Fig. 21.- Secuencia hipotética de las actividades proteolíticas en la curación de la úlcera que refiere un persistente defecto epitelial con ulceración estromal. Se considera que el activador del plasminógeno (AP), es segregado crónicamente por las células en el borde guía del epitelio corneal adyacente al defecto persistente. El activador activa al plasminógeno adsorbido en la matrix subyacente fibrina-fibronectina, a plasmina. La plasmina degrada la matrix fibrina-fibronectina y el componente (O componentes) de la membrana basal subepitelial, subsecuente a lo cual actúa en la superficie celular del fibroblasto para estimular la secreción de activador de plasminógeno y colagenasa latente. La plasmina entonces activa la colagenasa latente a una forma que degrada el colágeno (colagenasa activa); y la plasmina posiblemente genera fragmentos quimiotácticos para los PMN a través del complemento. Después los PMN parecen degranularse en la región de la úlcera. El mismo AP es angiogénico e interviene en la incrementada entrada de antiproteasas y nutrientes hacia el estroma y en la eventual detención de la ulceración (Berman M y cols.) (66).

La presencia de AP activo, sin embargo, se correlaciona con altos niveles de colagenasa activa y con la degradación de colágeno en cultivos de córneas ulceradas de conejos. En córneas normales, en contra, la presencia de AP en forma latente principalmente, se correlaciona con niveles casi no detectables de colagenasa, toda la cual estaba en forma latente. El dato sugiere que las concentraciones de AP latente (proactivador) y de colagenasa latente, y las concentraciones de AP activo y colagenasa activa están bajo un control coordinado (Fig. 22) (68).

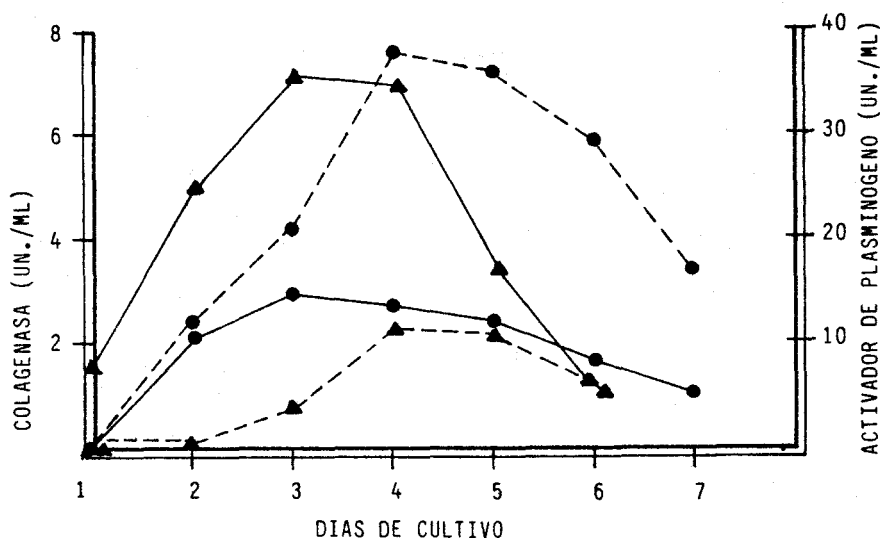


Fig. 22.- Formas latente y activa de activador de plasminógeno y de colagenasa en cultivos de córneas de conejo ulceradas. Los niveles de AP activo (—▲—) y de colagenasa activa (—●—) se elevan precozmente en el cultivo; y los niveles de AP latente (—▲—) y de colagenasa latente (—○—) se elevan más tardíamente en el cultivo, sugiriendo un control coordinado entre las formas latente y activa del AP y de la colagenasa (Wang HM y cols.) (68).

También la adición de plasminógeno al cultivo, da como resultado un pico precoz de AP activo en el medio, así como niveles en alza de colagenasa latente y activa y productos de degradación del colágeno (68).

Estos resultados sugieren que las células epiteliales corneales sólo en cultivos producen mucho más AP que los queratocitos sólo, los cuales producen poca o no detectable actividad de AP. Sin embargo, como en el caso de estimulación por células epiteliales corneales en la producción de colagenasa por fibroblastos corneales, es posible que "in



vivo" los fibroblastos sean una fuente importante de AP, en respuesta a las señales del epitelio o de los PMNs (68).

Nishida y cols. (Nishida T, Nakagawa S, Awata T, Tani Y y Manabe R; 1983) (69), observan que el colirio de fibronectina preparado del plasma de los pacientes, facilita la reepitelización de la córnea en pacientes con úlcera trófica por queratitis herpética o anestesia del trigémino, y relatan un caso de tratamiento exitoso con colirio de fibronectina en el tratamiento de erosión corneal traumática recurrente. Evidencias de laboratorio en ensayos sobre conejos sugieren que la fibronectina administrada en colirios se une a la capa estromal denudada y entonces aparece una migración de células epiteliales para cubrir el defecto.

También Nishida y cols. (Nishida T, Nakagawa S, Nishibayashi C, Tanaka H y Manabe R; 1984) (70), estudiaron el efecto de la administración tópica de fibronectina en la reepitelización corneal, administrando fibronectina a una concentración de 0,75 mg/ml a córneas de conejos previamente desepitelizadas, y observaron una proporción media de curación en los ojos tratados con fibronectina de $1,62 \pm 0,33 \text{ mm}^2/\text{hora}$, mientras que en los ojos controles fue de $1,30 \pm 0,35 \text{ mm}^2/\text{hora}$. (Tabla 13).

Conejo nº	Ojo tratado con fibronectina mm/h	Ojo control mm/h
1	1,27	1,10
2	1,63	1,24
3	1,59	1,21
4	1,26	1,25
5	1,84	1,03
6	1,27	0,88
7	1,69	1,54
8	1,36	1,21
9	1,52	1,23
10	1,43	0,82
11	1,82	1,70
12	2,37	2,09
13	1,99	1,61

Tabla 13.- Efecto del tratamiento con fibronectina en la proporción de curación de la herida epitelial (Nishida y cols.) (70)

La diferencia en la proporción de curación epitelial fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$) cuando se comparan ambos grupos, lo que demuestra que la fibronectina facilita la curación de la úlcera corneal epitelial de conejos "in vivo" (70).

La molécula de fibronectina tiene lugares de unión para el colágeno, proteoglicano y para receptores de la superficie celular todavía no identificados. La interacción entre la fibronectina y los componentes del citoesqueleto, como los microfilamentos y la actina, sugiere que la organización del citoesqueleto puede cambiar cuando las moléculas de fibronectina se unen a la superficie celular. En la migración epitelial corneal, la fibronectina administrada como colirio puede unirse a la membrana basal desnuda y actuar como un puente con las células epiteliales. Una vez unida la fibronectina a las células epiteliales, la organización del citoesqueleto de las células puede ser alterada para el comienzo de la migración. Sin embargo, el mecanismo preciso por el que la fibronectina facilita la migración epitelial en un defecto epitelial es todavía desconocido (70).

Se han ensayado distintas sustancias que modifican la proporción de curación epitelial, como el factor de crecimiento epidérmico (Ho P, Wilkes H, Elliot J y Cohen S; 1974) (71), (Petroutsos G, Jacomini C, Patey A y Pouliquen Y; 1983) (72).

El factor de crecimiento epidérmico, principio activo de la especialidad PHZ-102, es una proteína de bajo peso molecular (6.400), que se encuentra especialmente en las glándulas submaxilares y en diferentes tejidos y líquidos biológicos de los animales y hombres. El crecimiento epidérmico que produce se debe a una proliferación y diferenciación acelerada de las células de la epidermis.

Petroutsos y cols. (72), aplicaron el factor de crecimiento epidérmico a córneas previamente ulceradas y observaron que la aplicación local de este producto 4 ó 6 veces por día, aumentaba significativamente ($p < 0,02$ y $p < 0,001$ respectivamente), la velocidad de cicatrización de las úlceras corneales comparándolas con un grupo control. El tiempo medio de cicatrización completa del grupo control fue de 49 horas, y el de los grupos tratados con factor de crecimiento epidérmico fue de 35 a 38 horas. (Tablas 14 y 15) (72).

Grupo A control (n = 12)	Grupo B E.G.F. (n = 10)	Grupo C E.G.F. (n = 12)
1,11	1,93	1,31
1,03	1,11	1,06
0,93	1,45	1,22
1,06	1,10	1,11
1,21	2,05	2,18
1,74	2,06	2,25
1,06	1,08	1,06
0,89	0,97	2,17
0,81	1,05	1,78
0,87	1,78	1,79
1,15	-	1,92
0,97	-	2,31
a: $M_1=1,07 \pm 0,24$	$M_2= 1,46 \pm 0,45$	$M_3=1,68 \pm 0,50$
b:	$p < 0,02$	$p < 0,001$
a = media \pm desviación estandar; b = valor de p; n = número de ojos		
Tabla 14.- Velocidad de cicatrización de la úlcera corneal (mm^2/h) (Petroutsos y cols.) (72).		

Grupo A control (n = 12)	Grupo B E.G.F. (n = 10)	Grupo C E.G.F. (n = 12)
a: $M_1 = 49,41 \pm 7,35$	$M_2=38,40 \pm 6,34$	$M_3=35,47 \pm 8,64$
b:	$p < 0,01$	$p < 0,001$
a = media \pm desviación estandar; b = valor de p; n = número de ojos		
Tabla 15.- Plazo (horas) de cicatrización tras la quemadura. (Petroutsos y cols.) (72).		

También, la utilización del ácido hialurónico aplicado localmente a pacientes que padecían queratoconjuntivitis seca y erosión corneal recurrente, produjo una estimulación en la reepitelización, que podría atribuirse a la combinación de un fenómeno viscoelástico perdurable asociado a un poder trófico (Tabatabay C, 1984) (73).

La vitamina A es esencial para el mantenimiento de todos los tejidos epiteliales. Los retinoides administrados oral y tópicamente son frecuentemente usados para el tratamiento de enfermedades de la piel, como el psoriasis y el acné. También favorecen la curación de úlceras experimentales en la epidermis (Ubels JL, Edelhauser HF y Austin KH; 1983) (74).

El ácido retinoico tópico y el retinol se adhieren realmente al epitelio corneal y el retinol- H^3 inyectado en la cámara anterior del ojo es tomado por el epitelio corneal y concentrado en la células que emigran para cubrir una úlcera corneal (74).

Ubels y cols. (74), aplicando ácido todo trans retinoico al 0,1% en córneas de conejos ulceradas por raspado, observaron un incremento del 21% en la proporción de curación, comparado con ojos controles cuando el producto fue aplicado 3 veces al día, y un incremento del 35% cuando se aplicó 5 veces al día. Igualmente observaron que cuando administraban ácido todo-trans-retinoico 3 veces/día en concentraciones de 0,1% y 0,25%, el espesor del epitelio corneal volvía a la normalidad aproximadamente a las 50 horas después de provocar la ulceración, comparado con las 72 horas que tardaron los ojos controles.

Aunque el mecanismo por el que los ácidos retinoicos favorecen la curación de la herida corneal es desconocido, se supone que puede estar relacionado con la biosíntesis de las proteínas de la superficie celular, las cuales cambian de composición durante la curación de la herida corneal (74).

El ácido retinoico puede estar correlacionado con la estimulación de la síntesis de glicoproteínas y los cambios en la composición de los polisacáridos en la superficie celular. El ácido retinoico puede estimular la biosíntesis de glucoconjugados en el epitelio corneal en ratas normales y con déficit de vitamina A, mientras que el retinol estimula la síntesis de glicoproteínas sólo en ratas deficientes de vitamina A (74).

En cuanto a la efectividad en el tratamiento de erosiones epiteliales recurrentes mediante el uso del ácido retinoico, parece ser que éste puede favorecer la adhesión del epitelio regenerante. Esta adhesión requiere la presencia de una membrana basal íntegra, retardándose la adhesión si la membrana basal está dañada (52). Ya que el ácido

retinoico favorece la producción de glucoconjugado, el tratamiento con este compuesto puede seguirse de la producción de nuevos componentes de membrana basal (74).

El ácido retinoico puede estimular la formación de receptores del factor de crecimiento epidérmico en el epitelio corneal. Tópicamente aplicado, el factor de crecimiento epidérmico aumenta la proporción de curación de úlceras corneales epiteliales (71). Esto sugiere que el favorecimiento de curación de la úlcera corneal puede deberse a que el ácido retinoico aumenta los receptores locales del factor de crecimiento epidérmico en las células epiteliales, seguido de una estimulación de la curación por un aumento del factor de crecimiento epidérmico endógeno (74).

Se ha publicado que la reepitelización corneal en ratas diabéticas es defectuosa y que el tratamiento con inhibidores de la aldosa reductasa previenen estos defectos. Similares defectos en la reepitelización de ratas galactosémicas se observan en las ratas diabéticas, y cuando se produce una denudación de estas córneas se observa un significativo retraso en la reepitelización al compararlas con córneas normales, y las córneas curadas aparecen edematosas y brumosas (Datiles MB, Kador PF, Fukui HN, Tian-sheng HU y Kinoshita JH; 1983) (75).

Estos autores establecieron que el tratamiento oral de las ratas galactosémicas con el inhibidor de la aldosa reductasa previene el retraso de la reepitelización y el aspecto brumoso observado en las ratas galactosémicas. En la Fig. 23 se observa un desplazamiento hacia la derecha de la curva de reepitelización en ratas galactosémicas no tratadas indicando un retraso inicial en la curación, observando una curación significativamente inferior ($p < 0,05$) a las 17, 24 y 48 horas en las ratas galactosémicas sobre las controles o las tratadas con el inhibidor de la aldosa reductasa, lo que sugiere que la aldosa reductasa participa en el desarrollo de las anomalías corneales diabéticas (75).

Los corticosteroides administrados a dosis elevadas tienen un efecto retardante sobre la cicatrización de las heridas de la córnea. Gasset y cols. (Gasset AR, Lorenzetti DW, Ellison EM y Kaufman HE; 1969) (76), descubrieron que la dexametasona al 0,1% administrada tópicamente cada hora, disminuía a la mitad la resistencia a la tensión de las heridas de la córnea de 11 días de antigüedad. Previamente se había descubierto

que la cortisona administrada en forma subconjuntival en dosis de 2,5 a 15 mg, inhibía la infiltración celular y la restauración fibroblástica, retardando así la cicatrización de las heridas de la córnea (Asthon N y Cook C, 1951) (77).

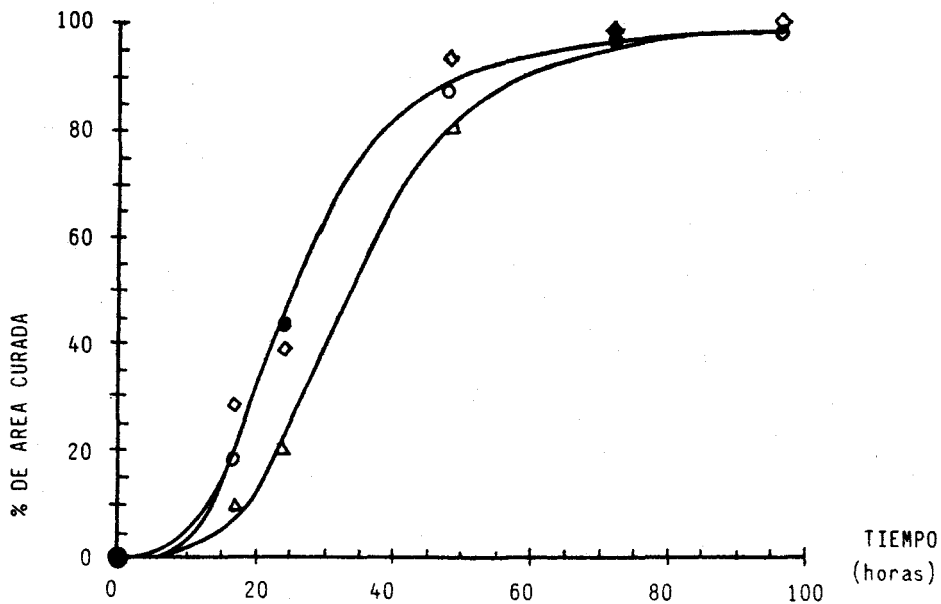


Fig. 23.- Proporción de re-epitelización de corneas expresada como % de área curada en el tiempo, en horas, para ratas normales de control(O), ratas galactosémicas(Δ) y ratas galactosémicas tratadas (◊). Los puntos de cada serie que representan las medias de 120 ojos fueron adaptados a la ecuación general alostérica de Monod, Wyman y Changeux. (Datiles MB y cols) (75).

Sin embargo, la aplicación tópica de dexametasona en dosis menores (0,01% cada hora, ó 0,1% cuatro veces al día), no afecta la resistencia a la tensión (76).

Los antiinflamatorios no esteroideos y los esteroideos no afectan el curso de la reepitelización en córneas denudadas parcialmente cuando se compara con grupos controles. Igualmente, los antiinflamatorios no esteroideos no afectan el curso de la reepitelización en córneas denudadas completamente, sin embargo, la administración tópica de prednisolona al 1%, y dexametasona al 0,1% produjeron un descenso altamente significativo ($p < 0,001$ y $p < 0,005$ respectivamente), a las 72 horas después de la denudación corneal completa (Fig. 24) (Srinivasan BD y Kulkarni PS, 1981) (78).

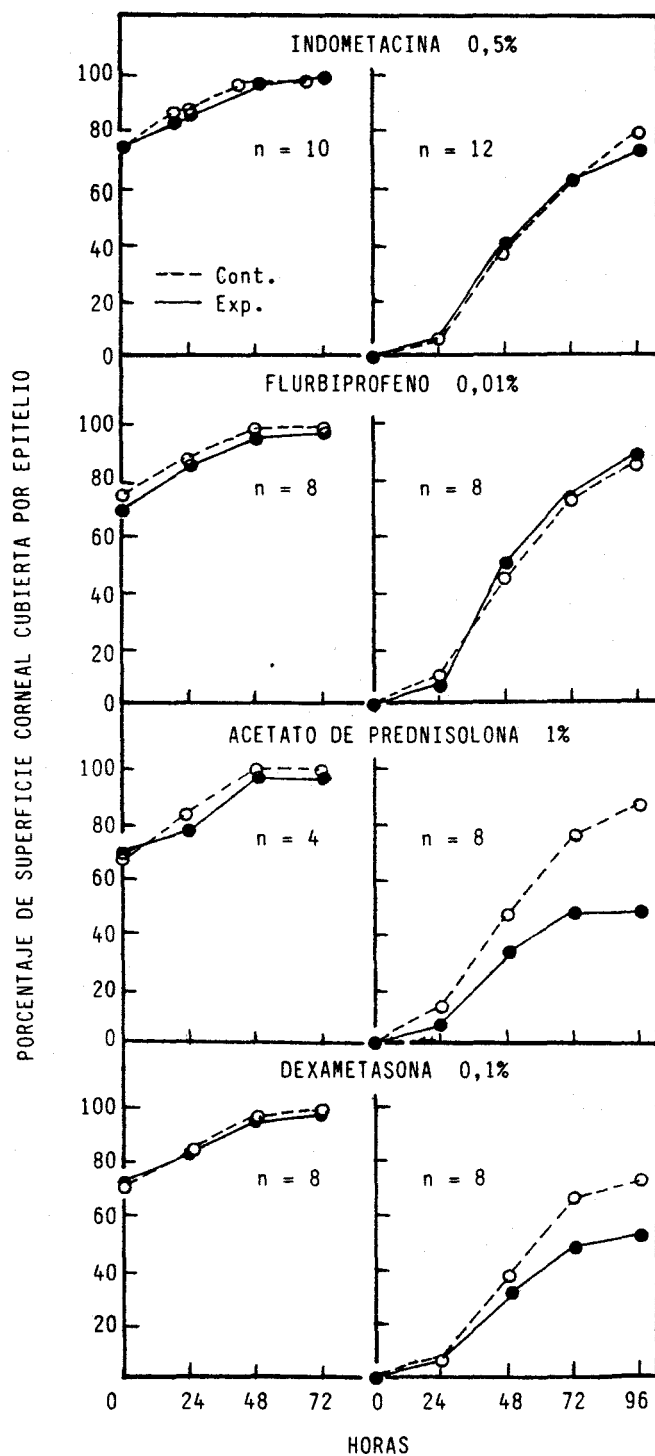


Fig. 24.- Frecuencia de reepitelización de córneas de conejos tras denudación epitelial corneal parcial y completa. Los ojos controles (círculos blancos) fueron pretratados con solución salina $1\frac{1}{2}$ hr antes de la denudación y dos a tres veces al día posteriormente. Los ojos experimentales (círculos negros) fueron tratados similarmente con agentes esteroideos (tres veces al día) o no esteroideos (dos veces al día). Cada punto en la curva representa la media \pm E.S.; n, número de ojos. (Srinivasan y Kulkari) (78).

El mecanismo por el que los esteroides retardan la emigración celular epitelial conjuntival y no la emigración epitelial corneal no está claro. Al contrario que la conjuntiva, la córnea del conejo no posee un significativo capacidad para convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas. La actividad ciclooxygenasa es 2 a 3 veces mayor en la conjuntiva del conejo que en la córnea (78).

Es posible que la emigración epitelial corneal no dependa del metabolismo del ácido araquidónico; de este modo sería inservible a los efectos de los antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos. Por otra parte, la emigración celular epitelial conjuntival puede depender de la liberación y metabolismo del ácido araquidónico (78).

La aplicación de esteroides a ojos cuando las úlceras están establecidas muestran una aceleración en los procesos ulcerativos (Phillips K, Arffa R, Cintron C y cols.; 1983) (79).

Así, si los esteroides son usados después de la iniciación de la infiltración celular, el fármaco puede ser menos efectivo en la prevención de la ulceración. Un retraso en el tratamiento con el fármaco de 6 días después de producirse una quemadura corneal, produce un aumento en el número de úlceras. Estas observaciones pueden explicar la aparente discrepancia en la acción de los esteroides en la ulceración activa y establecida (79).

Sin embargo, el tratamiento con prednisolona o medroxiprogesterona inmediatamente después de producirse un quemadura térmica en córneas de conejos, fue efectivo en la prevención de la ulceración y de la perforación, ya que el tratamiento precoz con estos fármacos interfiere con la emigración inflamatoria y fibroblástica en la región dañada de la córnea (79).

La cocaína, como la mayoría de los agentes anestésicos sintéticos, puede producir erosiones corneales. Además de los efectos tóxicos que administración repetida de anestésicos produce sobre la córnea, las instilaciones reiteradas de muchos anestésicos muestran una progresiva disminución del efecto anestésico hasta que éste se pierde totalmente. No se conoce exactamente la causa de esto, pero la prescripción de fármacos anestésicos para ser usados por el paciente en su domicilio es peligros ya que aunque los pacientes son aconsejados para que no usen

anestésicos con intervalos menores de 1 ó 2 horas, frecuentemente éstos ignoran las indicaciones del médico y las emplean a intervalos más frecuentes con el objeto de calmar sus dolores (5).

Un factor a tener en cuenta con respecto al retardo de la cicatrización en las heridas de la córnea causadas por anestésicos, es el hecho de que ciertos anestésicos son buenos detergentes, es decir, agentes humectantes. Esta propiedad puede ser en parte responsable de la inhibición de la epitelización. Los detergentes actúan de este modo, y si los fármacos incorporados en ungüentos en los que se reduce su acción detergente, su acción de retardar la migración celular disminuye significativamente. Los anestésicos menos perjudiciales en lo que respecta a la restauración del epitelio, son los ungüentos de dibucaína y fenacaína. Si se usan con moderación, deterioran escasamente la mitosis en el epitelio normal o retardan la división y migración de células en el epitelio corneal en regeneración (5).

La cocaína y la efedrina inhiben la actividad mitótica del epitelio corneal y ambas sustancias sensibilizan a varios de los órganos efectores a la acción de la epinefrina. El éter inhibe la actividad mitótica y estimula la secreción suprarrenal de epinefrina durante el estado de excitación, por lo que la propia excitación, particularmente por estímulos dolorosos, disminuye el índice mitótico en el epitelio corneal normal y esta disminución es una respuesta adrenérgica que puede ser estimulada por la administración local o sistémica de epinefrina. Si antes del período de excitación se administra ergotamina o nicotina, la inhibición de la mitosis es eliminada o por lo menos disminuida. El efecto de la epinefrina no se debe a la disminución de la temperatura del tejido ni a trastornos circulatorios locales. La extirpación del ganglio cervical superior conduce a una disminución del índice mitótico en el epitelio después de un intervalo aproximado de 20 horas (5).

También hay que destacar el efecto de las soluciones tópicas de antibióticos en la curación de las heridas epiteliales corneales. Los antibióticos tópicos son probablemente los fármacos más comúnmente usados por los oftalmólogos. No sólo son usados estos fármacos para el tratamiento de infecciones bacterianas, sino que los antibióticos tópicos son usados de forma frecuente profilácticamente tras un trauma corneal, en los postoperatorios y en una variedad de enfermedades que afectan al

epitelio corneal. Sin embargo, cuando los medicamentos son usados en enfermedades en las que el epitelio corneal está comprometido, el conocimiento de los potenciales efectos tóxicos de estos agentes es extremadamente importante y así, los fármacos menos tóxicos deberían ser usados preferentemente.

Ya en 1954 Marr y cols. (Marr WB, Wood R y Grieves M; 1954) (80), descubrieron que el uso de antibióticos derivados de actinomicetos (estreptomina, cloromicetina, aureomicina y terramicina), en concentraciones usadas clínicamente, no producían retrasos en la curación de defectos epiteliales cuando se administraba a ratas, ocurriendo lo mismo cuando se administraban sales o cristales de penicilina G. Tampoco encontraron retrasos en la curación de defectos epiteliales cuando se administraba sulfato de polimixina B, sulfato de viomicina, eritromicina y sulfato de neomicina.

Se ha observado el desarrollo de erosiones punteadas con el uso de ciertos antibióticos, especialmente los aminoglucósidos. En enfermedades caracterizadas por pobre curación epitelial, por ej.: queratoconjuntivitis seca, erosión corneal recurrente, queratitis neurotrófica, queratitis metaherpética y queratoconjuntivitis primaveral, las enfermedades pueden empeorar por el uso de medicamentos potencialmente tóxicos que incluyen a ciertos antibióticos (Stern GA, Schemmer GB, Faarber RD y Gorovoy MS; 1983) (81).

Estos autores mediante experimentos en conejos, establecieron que la cafazolina sódica al 5% tiene un índice de curación epitelial muy rápido con un epitelio regenerado de muy buena calidad. Este es el fármaco más comunmente usado en el tratamiento de las úlceras corneales producidas por organismos Gram +. Este medicamento es muy bien tolerado por los pacientes y como es un inhibidor de la síntesis de la pared bacteriana, cabe esperarse que tenga poco efecto tóxico en las células humanas (81).

Casi equivalente a la cefazolina sódica fue la mezcla de neomicina-polimixina B-gramidicina. Este descubrimiento fue un poco sorprendente ya que se ha observado una queratitis epitelial punteada en pacientes tratados con compuestos que contienen neomicina. También Pfister y Burstein (38), encontraron pérdida de microvillis, arrugas de la membrana

plasmática y descamación prematura de las células epiteliales en ojos de conejos tratados con un fármaco similar.

La gentamicina, tobramicina y cloranfenicol fueron asociados con los índices de curación más lentos y con epitelios de peores cualidades. No hubo diferencias entre la gentamicina y la tobramicina. Sin embargo, los ojos tratados con concentraciones fortalecidas de estos fármacos mostraron una curación más rápida que con aquellos tratados con unas concentraciones débiles. Este efecto puede ser debido a la solución del preservativo empleado, cloruro de benzalconio, en la preparación del antibiótico fortalecido. Ambas preparaciones de gentamicina y tobramicina contenían cloruro de benzalconio al 0,01% como preservativo, una concentración en la que se sabe que se presentan efectos tóxicos. Pfister y Burstein (38), demostraron que en solución acuosa de sulfato de gentamicina al 0,3% no había efectos dañinos en la membrana plasmática del epitelio, mientras que el sulfato de gentamicina al 0,3% más cloruro de benzalconio al 0,01% produce pérdida de microvillis y descamación de las capas más superficiales del epitelio. Por eso, los efectos tóxicos de estas soluciones están relacionados probablemente más con el preservativo que con el componente madre (81).

Pfister y Burstein (38), encontraron que el cloranfenicol al 0,5% no tenía efectos detrimentos en la membrana plasmática epitelial. Inversamente, Burstein y Kyce (37) observaron una proliferación de microvillis en células epiteliales tratadas con cloranfenicol.

Los resultados del estudio indican que existen diferencias entre los antibióticos suministrados comercialmente en sus efectos tóxicos en el epitelio corneal del conejo. La cefazolina sódica al 5% y la mezcla de neomicina, polimixina B y gramidicina tienen el menor efecto en los índices de curación y calidad del epitelio regenerado. Los aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina, y el cloranfenicol al 5% fueron las soluciones de antibióticos más tóxicas (81).

Petroutsos y cols. (Petoutsos G, Guimaraes R, Giraud J y Pouliquen Y; 1983) (82), estudiando la curación de córneas desepitelizadas de conejos, encontraron que no había retardo en la normal curación del epitelio cuando se administraban bajas dosis de bacitracina (500 unidades/ml), sulfato de gentamicina (3 mg/ml), neomicina (3,5 mg/ml) y

cloranfenicol (4 mg/ml). Sin embargo, altas dosis de bacitracina (10.000 unidades/ml), sulfato de gentamicina (10 mg/ml) y neomicina (8 mg/ml), inhibían significativamente la reepitelización. También otros autores encontraron cambios sustanciales en la superficie corneal así como depósitos de mucosustancias después de la administración de cloranfenicol (Mitsui NL, Takashima R, Fujimoto M y cols.; 1976) (83).

La mayoría de los antivíricos producen un retraso en la cicatrización corneal. Esto será tratado más ampliamente en la Sección III, dedicada al estudio de los fármacos antivíricos.

La luz ultravioleta ejerce un apreciable efecto sobre el índice de mitosis corneal. Las dosis pequeñas del arco de mercurio no filtrado estimulan la actividad mitótica del epitelio corneal. Con dosis mayores esta actividad es inhibida. Exposiciones severas conducen a la fragmentación nuclear, principalmente en las capas superficiales del epitelio corneal, y a la pérdida de cohesión entre el epitelio y el estroma (43); esto ocurre después de una exposición no protegida a la luz solar o al arco de soldadura. Como ambos fenómenos son suprimidos en incubación anaeróbica, estos procesos patológicos son, en parte por lo menos, oxidativos. Los dos fenómenos son aparentemente independientes entre sí, ya que tienen diferentes coeficientes de temperatura. En temperaturas de incubación adecuadas puede demostrarse la pérdida de cohesión entre el epitelio y el estroma en ausencia de fragmentación nuclear, que puede ser una forma de mitosis patológica. La cicatrización de heridas muy pequeñas no fue inhibida después de la exposición a rayos ultravioletas en la dosis empleada. Esto está de acuerdo con hallazgos generales de que los movimientos celulares postraumáticos son mucho más resistentes que la actividad mitótica a la interferencia ejercida por distintos agentes tóxicos (5).

SECCION II: RADIACION LASER

PARTE 1ª.-FUNDAMENTOS DE LA EMISION LASER

La palabra LASER no es más que un acrónimo de la expresión inglesa "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation", que ya revela las características esenciales del fenómeno que designa: una "amplificación de la luz" como objetivo, lograda mediante una "emisión estimulada de radiación".

Por ello, la emisión láser es tan sólo un proceso especial de la emisión de la luz, cualitativamente distinto de la luz ordinaria por sus propiedades especiales de monocromaticidad, coherencia y linearidad, y que normalmente se clasifica como infrarrojo, visible, ultravioleta o rayos X. En el campo terapéutico no revisten utilidad los láser de ultravioleta, mientras que los rayos X, ya conseguidos y denominados "xáser", aún no están lo suficientemente adaptados a aplicaciones médicas. Son por ello los láser de luz visible e infrarroja los más empleados en la práctica (Dalmases F y Romero C, 1984)(84); (Zaragoza JR y Rodrigo P; 1984) (85) (Tabla 16).

Sustancia activa	Radiación emitida	Longitud de onda en nm
Ar	visible: verde	514,5
Ar	visible: azul	488,0
He-Ne	visible: roja	632,8
Semiconductores (AsGa)	infrarroja	904
YAG-Nd	infrarroja	1.060
CO ₂	infrarroja	10.600

Tabla 16.- Tipos de láseres más utilizados en terapéutica (Zaragoza JR y Rodrigo P) (85).

Nos encontramos, pues, ante uno de los dos mecanismos con que la física macroscópica sabe interpretar la propagación de la energía a distancia: el "corpúscular", si la propagación se efectúa mediante el transporte de materia, y el "ondulatorio", en el que no existe transporte de material (Fig. 25). en este último caso, son esencialmente las vibraciones las que efectúan la transmisión energética, dando lugar a los

"fenómenos ondulatorios". Dentro de los que se distingue entre los materiales (generalmente elásticos) y los energéticos (electromagnéticos), según que la materia participe o no en la propagación de la energía. En este último grupo de fenómenos citados, los conocidos como ondas electromagnéticas, se incluye la luz que aquí nos interesa (84).

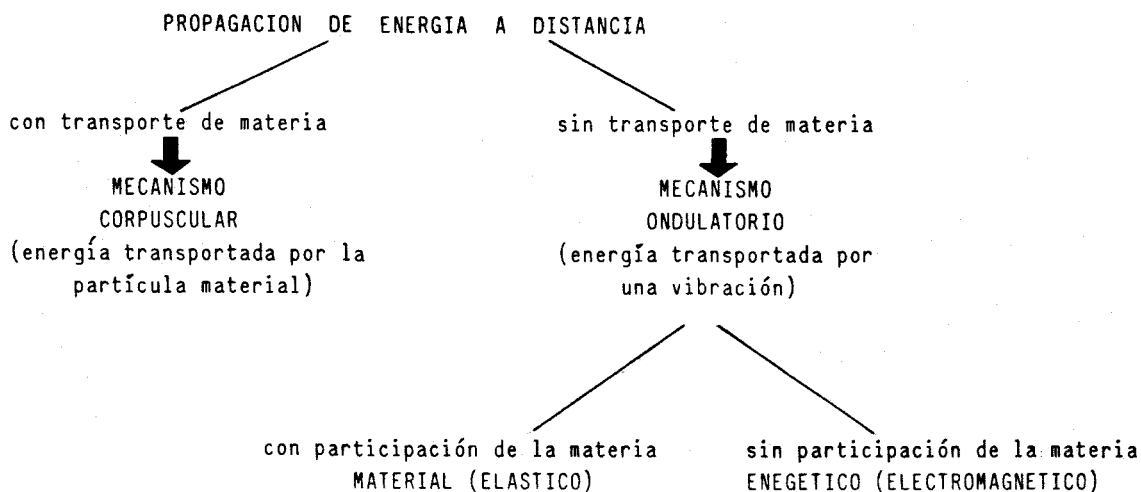


Fig. 25.- Mecanismos de propagación de la energía a distancia (Dalmases F y Romero C) (84).

Así, las ondas electromagnéticas (o.e.m.), vienen constituidas por la propagación de una vibración, concretamente la de los campos eléctricos E y magnéticos B originados por una carga acelerada y frenada, perpendiculares entre sí y a la dirección de avance x (Fig. 26).

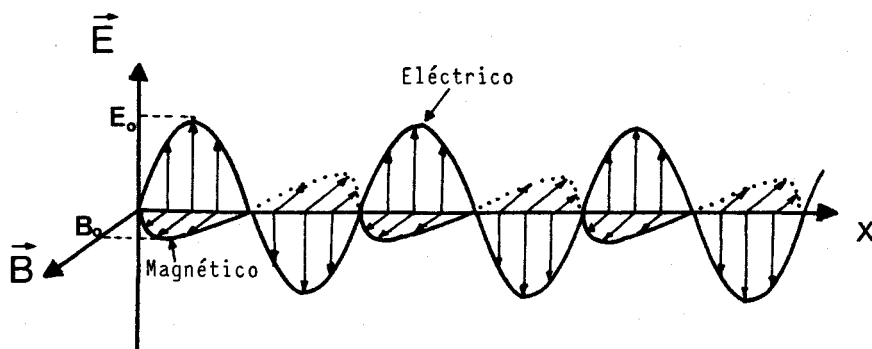


Fig. 26.- Vibración de los campos eléctrico y magnético en una onda electromagnética (Dalmases y Romero) (84).

De modo que será la "intensidad" de la onda la magnitud que sevirá para caracterizar adecuadamente su propiedad esencial de propagar energía a distancia, y que viene representada por la energía E que ésta transporta por unidad de tiempo t a través de una superficie S perpendicular a su dirección de avance (Fig. 27) (84).

$$I = \frac{E}{St} \quad /1/$$

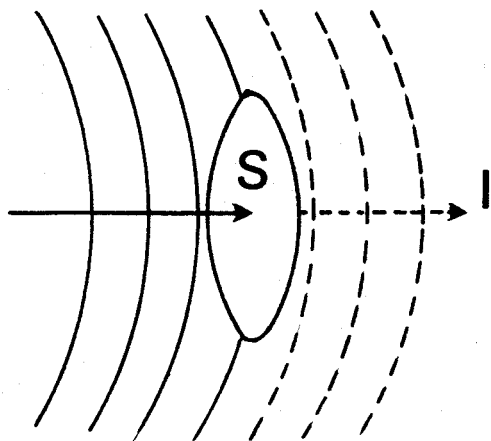


Fig. 27.- Intensidad de una onda (Dalmases y Romero) (84).

Si consideramos una situación vibratoria (Fig. 28), conocer el valor de la magnitud en cierto instante no aclara en absoluto de qué modo está variando, ya que adopta dos veces (al menos) el mismo valor dentro de cada período, en sentidos creciente y decreciente (Fig. 29). Por ello hace falta especificar no sólo el valor, sino también el sentido de variación de la magnitud vibrante en cuestión, constituyendo el conjunto de ambas indicaciones lo que se denomina "fase" de la vibración (84).

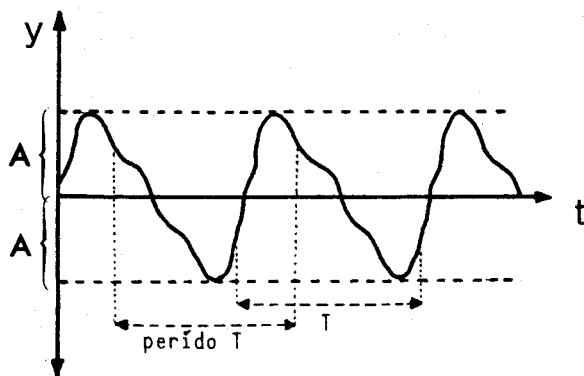


Fig. 28.- Representación de la vibración de una magnitud "y" en el transcurso del tiempo. La magnitud aumenta y disminuye sucesivamente respecto a su valor de equilibrio, oscilando con una "amplitud" A constante y readquiriendo un mismo valor tras el "período" T (84).

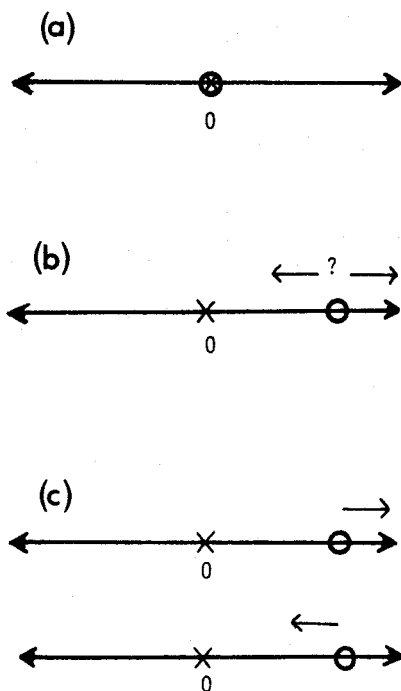


Fig. 29.- Movimiento vibratorio de un móvil: la magnitud vibrante es la distancia entre su posición instantánea y la de equilibrio. (a) Posición de equilibrio y recorrido de la vibración. (b) La posición instantánea no basta para conocer el estado de movimiento del móvil. (c) Es necesario indicar también el sentido de movimiento (84).

En el contexto de vibraciones "fase" resulta equivalente a "estado en el que se encuentra la vibración". Y así, puesto que las ondas vienen constituidas por una secuencia de vibraciones que se desplazan desde el foco, diremos que los estados de vibración de las ondas serán idénticos si los son sus fases. O también, si entre las ondas existe una diferencia de fase de $2K\pi$, con K número entero, ya que para ella coinciden los correspondientes valores de la función seno, respondiendo a una diferencia en un número exacto K de períodos. Por ello a esta última situación se le designa como de "concordancia de fase". (84).

La distancia mínima existente, en la dirección de propagación de una onda, entre dos puntos en concordancia de fase representará la "longitud de onda" λ , correspondiente a la distancia recorrida durante un período T por el "frente de ondas"; por lo que si " c " es la velocidad de propagación de la onda:

$$\lambda = c T = \frac{c}{\nu} \quad /2/$$

que es la ecuación fundamental del movimiento ondulatorio.

Aunque las o.e.m. presenten en su propagación un comportamiento efectivamente "ondulatorio", en su creación o absorción exhiben, por contra, un comportamiento "corpuscular". Apareciendo constituidas por unidades energéticas elementales y discretas, los cuantos o "fotones", cada uno con energía precisamente proporcional a la frecuencia ν de las o.e.m. en cuestión

$$E_{\text{fotón}} = h \nu \quad /3/$$

$$h = \text{constante universal de Planck} = 6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s.}$$

De esta forma, el mecanismo de transporte de la energía electromagnética posee una "doble naturaleza", ondulatoria durante su propagación y corpuscular en sus procesos de interacción, no impidiendo que en la práctica éste mecanismo de transporte pueda tratarse siempre bajo uno u otro de sus aspectos que, de acuerdo con el principio de complementariedad de Bohr, es imposible se presenten simultáneamente.

Cuando se caracteriza al fotón mediante propiedades ondulatorias, éstas se refieren realmente a las del tren de ondas en que se "difuminará" dicho fotón al propagarse y manifestarse entonces el correspondiente fenómeno electromagnético bajo un aspecto ondulatorio. Inversamente, y respecto al frente de ondas electromagnéticas, bastará asimismo pensar que en su generación o absorción parece "agruparse" en un conjunto de conglomerados individuales de energía, los fotones, que responden corpuscularmente de las propiedades de la interacción (84).

Por lo tanto, es necesario admitir valores sólo discretos para los estados de energía de un átomo ("niveles"), el cual tenderá siempre, de acuerdo con la regla general de la naturaleza, a permanecer en el estado de mínima energía posible ("fundamental"), pero pudiendo adquirir también otros valores superiores ("excitados") a través de un aporte externo de energía.

De este modo, si los saltos entre niveles se efectúan mediante absorción o emisión de energía electromagnética, siempre se concretarán en absorción o emisión de fotones, con energía dada por /3/ e igual a la diferencia entre la del nivel inicial E_i y la del nivel final E_f :

$$h \nu = E_i - E_f \quad /4/$$

que es la conocida "condición de frecuencias de Bohr".

La generación de las o.e.m. no sólo se asociará a la vibración de las cargas eléctricas en los circuitos eléctricos o electrónicos, dando lugar a lo que se conoce como "radiofrecuencia" (ondas de radio, televisión y rádar) y "micronondas", sino que los saltos de los electrones entre los niveles energéticos atómicos y moleculares producirán radiación electromagnética, a través de las correspondientes emisiones fotónicas. Es así como se alcanzan frecuencias superiores en la gama de posibles o.e.m. o "espectro electromagnético". que encuentra su prolongación en la región óptica (Fig. 30)

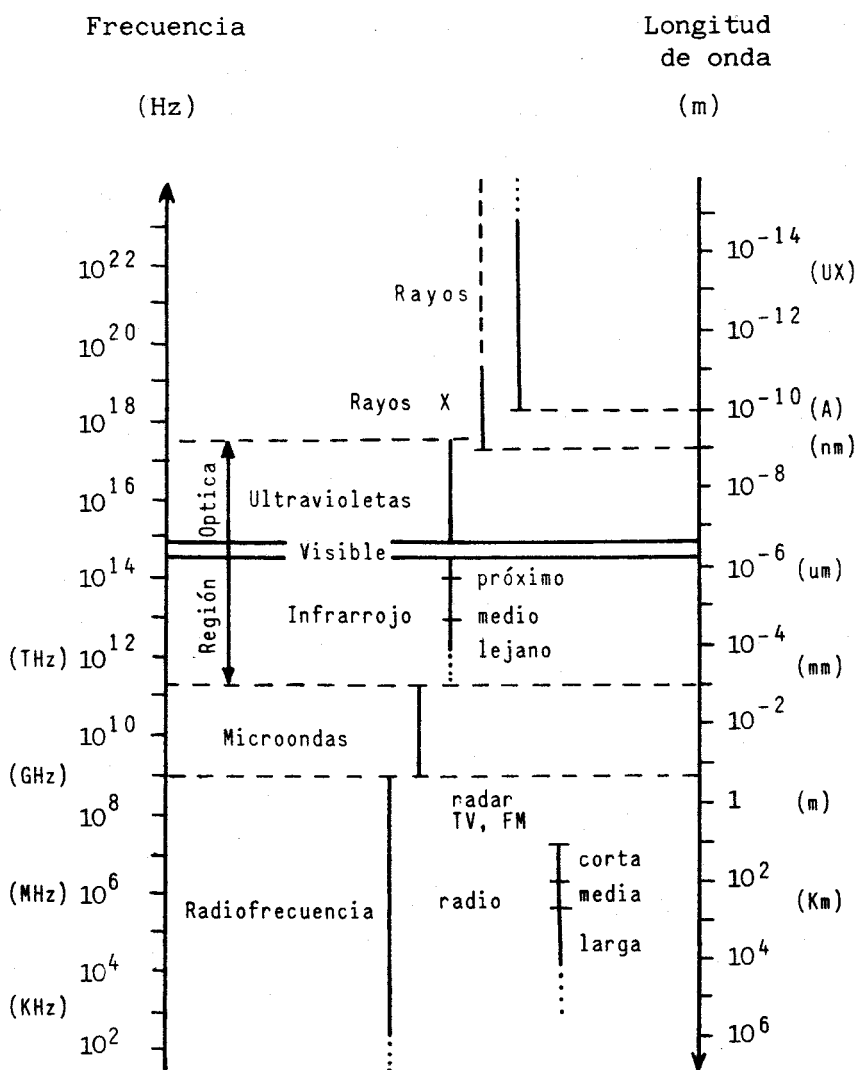


Fig. 30.- Espectro electromagnético (Dalmases y Romero) (84).

Así, si los electrones corticales simplemente "vibran", se origina el "infrarrojo lejano", mientras que si los electrones de valencia llegan a saltar entre los niveles de las capas externas del átomo, se produce ya lo que ordinariamente conocemos como "luz", desde el "infrarrojo medio y próximo", pasando por el intervalo "visible", hasta el ultravioleta"; completándose el espectro con la "radiación X" asociada a los saltos electrónicos a las capas internas (84).

Producción de la luz. Coherencia

El retorno espontáneo de los electrones externos de los átomos (o moléculas) de la sustancia emisora, previamente excitados por agitación térmica o por colisión, a estados menos excitados o, en el límite, a su estado fundamental, producirá la luz. De forma que cada uno de los átomos del emisor, al liberar la energía almacenada, dará lugar a un fotón, origen a su vez de un corto tren de ondas electromagnéticas de duración finita.

Normalmente, serán diversos los niveles atómicos implicados en las transiciones, por lo que según /4/, también serán distintas las frecuencias de los fotones emitidos. Pero incluso en focos "monocromáticos" (emisiones de frecuencia única) y puesto que las desexcitaciones espontáneas son procesos aleatorios, cada átomo se desexcitará independientemente sin guardar ninguna relación con las transiciones de los demás. Así, el haz emitido desde el foco en cualquier dirección integrará un enorme conjunto de pequeños trenes de ondas, que no guardarán ninguna relación de fase entre sí (84).

La luz ordinaria constituye, en definitiva, una radiación con componentes totalmente "desorganizados" o "incoherente". Consiguientemente en un haz de luz se estará produciendo una rápida sucesión de refuerzos y anulaciones entre unos componentes y otros que, aún en el caso monocromático, se alternarán a intervalos de tiempo iguales como mínimo a la duración de los trenes ondulatorios (10^{-8} - 10^{-9} segundos). Lo que conduce al resultado macroscópico de una intensidad promedio uniforme para el haz resultante I_T , que en el supuesto simplificador de N átomos idénticos emitiendo cada uno un tren de intensidades I , resulta igual a la suma de las intensidades individuales:

$$I_T = N I \quad /5/$$

Pero si los trenes de onda producidos por todos los emisores del foco, y por extensión sus fotones equivalentes, se encontrasen en fase, originarían lo que se denomina un "radiación coherente".

En este caso, al coincidir constantemente, para una determinada dirección de propagación, los estados de vibración de los campos, siempre se sumarían entre sí, por lo que deberían sumarse sus amplitudes de vibración en cada tren A, para producir un amplitud total en el haz resultante:

$$A'_I = N A \quad /6/$$

Pero como la intensidad es proporcional al cuadrado de la amplitud, la relación entre la I'_I del haz coherente resultante y la de cada tren I vendría dada, teniendo en cuenta /6/, por:

$$\frac{I'_I}{I} = \frac{(A'_I)^2}{A^2} = N$$

Y así:

$$I'_I = N^2 I \quad /7/$$

en contraste con el resultado de /5/ para el caso incoherente. De forma que substituyendo esta última en /7/:

$$I'_I = N I_I \quad /8/$$

Es decir, la intensidad del haz coherente resultaría N veces superior a la producida por los mismos átomos emitiendo en la misma dirección, pero incoherentemente. Lo que supone un indiscutible y sorprendente efecto de amplificación en la intensidad luminosa emitida, es decir una "amplificación de la luz" (84).

Condiciones de producción de la emisión coherente

La identidad de fase entre los componentes electromagnéticos de un haz luminoso exigirá la igualdad tanto en la frecuencia como en la fase inicial de los trenes de onda emitidos, por ello un conjunto de

átomos sólo emitirá coherentemente si los electrones responsables de la emisión saltan siempre entre los mismos niveles y además, en principio, todos a la vez, pasando a una situación en que las transiciones de los electrones se efectúen entre unos niveles atómicos determinados y fijos y con un perfecto sincronismo, obligando a los átomos emisores a actuar de forma cooperativa.

Esto se consigue mediante la "emisión estimulada de radiación", prevista teóricamente por Einstein en 1917 y aplicada prácticamente por Townes y cols. en 1954 en el desarrollo del "máser" (84).

Emisión estimulada. La emisión láser

Como se esquematiza en la Fig. 31a, la emisión espontánea es un proceso en el que un átomo excitado con energía E_2 , se desexcita aleatoriamente hasta otro estado de menor energía E_1 , emitiendo un fotón de energía $h\nu$ igual a la del intervalo energético de la transición.

Se presenta como un proceso aparentemente contrario al de absorción (Fig. 31b), en el que el átomo con energía E_1 incorpora la energía $h\nu$ del fotón y pasa al estado excitado de energía superior E_2 .

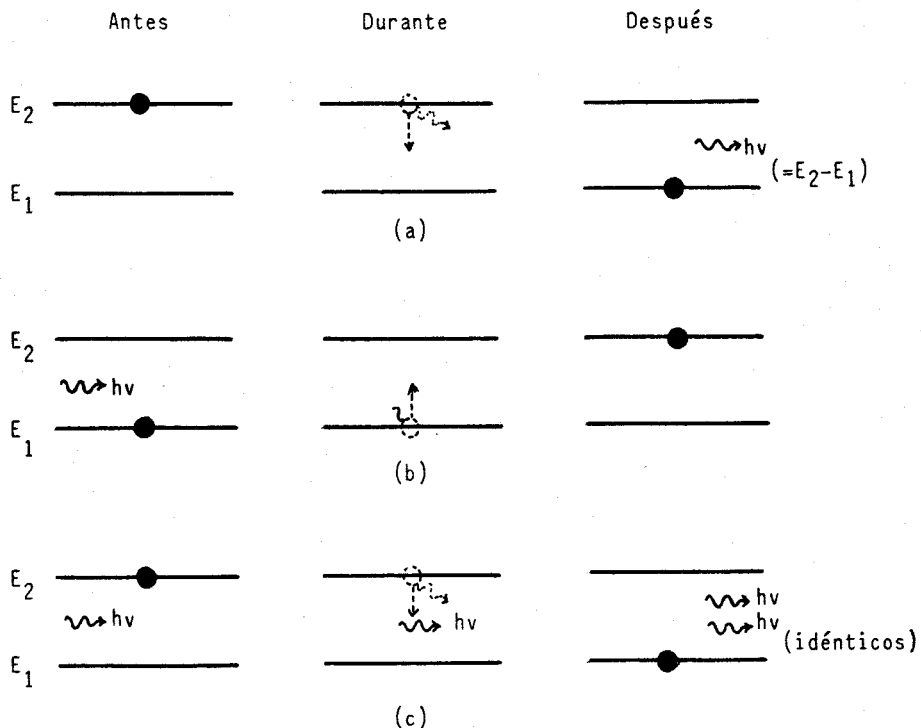


Fig. 31.- Esquema de los procesos de:(a) emisión espontánea, (b) absorción y (c) emisión estimulada (Dalmases y Romero) (84).

Cuantos más fotones se encuentren en las proximidades del átomo, más probable será que éste absorba uno de ellos.

La total simetría absorción-emisión estimulada conlleva una propiedad fundamental para el desarrollo del proceso láser: la radiación producida por estimulación resulta coherente con la estimulante. De forma que el fotón estimulado resulta absolutamente idéntico, no sólo en energía (o frecuencia), sino también en fase y dirección, al fotón estimulador, siendo ambos totalmente indistinguibles.

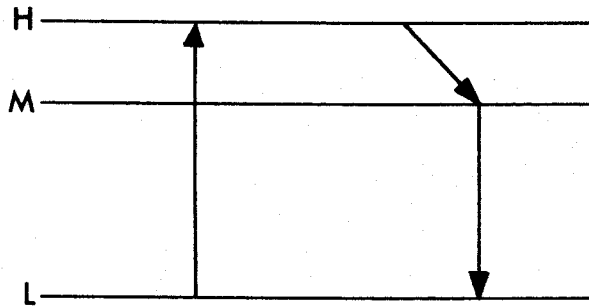
Por consiguiente, y como se resume en la Fig. 31c, la emisión estimulada es un proceso en el que al interaccionar con un átomo excitado un fotón de la misma energía que la que aquél puede emitir espontáneamente al desexcitarse, provoca tal desexcitación y, con ello, la producción de un nuevo fotón que resulta absolutamente idéntico al primero (frecuencia, fase y dirección) (84).

Siendo, así pues, posible conseguir mediante este proceso la "amplificación de la luz": la estimulación de cada fotón estimulante supondrá la incorporación de un nuevo fotón idéntico al inicial y la pareja resultante, al encontrar otros átomos excitados, podrá originar más fotones en fase con los anteriores hasta producir, por una multiplicación en cadena, una radiación coherente. Llevada ésta al nivel de intensidad deseado constituirá la emisión láser buscada, con todas sus características distintivas. Esto es, monocromática, con una intensidad mucho más elevada, debido a su coherencia, que si sus mismos trenes de ondas constitutivos fuesen incoherentes (tal como expresa /8/), y, por último, con la posibilidad de generarse y propagarse de forma prácticamente unidireccional, si se consigue restringir el proceso amplificador a los fotones de sólo una determinada dirección (84).

Inversión de la población. Consecuencia práctica de la emisión láser

En la emisión láser ocurren dos circunstancias: la exacta contraposición entre absorción y emisión estimulada y la consecuencia de la distribución de energía que adoptan los átomos de una sustancia en equilibrio térmico; el número de átomos presentes en un nivel o "población de nivel", disminuye a medida que se consiguen niveles de energía superior. De modo que la población del nivel fundamental siempre es netamente superior a la de cualquier nivel excitado.

La génesis de la luz láser está basada en el caracter metaestable de algunos átomos; en los átomos en este estado, los electrones permanecen en un nivel de energía superior, ocupando órbitas más externas y permaneciendo allí un determinado tiempo (Fig. 32), que es muy superior a los nanosegundos de la emisión espontánea de átomos con electrones en órbitas de mayor energía sin esta característica de metaestabilidad (Haut J, Limon S, MassinM y Perdriel G; 1981) (86).



Fif. 32.- Eejmplo de niveles energéticos en la emisión láser.

- L = Estado energético de baja energía
- H = Estado energético de alta energía
- M = Estado energético metaestable

El paso del electrón del estado de alta energía (H), al metaestable (M), libera tan poca cantidad de energía que el único efecto producido es la vibración del átomo.

Si se ilumina un material con fotones monocromáticos de la energía adecuado $h\nu$, buscando su multiplicación en cadena, siempre se encontrarán más átomos no excitados, susceptibles de absorber fotones incidentes, que excitados capaces de emitir estimuladamente.

Para evitar esta limitación es necesario conseguir artificialmente que la población de átomos excitados supere a la del nivel fundamental, u otro de menor excitación, dando lugar a lo que se llama "inversión de la población" entre los niveles en cuestión. Situación ésta clave para la operación láser, que exigirá el aporte de una energía externa al material, a través del proceso conocido como "bombeo" (84).

Será entonces cuando un fotón incidente podrá desencadenar una avalancha de fotones estimulados a expensas de la energía externa. De modo

que la emisión coherente así producida constituirá la emisión láser en cuestión.

Así pues, los acontecimientos físicos que dan nacimiento a esta "concentración de luz" que es el láser, no pueden explicarse nada más que si se satisfacen las condiciones siguientes: disponer de un "medio activo" (o amplificador), comportamiento de las moléculas o de los átomos susceptibles de ser excitados, asegurar la inversión de la población, por un sistema de "bombeo" y facilitar la "emisión estimulada" multiplicando los reencuentros de los fotones y de los átomos excitados (Fig. 33) (86).

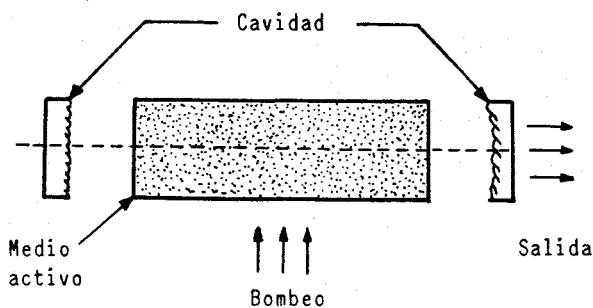


Fig. 33.- Esquema del principio de un láser (Haut J y cols.) (86).

Las técnicas de bombeo pueden ser distintas, así como los materiales cuyos átomos, iones o moléculas presenten el sistema de energía adecuado para desarrollar la inversión. Tales materiales, a los que se denominan "medio activo" pueden corresponder a cualquiera de los estados de agregación ordinarios: sólido, líquido o gaseoso (86).

Los diferentes sistemas de bombeo deben realizar la inversión de la población de tal forma que la totalidad de los electrones sean elevados y mantenidos durante cierto tiempo en el estado excitado (86).

Este bombeo no puede obtenerse nada más que por un aporte de energía exterior y según sea ésta tenemos:

- 1.-Bombeo térmico. No permite nada más que igualar las poblaciones de los niveles estable y excitado y, por lo tanto, su rendimiento es insuficiente.

- 2.-Bombeo óptico. La energía es suministrada por una fuente luminosa. Se puede obtener por flash de xenon (láser de rubí) por lámparas de filamentos de tungsteno o, incluso, por un láser accesorio (Figs. 34 y 35).
- 3.-bombeo eléctrico. Es el procedimiento en las láser de gas y particularmente en el láser de Argón-Krypton y Helio-Neón (Fig. 35). Para los láser de semiconductores se utiliza una corriente de inyección.
- 4.-Bombeo por partículas de alta energía. Son las fuentes radiactivas, los cañones de electrones.
- 5.-Bombeo químico. La energía proviene de una reacción química.

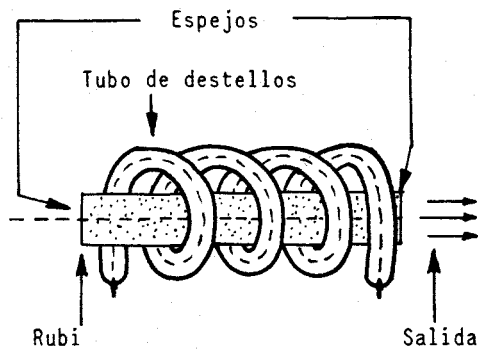


Fig. 34.- Esquema de un láser de Rubí (Haut J y cols.) (86).

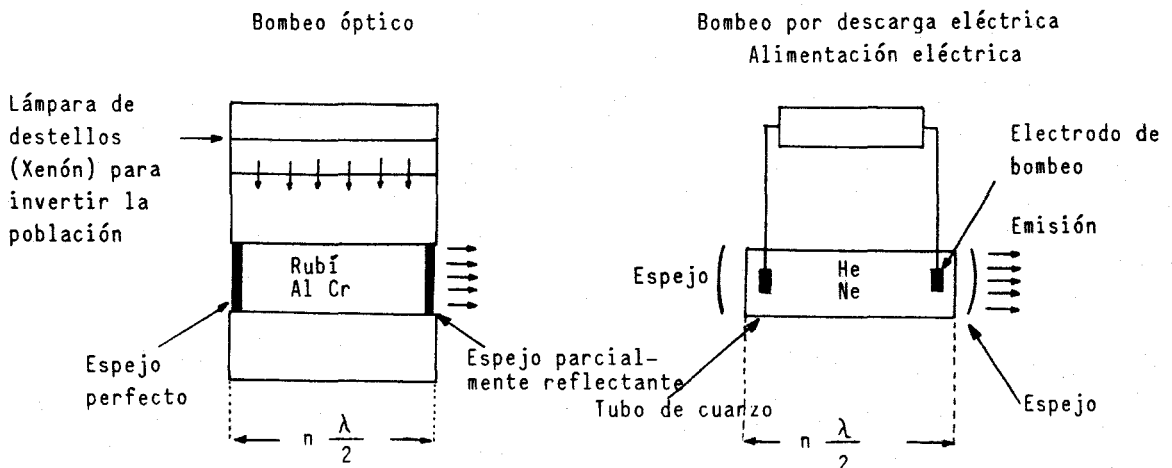


Fig. 35.- Láser de cristales (Rubí) y láser de gas (Helio-Neón). El bombeo difiere en los dos aparatos: óptico para el láser de Rubí y por descarga eléctrica en el láser de gas (Haut J y cols.) (86).

La longitud de onda en que emite cada aparato láser, y por ello la que hemos de aportar como estimulante para conseguir la descarga de átomos excitados, es característica de cada uno de ellos.

El primer láser que se construyó fue el láser sólido de rubí, desarrollado por Mainan en 1960, en el que los iones Cr^{3+} actúan como centros activos. Al iluminar el cristal con luz de amplio espectro, los iones Cr^{3+} pasarán por absorción luminosa a los correspondientes niveles superiores de excitación. Pero al abandonarlos muy rápidamente, cediendo energía de vibración a la red cristalina en transiciones no radiativas, "caerán" al nivel intermedio metaestable. Ahora bien, en éste ya podrán permanecer suficiente tiempo como para que, si la iluminación es lo bastante intensa, se invirtiera la población respecto al nivel fundamental. Por lo que bastará entonces la producción de alguna desexcitación espontánea entre estos niveles para que los fotones originados den inicio, por emisión estimulada, a la multiplicación en cadena generadora de la emisión láser (Fig. 36) (84).

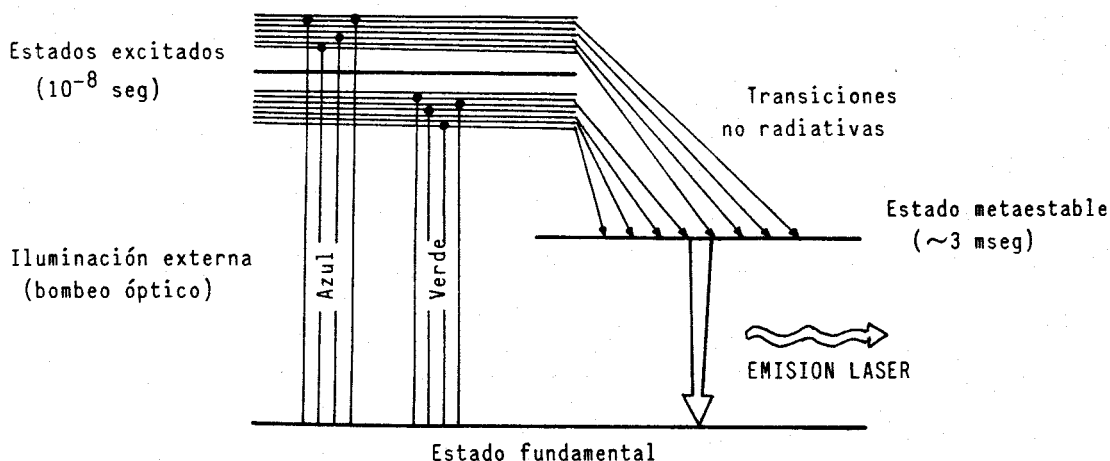


Fig. 36.- Mecanismo del proceso de emisión láser en los iones Cr^{3+} del rubí (para aclarar el esquema se ha desplazado a la derecha la representación del nivel intermedio). (Dalmases y Romero) (84).

La inversión de la población que se consigue a través del "bombeo" a las bandas de absorción, basado en la aportación de energía externa luminosa, denominado "bombeo óptico", realizado con un tubo de descarga gaseosa tipo flash que, o bien se arrolla helicoidalmente sobre la barra, o bien adopta una configuración lineal a lo largo de uno de los focos

de un espejo elíptico (Fig. 37).

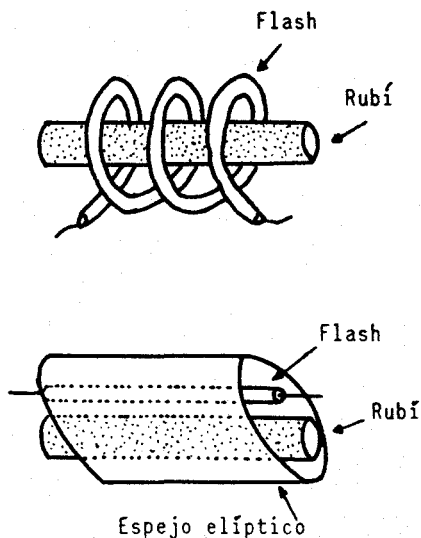


Fig. 37.- Configuraciones de iluminación en un láser sólido (Rubí)
(Dalmases y Romero) (84).

Hay que tener en cuenta la denominada "cavidad óptica", con la que se conseguirán tres objetivos:

- impedir que la radiación coherente emitida escape del medio activo sin aprovechar al máximo la inversión de la población.
- realizar la amplificación para una única dirección de emisión.
- lograr una verdadera monocromaticidad de la emisión.

Para ello basta colocar el medio activo entre dos espejos planos enfrentados y rigurosamente paralelos entre sí, uno de ellos transparente (alrededor del 1%).

Como resultado, sólo los fotones que se propaguen prácticamente en la dirección exacta del eje de la cavidad, al reflejarse una y otra vez en los espejos, irán desencadenando en sus idas y vueltas por el medio activo una intensa avalancha de fotones estimulados, hasta que desaparezca la inversión de la población. De modo que la pequeña fracción que va escapando por el espejo semitransparente es la que origina el haz láser de salida (Fig. 38) (84).

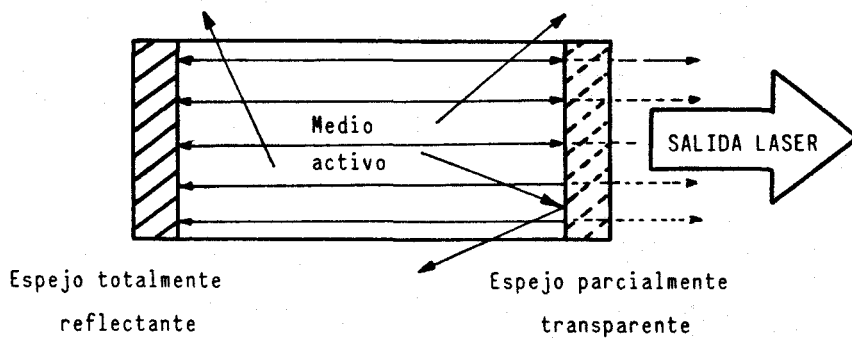


Fig. 38.- Esquema de la cavidad óptica (Dalmases y Romero) (84).

PARTE 2ª.-CARACTERISTICAS Y TIPOS DE LASER

1.-CARACTERISTICAS DE LA EMISION LASER

Las características que habitualmente definen a los diferentes tipos de láser vienen determinadas por:

- la longitud de onda (λ)
- el modo de emisión
- la potencia

1) LONGITUD DE ONDA

La emisión láser puede ser específica de una sola longitud de onda (rubí), pero también lo pueden hacer en diferentes longitudes de onda. Este es el caso del láser de Argón, que emite en dos longitudes de onda muy fuertes (488 y 514,5 nm) y otras menos intensas (unidas a poblaciones electromagnéticas irregularmente representadas en el medio), o el láser Helio-Neón, que puede hacerlo a 632,8 y a 1.150nm.

Según la longitud de onda en que emite se localizará dentro del espectro de las radiaciones, así las radiaciones emitidas con una longitud de onda entre 380 y 760 nm estarán dentro de la radiación visible; las comprendidas por encima de los 760 nm corresponderán a las radiaciones infrarrojas y, las radiaciones cuya longitud de onda sea inferior a 380 nm corresponderán a las ultravioletas (Fig. 39) (86).

2) MODO DE EMISION

Es muy variable y merece ser precisado porque condiciona ciertas actividades particulares del láser.

a) Emisión repetitiva.

Es característica de los láser sólidos y de semiconductores, siendo su emisión de tipo pulsante o a impulsos.

En este caso, la emisión estimulada comienza antes de que el

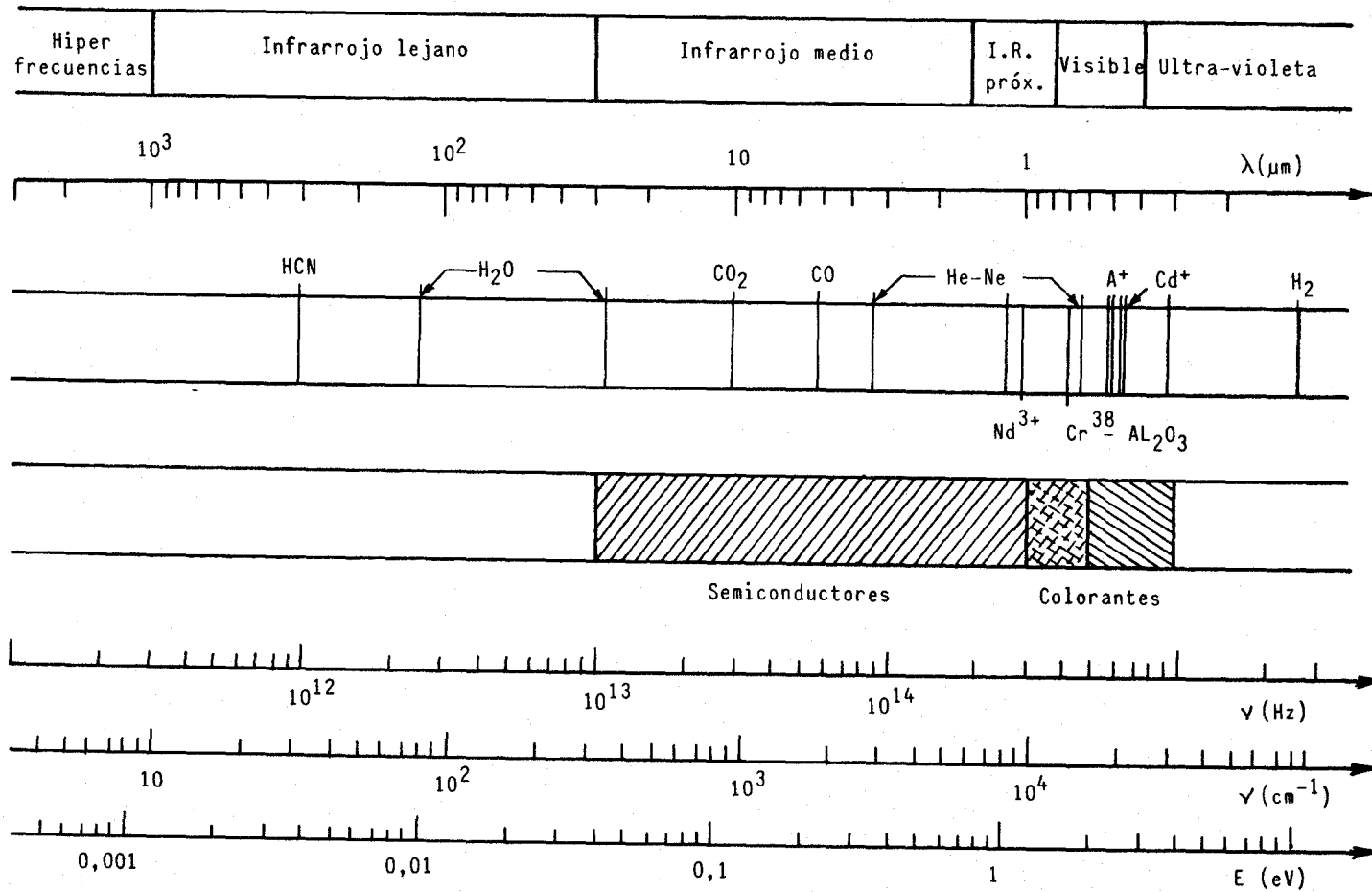


Fig. 39.- Tabla sinóptica de las principales radiaciones láser (Haut J y cols.) (86).

destello del flash de bombeo haya acabado: el umbral de salida de la luz coherente se alcanza entonces en algunos microsegundos y se produce una primera emisión.

Pero el bombeo continúa bajo el efecto del flash, que produce una segunda inversión de la población y una nueva emisión.

Esta emisión repetitiva es característica del láser puesto en libertad, cuyo haz emergente consiste en una sucesión de impulsos (Fig. 40) (86).

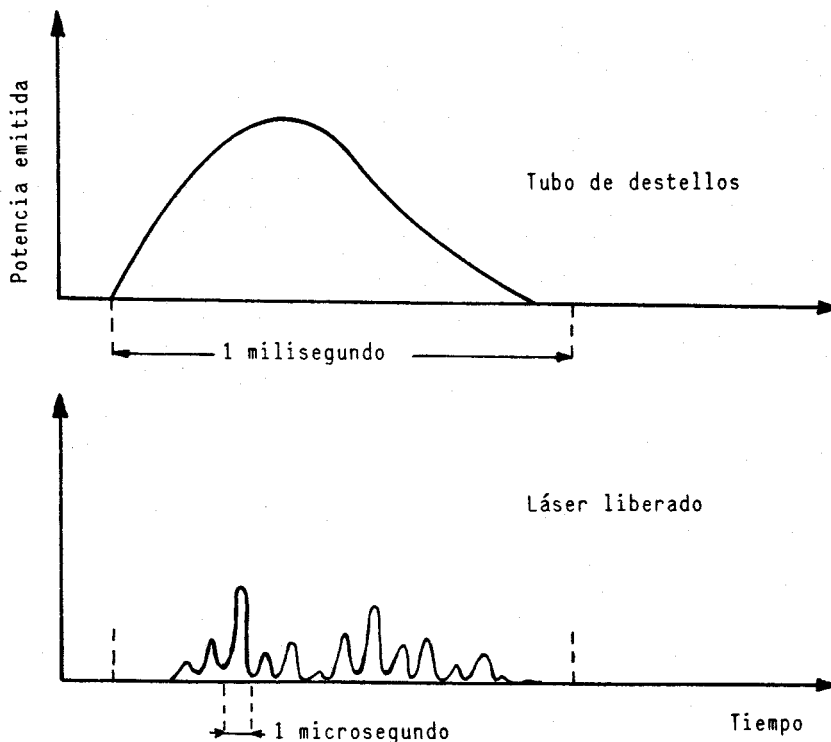


Fig. 40.- Potencias emitidas por la "bomba" y el láser liberado en función del tiempo (Haut J y cols.) (86).

b) Emisión única.

Se puede conseguir produciendo una obturación pasajera en uno de los dos espejos giratorios de la cavidad resonante mientras que se produce el bombeo.

Cuando el nivel excitado consigue una saturación, se descubre el espejo y la totalidad de la población del medio excitado produce una emisión estimulada que induce una radiación de gran potencia en un tiempo muy corto, del orden de nanosegundos (Fig. 41) (86).

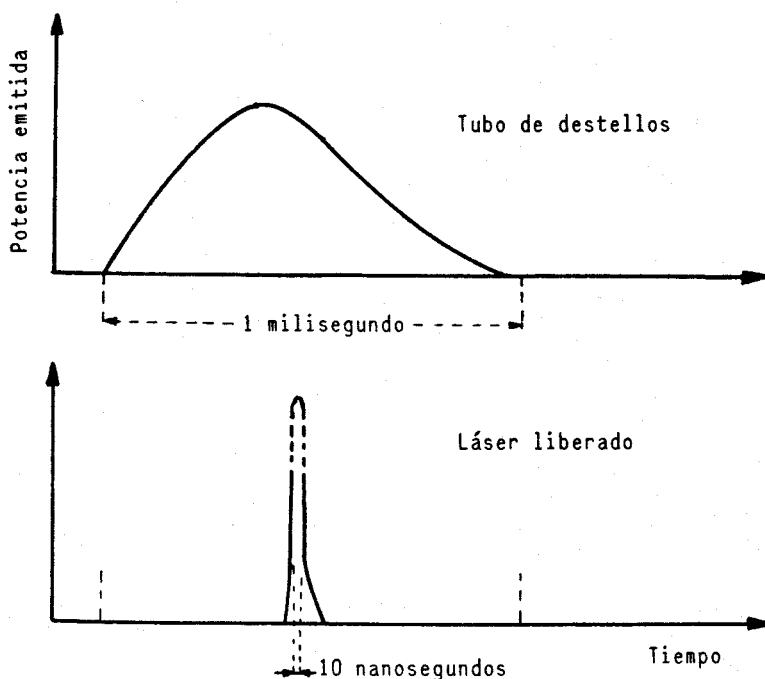


Fig. 41.- Potencias emitidas por la "bomba" y el láser liberado en función del tiempo (Haut J y cols.) (86).

c) Emisión continua.

Es, sobretodo, la producida por los láser de gas. En este caso los impulsos son de más larga duración y se recuperan, dando así una emisión continua cuya potencia será evidentemente menos fuerte que en los dos sistemas anteriores (86).

3) POTENCIA

Expresada en wattios (W), los láser emiten en potencias muy variables, pudiendo alcanzar desde algunos microwattios a varios miles de wattios.

Esta potencia varía con la potencia del medio amplificador (el láser de CO_2 es más potente que el láser de Argón), pero también con el modo de funcionamiento: el láser de emisión única puede alcanzar el KW, el láser de emisión repetitiva puede alcanzar el MW.

Es necesario insistir sobre el hecho de que las potencias energéticas de los láser son frecuentemente equivalentes a las obtenidas

con las fuentes más clásicas, como la lámpara de incandescencia o el arco de xenón. Sin embargo, la luz coherente del láser se expresa bajo la forma de una emisión perfectamente plana conteniendo toda la energía emitida, siendo posible focalizar por un dispositivo óptico esta onda y tener un punto mínimo (punto de Airy), donde se encuentra concentrada la totalidad de la energía (Fig. 42) (86).

Como un arco de xenón, la onda de salida no es nunca plana y la imagen proyectada sobre un plano es de dimensiones muy superiores al punto de Airy (Fig. 42). Para obtener con el xenón un punto más pequeño, haría falta disminuir la extensión de la fuente, que entrañaría una reducción de la energía emitida (86).

Así, con una potencia igual, el láser permite, gracias a la coherencia de su emisión, obtener una distribución energética sobre una superficie más concentrada y, como podría mostrar el cálculo, un brillo 100.000 veces más grande que el que suministraría la misma energía xenón (86).

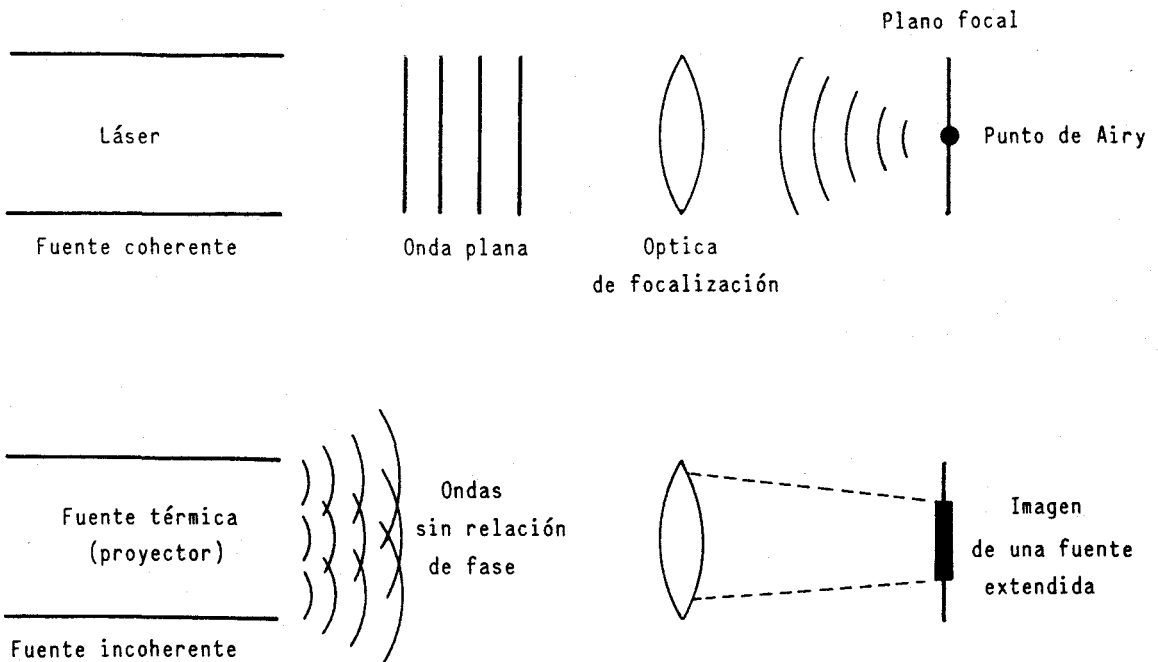


Fig. 42.- Diferencia de repartición energética entre una fuente luminosa coherente (láser) y una fuente incoherente (lámpara de xenón) (Haut J y cols.) (86).



2.-TIPOS DE LASER

1) SEGUN LA NATURALEZA

Según la naturaleza y el estado de la sustancia que actúa como medio activo pueden dividirse en:

a) Láser sólidos. Están constituidos de una matriz en la que están repartidos los átomos de otro elemento químico, dando la disposición electrónica que responde a las condiciones más favorables de transferencia (86)

- láser de Rubí. Está compuesto de aluminio y óxido de cromo
- láser YAG. Lleva como matriz el granate de Itrio-Aluminio, conteniendo átomos de Neodimio o Helio. Su disposición electrónica facilita la inversión de la población. La emisión se sitúa a $1,06 \mu$ en el infrarrojo próximo.
- láser de Tungstato de Calcio y Neodimio.
- láser de Fluoruro de Calcio con Disprosio.

b) Láser líquidos. Son interesantes por su homogeneidad, pero son difíciles de construir y sus compuestos tienen el inconveniente de ser a veces tóxicos (86).

- solución de Oxido de Neodimio en Oxiclorigenato de Selenio.
- solución de Metil Umbeliferona en Acido Clorhídrico.

c) Láser de Gas. La independencia de sus moléculas mejora la coherencia de la emisión y favorece la transferencia de energía. Además, la elección de un gas y de la presión parcial bajo la cual es mezclado con el otro, permite un espectro más extenso de longitud de onda (86).

* Láser atómicos (láser de átomos neutros):

- láser de Helio-Neón.

* Láser "iónicos" (láser de átomos ionizados):

- láser de Argón
- láser de Krypton
- láser de Mercurio-Selenio
- láser de Helio
- láser de Cadmio

* Láser "moleculares" (de gases moleculares):

- láser de gas carbónico (CO_2).

d) Láser de colorantes. En ellos participan ciertas moléculas orgánicas en solución, que bajo el efecto de un haz de luz monocromática emiten un rayo que cubre una gran gama de longitudes de onda.

En estas soluciones es posible crear un conjunto de niveles de energía capaces de suministrar un efecto láser que puede traducirse por emisiones de diversas longitudes de onda (86).

e) Láser de semiconductores. Permiten transiciones electrónicas que se efectúan entre niveles que pertenecen a bandas de energía continua con emisiones que se extienden de 0,6 a 30 μ (86).

El semiconductor está formado por una banda de carga eléctrica negativa con un exceso de electrones (banda "n"), procedentes de impurezas, y por una banda positiva (banda "p"), donde existen huecos o faltas de electrones. Al hacer pasar una corriente eléctrica continua, con el polo negativo de ésta en la banda "n" y el polo positivo en la banda "p" del semiconductor, se consigue invertir la población, con una descarga fotónica sincrónica que conforma la radiación láser; descarga procedente de la zona de contacto de ambas bandas. El láser semiconductor más empleado es el de Arseniuro de Galio (As-Ga).

2) SEGUN SU POTENCIA

a) Power-láser: láser quirúrgico:

- láser de CO_2

b) Soft-láser:

- láser He-Ne

- láser infrarrojo de potencia mínima

c) Mid-láser:

- láser infrarrojo de potencia máxima

3) SEGUN SU PENETRACION

- a) Láser Infrarrojo: con una penetración de 3 a 3,5 cm.
- b) Láser Rojo: penetra aproximadamente 1 cm. en la piel.

4) SEGUN SU TIPO DE PENETRACION

- a) Emisión continua: sobre todo los láser de gas.
- b) Emisión pulsante: láser de infrarrojos.

3.-ABSORCION DE LA RADIACION LASER

En medicina física sólo es eficaz la radiación absorbida, que será la resultante de restar a la energía incidente la reflejada y la reflectada (85).

Desde el punto de vista de la radiación láser, su absorción depende de varios factores:

1) FACTORES DEPENDIENTES DE LA RADIACION

- a) Tipo de radiación láser
- b) Sección del haz
- c) Angulo de incidencia
- d) Intensidad del haz
- e) Duración y modalidad de la emisión

a) Tipo de radiación láser. Nos interesa fundamentalmente la longitud de onda.

Así, la absorción de la radiación láser para distintas longitudes de onda es máxima para el ultravioleta y el espectro visible hasta las cercanías del rojo (hasta los 600 nm aproximadamente); para éste hay una absorción mucho menor, situación que persiste hasta el infrarrojo cercano, mientras que para el infrarrojo más lejano (a partir de los 1.500 nm), la absorción vuelve a ser importante (Fig. 43) (85).

Inversa a la absorción es la penetración tisular, o porcentaje de la radiación incidente que llega a una determinada profundidad. Por ello, del ultravioleta a las cercanías del rojo, la radiación tendrá muy

escasa penetración tisular; del rojo al infrarrojo cercano, la penetración será mayor, variando entre 1 y 3,5 cm. y constituyendo la llamada "ventana óptica" o zona de mayor interés para aplicaciones terapéuticas, donde se incluyen los láser rojos de rubí y de helio-neón y los infrarrojos de semiconductores. El infrarrojo más lejano, de nuevo con escasa penetración, será la gama apropiada para las aplicaciones superficiales de gran potencia, como son las aplicaciones quirúrgicas del láser de CO_2 (85).

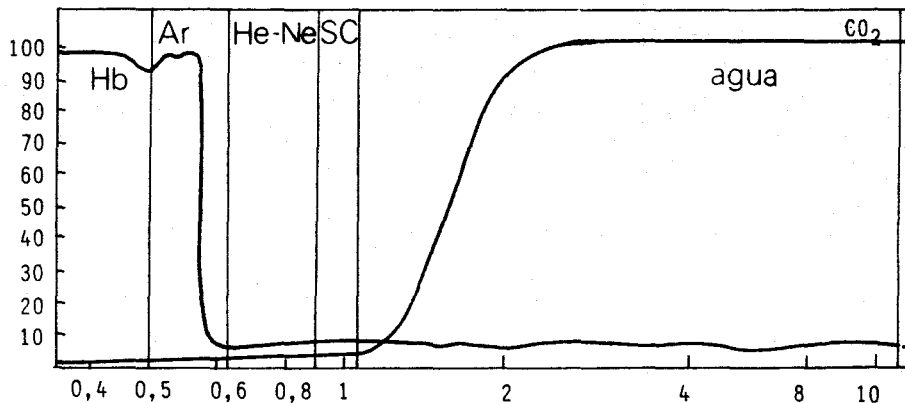


Fig. 43.- La absorción de la radiación láser por los tejidos depende de la longitud de onda de la radiación y de la composición química de los tejidos, entre otros factores. En abscisas, longitud de onda de la radiación láser, en micrómetros; en ordenadas, porcentaje de absorción de la radiación láser. La acción combinada de la gran absorción debida a la hemoglobina hasta los 0,6 micrómetros, y la debida al agua a partir de los 1,5 micrómetros, presentan la "ventana" de máxima penetración de los láseres terapéuticos entre 0,6 y 1,5 micrómetros (Zaragoza JR y Rodrigo P) (85).

b) Sección del haz. Usando lentes o fibras ópticas, la luz láser puede concentrarse o difundirse sobre la superficie de incidencia. El uso de fibras ópticas para la transmisión de la radiación láser tiene como consecuencia la pérdida de un porcentaje de la energía surgida del emisor.

c) Angulo de incidencia. La máxima penetración de la radiación láser sobre una superficie se consigue cuando dicha superficie está situada de forma perpendicular al haz de radiación.

d) Frecuencia e intensidad del haz. La radiación absorbida en una determinada profundidad está en proporción directa con la energía aplicada, de modo que si queremos aumentar la energía absorbida debemos

aumentar la energía de aplicación o energía incidente, moviéndonos siempre dentro de los límites terapéuticos.

La intensidad de la radiación condiciona, conjuntamente con la transparencia del tejido irradiado a la frecuencia de la emisión (penetración y difusión), la cantidad media de energía disipada por unidad de superficie y de tiempo y, por lo tanto, establece el efecto calorífico. Por debajo del límite superior destructor, peligroso para los tejidos, la rapidez de la acción fotobiológica de la emisión está en función de su intensidad por unidad de superficie (Richard P, 1984) (87).

La frecuencia determina el nivel de absorción de las radiaciones por parte de los distintos constituyentes texturales y, por ello, condiciona la profundidad de penetración. Las radiaciones visibles y en el infrarrojo próximo son poco absorbidas por el agua (la cual representa cerca del 70% de la materia biológica). Las radiaciones verdes del láser de argón son absorbidas enteramente por la hemoglobina. Por el contrario, las radiaciones láser emitidas en el rojo (Helio-Neón, Rubí) y en el infrarrojo próximo (láser de semiconductores y Neodimio-Yag) penetran bastante profundamente en los tejidos (alrededor de 20 a 25 mm para los tejidos conjuntivos y óseos y entre 10 y 15 mm para los tejidos musculares y glandulares) (87).

e) Duración y modalidad de la emisión. Según la fórmula:

$$\text{Energía} = \text{Intensidad} \times \text{Tiempo}$$

manteniendo la intensidad fija, a mayor tiempo de emisión, mayor será la energía aplicada.

La modalidad de la emisión continua, impulsional y/o modulada influencia igualmente el efecto biológico de la radiación (87).

2) FACTORES DEPENDIENTES DE LA SUPERFICIE IRRADIADA

- a) Tipo de superficie
- b) Coloración de los tejidos
- c) Densidad
- d) Composición química

a) Tipo de superficie. Si la superficie de incidencia de la radiación láser es reflectante, caso de aplicación de cremas, habrá una pérdida de la energía incidente (ya que parte de la energía incidente es reflejada), siendo menor la radiación absorbida o eficaz (Fig. 44).

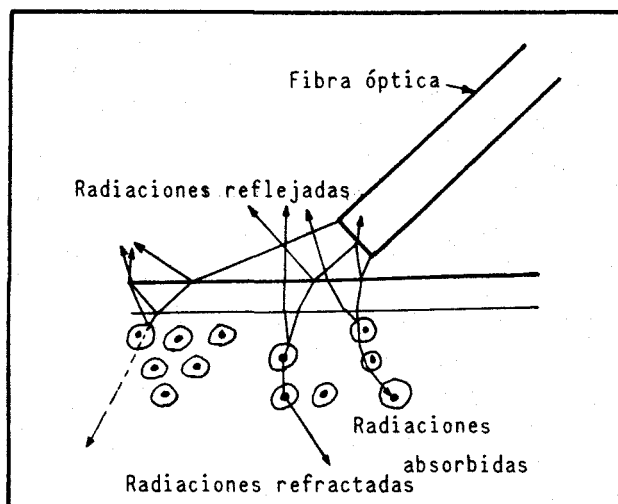


Fig. 44.- Penetración de las radiaciones luminosas en los tejidos (Richard P) (87).

b) Coloración de los tejidos irradiados. La radiación láser es absorbida en mayor proporción por estructuras del color complementario al de la emisión láser, mientras que si la estructura es del mismo color que la radiación, ésta se absorberá poco. Así la función clorofílica de las plantas es realizada en función de la fracción roja del espectro solar, al poseer un máxima penetración de la longitud de onda correspondiente al rojo y reflejando el color complementario, el verde.

En base a la mayor o menor absorción de energía por una estructura dependiente del color de ésta y de la radiación láser incidente, se ha propuesto utilizar pigmentos para colorear tejidos y poder así aumentar la energía absorbida por éstos.

En este apartado es interesante comentar la acción del láser verde de Argón en el tratamiento de los hemangiomas.

c) Densidad. Las partes blandas dejan pasar a su través la radiación con mucha mayor facilidad que las zonas compactas, como puede ser el hueso, en el que la profundidad de penetración es mínima, de 0-0,5 mm.

d) Composición química. Para los láser del espectro visible la absorción es mínima para el agua tisular y máxima para la hemoglobina. Pero las energías de los láser infrarrojos, sobre todo el de CO_2 , son absorbidas en gran propoción por el agua y menos por la hemoglobina; al ser absorbida por el agua, la volatiliza rompiendo la célula en el caso de que este agua sea intracelular. Estos son los láser utilizados en cirugía.

PARTE 3ª.-EFFECTOS DE LA RADIACION LASER Y SUS APLICACIONES

1.-EFFECTOS BIOLOGICOS. EFFECTOS PRIMARIOS O DIRECTOS

1) Efecto foto/bioquímico

Las reacciones fotoquímicas conducen normalmente a la activación de las moléculas del tejido irradiado por la captura de energía. Esta captura es la primera fase de una reacción química.

Con el láser, se ha constatado que algunas de estas reacciones pueden ser francamente anormales o presentarse como exageraciones de procesos normales (86).

Las principales formas de reacción que pueden darse están esquematizadas en la Fig. 45.

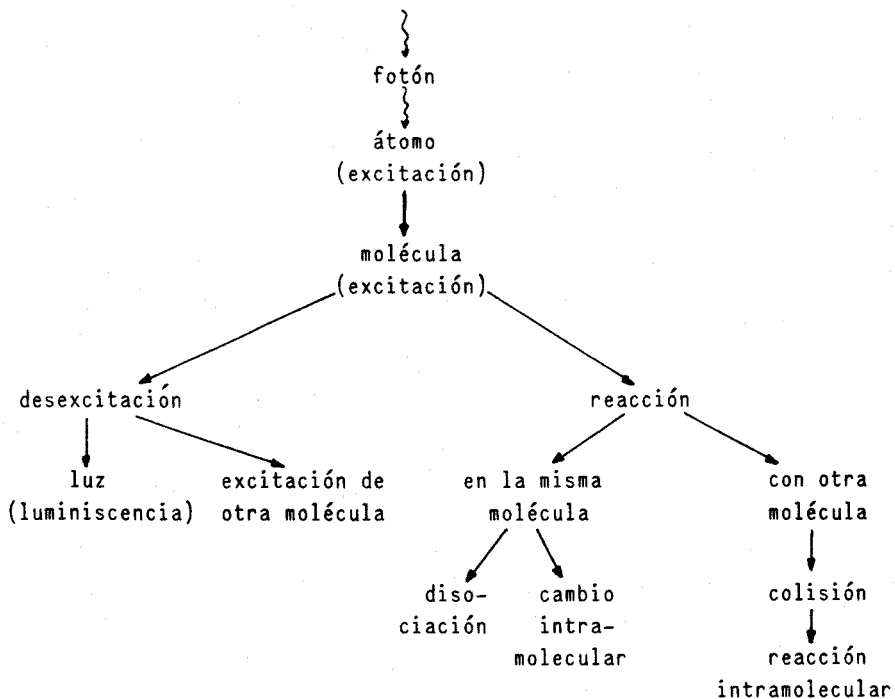


Fig. 45.- Secuencia de los efectos que puede producir la absorción atómica de unos o varios fotones (Zaragoza JR y Rodrigo P) (85).

Los átomos del tejido, en estado energético estable, son excitados por la llegada de un fotón que le aporta una energía, provocando el salto de un electrón a una capa de mayor nivel energético; las nuevas configuraciones atómicas pueden traer consigo modificaciones en las uniones atómicas, con posibilidad de ionización y formación de nuevas moléculas.

Las moléculas que han adquirido un estado energético superior pueden desprender esta energía en tres formas posibles:

- 1- mediante la reemisión de fotones con una longitud de onda igual o diferente (efecto Raman en este último caso).
- 2- aceleración de reacciones y procesos químicos que tengan lugar en el tejido irradiado.
- 3- provocando un incremento de la vibración molecular, incrementándose a su vez los choques y roces moleculares, generando calor, pudiendo así provocar la vaporización de las estructuras y su paso al estado de plasma ionizado

La acción bioquímica de la radiación láser a nivel tisular podría concretarse en:

- a) liberación de autacoides o sustancias preformadas intracelulares con acciones específicas: histamina, serotonina, bradiquinina, etc.
- b) aceleración de determinados procesos metabólicos: síntesis de ATP y de ADN, síntesis proteica, efecto fibrinolítico, producción de colágeno (85).
- c) retardo o disminución de determinados procesos metabólicos: síntesis de las prostaglandinas, actividad de endoperoxidasas en sangre (85).

2) Efecto térmico

Los efectos térmicos están unidos a la absorción por el tejido irradiado de la energía luminosa del láser. Esta absorción es variable según la longitud de onda y según la composición tisular. La elevación de la temperatura puede no estar localizada únicamente en la zona irradiada, sino que puede difundirse ya que las moléculas se transmiten

unas o otras la energía cinética (86).

Los fotones que penetran en los tejidos transfieren su energía a las moléculas de la materia que aumenta la intensidad de los movimientos vibratorios y libera calor. Esta elevación térmica es superior con un láser cuya densidad energética pueda focalizarse en una superficie mínima. Pero este efecto térmico depende del grado de absorción de la radiación por el medio biológico (86).

Otros parámetros biológicos como la constitución bioquímica de los elementos y de los líquidos celulares o la disposición de las estructuras histológicas, modifican también los caracteres de la transformación luminosa (86).

Ciertos tejidos cargados de melanina, que tienen un alto grado de absorción, son prácticamente sensibles al efecto térmico, mientras que otros permanecen indemnes cuando son alcanzados por la radiación laser.

Diferentes constituyentes químicos, como la hemoglobina, tienen una absorción selectiva para las radiaciones azules y verdes. La repartición calórica depende también de la homogeneidad de los tejidos y de su conductibilidad térmica (86).

Así, la heterogeneidad de la estructura de la piel puede entrañar una difracción interna de las radiaciones ópticas en las diferentes capas celulares. Se admite que con las potencias normales de la radiación láser en la gama de 300 a 1.000 nm, el 99% de las radiaciones que penetran en la piel son absorbidas en los 3,6 mm primeros del tejido (86).

La potencia energética y la duración de exposición juegan un papel esencial y pueden provocar reacciones biológicas particulares.

Por ello, una emisión de breve duración y bien focalizada se traduce por una absorción rápida y localizada, capaz de elevar la temperatura hasta el punto de llevar a ebullición el agua intracelular. La producción de vapor que resulta puede, entonces, hacer estallar las células o alterar ciertos constituyentes. A veces, como con los láser de impulsos (donde la emisión es particularmente breve), la vaporización del plasma tisular puede literalmente repeler, con un efecto dispersante, una gran parte de la energía incidente y llegar incluso a reducir la cantidad de radiación absorbida por los tejidos (86).

El efecto térmico puede provocar desnaturalizaciones proteicas. El aporte de energía por el láser modifica las energías moleculares. Esto se traduce por modificaciones de su estructura. Así, si se considera una molécula proteica compleja, se admite que está compuesta de una serie de aminoácidos con uniones entre ellos que condicionan una estructura lineal, la estructura primaria. A nivel de los aminoácidos existen lugares que pueden interaccionar, induciendo la reorganización espacial de la molécula (plegado, enrollamiento, estructuras secundarias, terciarias). El aporte de energía láser puede modificar estos sitios y dar una nueva configuración de la proteína, o una rotura en elementos más simples, pudiendo ellos mismos reorganizarse de forma diferente (86).

Estas perturbaciones pueden extenderse a distancia si se considera una membrana biológica formada por una organización celular de moléculas unidas entre ellas, perturbando algunas moléculas de esta construcción e induciendo reorganizaciones de las moléculas vecinas, un poco a la manera del juego de bolos (86).

3) Efecto biomecánico

En los átomos de un medio material, bajo el efecto de la luz, el retorno al nivel fundamental de un electrón llevado a un nivel excitado por absorción de un fotón incidente, puede traducirse por una transición radiactiva, caracterizada por la difusión de un fotón de energía inferior al fotón incidente, y con una transición elástica, debido a la puesta en juego de una cantidad elemental de energía elástica, el fonón, susceptible de acarrear una vibración del medio (86).

Esta interacción particular se llama efecto Brillouin (86).

Cuando un haz láser atraviesa un medio, la concentración elevada de los fotones incidentes y su coherencia entrañan esta difusión Brillouin, también coherente, que se traduce por la emisión de fonones estimulados de gran energía, llamados hipersones (86).

Estos últimos pueden ser el origen de los efectos destructivos en diversos medios y a nivel de ciertas estructuras tisulares. Es así que tras la exposición de la piel a una emisión láser se pueden constatar en profundidad lesiones histológicas más importantes que las observadas en la superficie del revestimiento cutáneo y que estarían causadas por una

onda de choque, producto de la interacción láser con el tejido (Fine S; Klein E, Maiman Th y Scott RE; 1964) (88).

La estructura histológica del órgano juega un papel según que las células estén más o menos fuertemente unidas entre ellas. La forma del órgano interviene también porque los efectos no son los mismos según sea el órgano plano (como la piel) o esférico (como el ojo) (86).

En el globo ocular, el haz láser atraviesa varios tejidos muy diferentes unos de otros, particularmente a nivel de la interfase vítreo-retiniana.

4) Efecto bioeléctrico

Según Granier y Kellesohn (Granier R y Kellesohn C, 1968) (89), los láser permiten obtener densidades energéticas excesivamente elevadas, a las cuales corresponden campos eléctricos locales que aseguran la cohesión electrónica de la materia (10^{-8} a 10^{-12} V por metro).

El paso en un medio material de la oscilación láser perturba, pues, la corteza electrónica de los átomos de la materia irradiada y altera las constantes físicas de los medios atravesados, como la conductividad o la constante dieléctrica (86).

Estas perturbaciones pueden ser también el origen de diversos efectos químicos (orientación de moléculas anisotrópicas, producción de radicales libres, etc.), que son capaces de producir consecuencias biológicas, como desórdenes funcionales tisulares (86).

La permeabilidad de la membrana celular y la diferencia de concentración de iones a ambos lados de la misma se modifica por una diferencia de potencial eléctrico, la radiación láser invierte el potencial de membrana produciéndose una difusión química en sentido contrario a la tendencia eléctrica, con un intercambio iónico hasta conseguir de nuevo el equilibrio, produciendo la normalización del potencial de membrana en los casos en que se presente alguna alteración del mismo (85).

5) Efecto bioenergético

Si nos basamos en la existencia de una comunicación intercelular de fotones de luz coherente, el láser no sólo sería un forma de energía

apta para ser absorbida selectivamente por una célula enferma, sino que también sería portador de un "mensaje" específico para estimular su normalización (85).

6) Efectos a nivel celular

Son efectos secundarios a los anteriormente descritos y es a este nivel donde se hace patente otro efecto de la radiación láser: su capacidad bioestimulante.

Valoración realizada primero por los cirujanos al observar el incremento de la capacidad de regeneración de las incisiones quirúrgicas realizadas con láser bisturí.

- acelera los tiempos de mitosis. El láser estimula la división celular de aquellos tejidos que la tienen detenida; por el contrario, actúa retardando la multiplicación celular en tejidos en las que está aumentada.

Machuca (Machuca J, 1983) (90), irradiando el meristemo terminal de la Allium Cepa con láser He-Ne durante 5 min, encuentra un fuerte descenso inicial del índice mitótico, que se acentúa a las 6 horas y que comienza a recuperarse sobre las 24 horas. Parece haber una pérdida de sincronismo algún tiempo después de la irradiación con láser.

- aumenta la producción de ácidos nucleicos, con un incremento de la síntesis proteica; para Machuca (90), se produce una inactivación temporal del ADN, sobre todo en la fase S de la mitosis, recuperándose posteriormente con el tiempo.
- estimula la transformación mitocondrial de ADP en ATP.
- aumenta el metabolismo celular, con un incremento de la velocidad de incorporación de glicina y prolina.
- estimula la actividad fagocitaria de las polimorfonucleares y macrófagos.
- incrementa la concentración celular de glucógeno.
- modula actividades enzimáticas.

Se han realizado numerosos experimentos de estimulación con luz láser de baja potencia de diferentes estructuras tisulares.

La estimulación con láser He-Ne de baja potencia durante 5 min. en una sólo dosis de las células adenohipofisarias, actúa sobre la ciclosis celular, manteniéndose esta acción a lo largo de 41 días después de la aplicación y manifestándose por variaciones morfológicas en el tamaño, número y forma del núcleo y de las organelas protoplasmáticas. Estas variaciones morfológicas se corresponden con modificaciones en las tasas de aminoácidos esenciales y no esenciales, en los que interviene en el ciclo de Krebs, así como en los que forman parte de las hormonas anterohipofisarias (Smith-Agreda V, Ferres Torres E y Renovell Martinez A; 1985) (91).

Villaplana Torres (Villaplana Torres LA, 1985) (92), estimula con láser He-Ne de baja potencia (5 mW) la anterohipoófisis en animales experimentales y revela signos de "hiperactividad global inespecífica", un día después de la experiencia, como son: un aparato de Golgi bien desarrollado, abundantes mitocondrias y gránulos secretores y un predominio de la eucromatina en el núcleo. Entre las células hipofisarias encuentra la llamada "célula de la irradiación, de la castración o vacuolada", siendo ésta la consecuencia de la activación inespecífica global de la glándula producida por la energía emitida por el láser y que se manifiesta por dilatación del retículo endoplásmico rugoso. Estos fenómenos de hiperactividad continúan hasta los 21 días después de la irradiación, donde encuentran una "actividad reconstructora proteica celular", que se manifiesta con nucleolos situados junto a la carioteca, gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas y mitocondrias y un aparato de Golgi muy evidente.

También se ha estudiado los posibles efectos secundarios inmediatos o tardíos por la irradiación de la glándula tiroides a la que se aplicó dosis de radiación láser He-Ne semejantes a las máximas empleadas en terapéutica, mostrando al término de la irradiación evidencia de lesiones de moderada intensidad en un porcentaje de folículos inferior al 10% del total, observándose a microscopio óptico abundante edema intersticial, necrosis y descamación de las células foliculares, y al microscopio electrónico notable tumefacción del retículo endoplásmico y de las mitocondrias, ligero aumento de fagolisosomas y alteración de microvillis. Las células más degeneradas muestran una marcada picnosis nuclear (Rodrigo P, Lerma E y Zaragoza JR; 1985) (93).

El estudio a los tres meses mostró reparación parcial de las lesiones (normalidad del retículo endoplásmico con desaparición del edema, aumento de fagolisosomas y recuperación de los microvillis), así como muy discreta fibrosis. No se observó afectación funcional de la glándula, concluyendo que las lesiones observadas son poco intensas y separables en el tiempo (93).

Igualmente se ha estudiado los posibles efectos que el láser de infrarrojos ejerce sobre la espermatogénesis y, especialmente, sobre los complejos fenómenos de división celular, mitosis y meiosis, que tienen lugar en el epitelio seminífero. Para ello, Porras y cols. (Porras MD, Bermúdez DT, Parrado C, Pelaéz A, Vidal L y Pérez de Vargas I; 1986) (94), aplican durante 15 días, a una sesión diaria de 5 min, dosis de 3,12 Julios/cm² /día de radiación láser infrarrojos de 904 nm, a una frecuencia de 800 Hz y un potencia pico de 6,5 mW, encontrando que la irradiación láser origina en el epitelio germinal una aceleración del ritmo mitótico de las espermatogonias y la formación de numerosos cuerpos residuales y figuras degenerativas. Asimismo, estos resultados indican que el láser de infrarrojos provoca un aumento reversible del número de células germinales (94).

Cuando se irradia la retina de pollos adultos durante 5 min con un láser infrarrojo de 904 nm de longitud de onda y un potencia pico de 5 W, se observan alteraciones en todos los segmentos externos de los fotorreceptores y la degeneración de los núcleos de algunos conos, resaltando la existencia de alteraciones en la retina, quizás irreversibles, tras exposición al láser en períodos de tiempo sumamente cortos (Armengol JA, Crespo JC, Zaragoza JR y Génis-Gálvez JM; 1983) (95).

Los posibles efectos teratógenos de la radiación láser de baja potencia han sido estudiados por Puchades-Orts y cols. (Puchades-Orts A; Sanchez del Campo F, Pachón Ruiz A, Ferrés-Torres E y Smith-Agreda V, 1984) (96), quienes irradian embriones de pollo a distintos estadios evolutivos con un láser He-Ne de 632 nm, con una potencia de 2,5 mW durante 5 min, obteniendo múltiples malformaciones en la mayoría de los embriones irradiados (más del 90% del total), siendo más manifiestas y generalizadas cuanto más precoz era el estadio en el que se hizo la irradiación. Entre las malformaciones encontraron:

- retraso en el crecimiento.

- alteraciones generales de su morfología.
- hipoplasia cefálica.
- ausencia de esbozos de extremidades.
- anoftalmía y microftalmía.
- anomalías somáticas, etc.

Por lo que es evidente que la acción teratógena de la luz láser de 632,8 nm debe tener su origen en modificaciones de estructuras moleculares que intervienen básica y activamente en el desarrollo embrionario, bien ADN o ARNm. (96).

Estos mismos autores estudian las malformaciones oculares en embriones de pollos irradiados con el mismo tipo de láser, a una potencia de $0,1 \text{ w/cm}^2$ durante 5 min, encontrando muerte de embriones en las primeras 48 horas y alteraciones en el desarrollo ocular del resto, entre las que se encuentran: anoftalmía y microftalmías, retinas con gran desarrollo de sus hojas y muy replegadas y cristalino situado en el polo posterior (Puchades A, Sanchez F, Pachón A, Ferres E y Smith V; 1984) (97).

Los resultados muestran una acción teratógena de la luz láser empleada, siendo difícil interpretar el posible mecanismo de dicha radiación ya que la densidad de potencia utilizada es baja ($0,1 \text{ W/cm}^2$) e insuficiente para producir efectos térmicos.

Por otra parte, la energía de los fotones utilizados está muy lejos de ser la necesaria para producir ionizaciones similares a las generadas por los rayos X o de acción teratógena conocida. Ello hace suponer que son las características inherentes a la luz láser, fundamentalmente su coherencia y los denominados genéricamente efectos no lineales, los responsables de tales malformaciones (97).

2.-EFECTOS FISIOLÓGICOS. EFECTOS SECUNDARIOS O INDIRECTOS

Se producen dos importantes acciones íntimamente relacionadas: el aumento del trofismo celular y el estímulo de la circulación capilar.

El aumento del trofismo celular y tisular se realiza precisamente por la acción bioquímica y bioestimulante de la radiación láser. Se sabe, por diversas experiencias, que el láser aumenta la cantidad de ATP celular (Benedicenti A, Martino AR; 1983) (98). De la misma manera hay una

aceleración general de todas las reacciones metabólicas celulares. Unido a esto, junto al estímulo circulatorio hay, a la vez que el propio estímulo celular estímulo celular, un aumento de aporte de metabolitos unido a una eliminación más rápida de los catabolitos; en suma, una potenciación de las condiciones necesarias para mejorar el trofismo de la célula sana y, aún más, de la célula lesionada (98).

El estímulo de la microcirculación se debe igualmente al efecto bioquímico de la radiación láser, posiblemente por la liberación de sustancias vasoactivas. Este efecto sobre el flujo capilar modifica la presión hidrostática del mismo, ejerciendo un efecto positivo en la reabsorción de edemas localizados; al incrementar el aporte nutricional favorece el metabolismo celular.

Miro y cols. (Miro L, Coupe M, Charras C, Jambon C y Chevalier JM; 1984) (99), en un estudio capilaroscópico de la acción de un láser de arseniuro de galio (As-Ga) de una longitud de onda de 850 nm y con una potencia pico de 120 mW, establecieron que en el adulto sano, la irradiación láser entraña una aceleración del flujo sanguíneo, constatando una reabsorción progresiva del edema con un restablecimiento más o menos rápido de la circulación sanguínea. Finalmente, en un dedo sano en estado frío, el láser produjo un aumento claro y perdurable de la vasomotricidad.

La radiación láser acelera la regeneración del nervio lesionado. En este sentido se describe la alteración y modificación de la bioquímica del nervio, haciendo especial hincapié en la oxidación glucosídica instaurada en condiciones patológicas, que puede ser corregida con el uso de la luz coherente del láser, estimulando la actividad mitocondrial con aumento de la colinesterasa y demostrando la aceleración de algunos tipos de nervios aislados experimentalmente (Milani J, 1985) (100).

El soft-láser, o láser de baja potencia, posee un notable efecto antiálgico, parece ser que facilitando la liberación de endorfinas y bloqueando la transmisión del estímulo nervioso doloroso por producir una estabilización de la membrana celular.

3.- APLICACIONES MEDICAS DE LA RADIACION LASER

Con el láser, los biólogos y los médicos disponen de una fuente de efecto lumino-térmico intenso, cuyo haz es particularmente directo y

fácilmente localizable y cuya duración de impulso puede ser breve (10 seg), o prolongado durante algunos segundos.

Diferentes aplicaciones tecnológicas han permitido aplicaciones prácticas en biología (citología y microbiología), pero también en medicina (dermatología, cirugía general y especial, oftalmología, etc.) y en cancerología.

La oftalmología es la disciplina que más ha interesado a la radiación láser ya que sobre el millar de trabajos científicos publicados entre 1963 y 1966, más de la mitad de las comunicaciones estaban dedicadas a los efectos del láser sobre las estructuras oculares.

1) BIOLOGIA

Las aplicaciones en esta ciencia se concretan esencialmente en la citología y la microbiología.

Varios experimentos han demostrado el interés del láser para modificar la reparación celular, procediendo selectivamente sobre uno de los factores que la regulan.

Es así que irradiando un cultivo de células con un láser de 1 microw, emitiendo a 530 nm, se aprecia un descenso en la tasa de la respiración celular de más del 60% por inhibición del citocromo B, que es selectivamente sensible a la longitud de onda de la emisión (86).

También se puede obtener y observar la destrucción total o parcial de una célula en el seno de un cultivo de tejidos y estudiar los fenómenos de fagocitosis de las células lisadas observando su comportamiento respecto a células indemnes (86).

Las alteraciones selectivas de las organelas intracelulares han permitido modificar la mitosis, la síntesis de ADN y ARN.

También ha sido posible realizar medidas de los ácidos nucleicos en el interior de una sola células tras la inyección de un colorante específico del ADN. La irradiación con láser rojo fluorescente es el colorante y la medida energética de esta luz fluorescente determina la tasa del ADN de la célula (86).

Los láser microfluorométricos que facilitan el estudio de las células puede, por otra parte, tener un interés clínico, especialmente en el diagnóstico citológico de los cánceres de cuello uterino (86).

También se ha podido apreciar la vitalidad de los espermatozoides para la medida objetiva, precisa y rápida de su movilidad (86).

2) CIRUGIA Y ESPECIALIDADES QUIRURGICAS

Las aplicaciones en cirugía se han acrecentado considerablemente desde los resultados obtenidos en cirugía experimental utilizando el láser como bisturí en ciertas disciplinas quirúrgicas.

Tras los ensayos isnfructuosos con el láser de rubí, la realización en Israel y en la URSS de un láser de bisturí de CO_2 (emitiendo en el infrarojo de $10,6 \mu$) y su utilización en los animales y en ciertas intervenciones quirúrgicas, ha permitido constatar varios fenómenos. El efecto de corte es excelente ya que entraña una zona de corte de sólo $0,6 \text{ mm}$ sobre los bordes de la incisión (inferior a la del bisturí eléctrico); la cicatrización se efectúa más rápidamente, siendo ésta más flexible y de mejor calidad; la sobreinfección está habitualmente ausente. Por contra, el efecto hemostático es frecuentemente insuficiente, necesitando el complemento de un hemostático (86).

Por ello se han buscado otros láser (Argón y Yag) para paliar este defecto, pero aunque mejoran los resultados de la hemocoagulación, se ha comprobado que la calidad de la sección es mediocre. Por lo tanto, son necesarias nuevas investigaciones para obtener una acción conjugada y constante, interesándose también por el eventual efecto biológico sobre los parénquimas afectados, unido al campo electromagnético que induce el láser (y particularmente las perturbaciones en la transferencia iónica Na^+/K^+ a nivel de las membranas celulares (86).

Con el láser se han obtenido resultados favorables en cirugía general (hepatectomía reglada), en urología (nefrectomía parcial), en neurocirugía (tumores cerebrales con la reserva de la evolución ulterior y de posibles reacciones) y en ginecología (afecciones uterinas) (86).

En gastroenterología, el láser de Argón o Nd-Yag, adaptado a las técnicas de la endoscopia por fibroscopia, da la posibilidad de asegurar, bajo control visual, la hemostasia o la ablación de pequeños tumores,

pero también la destrucción de zonas hemorrágicas de la enfermedad de Rendu-Osler o de varices esofágicas. Se ha estimado que esta fotocoagulación por endoscopia es un método eficaz y seguro, permitiendo tratar la mayoría de las lesiones digestivas hemorrágicas (86).

En otorrinolaringología, mediante un láser de CO₂ combinado con un laringoscopio, se ha tratado eficazmente la papilomatosis laríngea, sin las complicaciones vocales inherentes a la traqueotomía y con reducidas duraciones de hospitalización. La misma técnica está también indicada para el tratamiento de nódulos y de pólipos de las cuerdas vocales, de laringitis crónicas sospechosas, de amigdalitis recidivantes y de las lesiones del árbol traqueobronquial (86).

Igualmente se estima poder realizar con un láser de Nd-Yag ciertas intervenciones a nivel del oído medio e interno.

En estomatología, la posibilidad de destruir una caries dental ha sido demostrada clínicamente con un láser de impulsos, pero la liberación de ondas de choque a nivel de una cavidad semicerrada destruye el paquete vascular pulpar, que reduce el interés de esta indicación e incita a utilizar un láser de emisión continua, donde la producción de ondas de choque es despreciable (86).

También en cirugía cardiovascular, la destrucción del fascículo de His en experimentación animal mediante el láser de Nd-Yag, ha tenido buenos resultados, por lo que el láser de Nd-Yag parece, pues, una técnica fiable y constituye una nueva solución terapéutica en el tratamiento quirúrgico de las arritmias (Mesnildrey P, Goudot B, Dubois C y cols; 1984) (101).

En cirugía pulmonar, el tratamiento con Nd-Yag láser es más beneficioso en pacientes con lesiones intratraqueales y de bronquios principales parcialmente obstruidos que en lesiones totalmente obstruidas (Gelb AF, Epstein JD y Shanberg AM; 1985) (102).

Los láser de CO₂, rubí, argón, y Nd-Yag, han sido usados con éxito en oftalmología, neurocirugía, cirugía plástica, gastroenterología, neumología, dermatología, ginecología y urología (102).

3) CANCEROLOGIA

Los resultados obtenidos por la fotocoagulación de xenón han incitado a buscar los efectos del láser sobre las neoformaciones malignas.

Ciertos resultados han sido considerados como positivos, pero otros parecen menos alentadores y actualmente conviene considerar este tratamiento con prudencia (86).

4) MEDICINA

Los principales efectos terapéuticos de la radiación láser pueden explicarse según algunos de los mecanismos anteriores, o por la acción conjunta de varios ellos. Los fundamentales efectos terapéuticos son los derivados de su acción trófica y su acción analgésica-antiinflamatoria.

a) Acción trófica

Actualmente se utiliza en forma extensa en dermatología y en cirugía plástica varios tipos de láser, particularmente para el tratamiento de lesiones vasculares y pigmentadas. Un campo relativamente nuevo para la aplicación del láser es el de sus posibles efectos biológicos.

Los láser de longitudes de onda y densidades específicas modifican el metabolismo del tejido conectivo por medio de los fibroblastos de la piel, tanto "in vitro" como "in vivo" (Abergel RP, Lam TS, Lask G y cols; 1986) (103). Específicamente, el láser de Neodimio-Ytrio-Garne (Nd-Yag), resulta capaz de suprimir de forma selectiva la producción de colágeno, tanto en los cultivos de fibroblastos como en la piel normal "in vivo" (Fig. 46); lo que sugiere que este láser puede ser útil en el tratamiento de los estados fibróticos, tales como queloides, cicatrices hipertróficas, verrugas, queratosis, epitelomas circunscritos cutáneos y ciertas formas de telangiectasias, siendo también muy eficaz para hacer desaparecer los tatuajes voluntarios o accidentales (86), (103).

Además, dos aparatos láser de baja potencia, los de He-Ne y As-Ga, muestran poder estimular la formación de colágeno en los cultivos de fibroblastos de la piel humana (Fig. 47), lo que sugiere que tales láser podrían utilizarse para mejorar el proceso de curación de las

heridas (103).

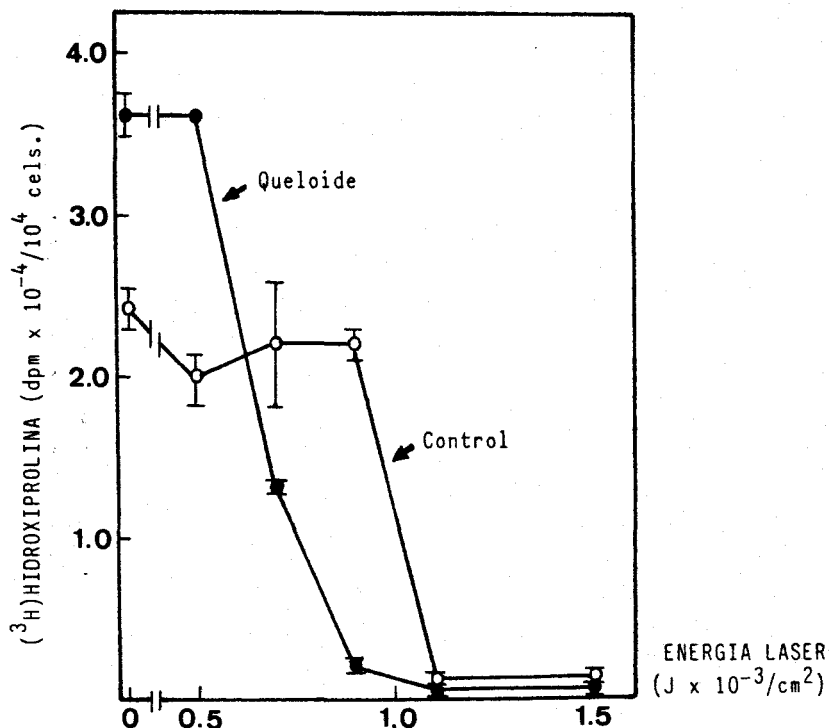


Fig. 46.- Inhibición de la síntesis de colágeno en cultivos de fibroblastos de controles de piel humana y de tejidos queloideos, debidos al láser de Nd:YAG. Los fibroblastos queloideos son más sensitivos ante el láser y muestran una notable reducción de la síntesis de colágeno (Abergel RP y cols.) (103).

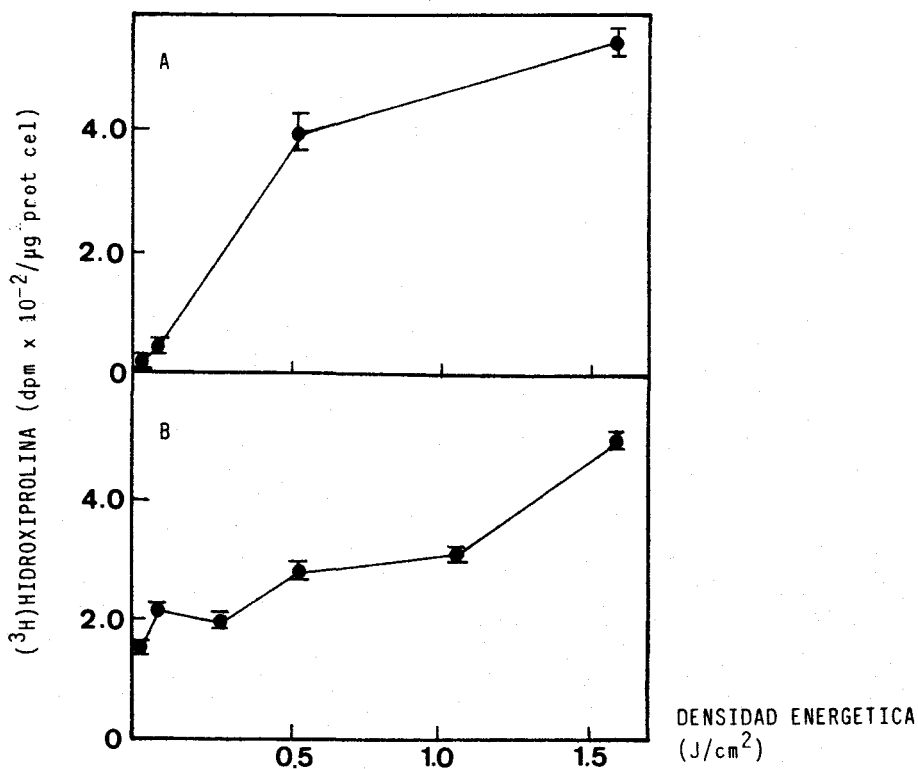


Fig. 47.- Estimulación de la producción de colágeno en cultivos de fibroblastos de piel humana por medio del láser He-Ne. Las células se sometieron al láser He-Ne y se ensayó la síntesis de ³H-hidroxi prolina, como índice de la producción de colágeno.

A: línea celular sometida al láser He-Ne una sesión diaria durante tres días.

B: línea celular sometida al láser He-Ne una sesión diaria durante cuatro días (103).

Específicamente, los láser de baja potencia han demostrado poder favorecer la curación de las heridas tanto en seres humanos como en animales (Mester E, Spiry T, Szende B y Tota J; 1971) (104), debido fundamentalmente al incremento de vascularización que produce la radiación láser. Este aumento significativo en el desarrollo de la circulación sanguínea regenera el tejido activando la cicatrización (Mester E, Trelles MA, Mester A y Mayayo E; 1983) (105).

En este proceso de activación de la cicatrización se observa:

- aumento de fibras colágenas
- disminución de la sustancia celular (citoplasma) y de la sustancia intercelular
- aparición de vesículas intranucleares e intracitoplasmáticas de áres densas
- aumento intranuclear de lisosomas y del volumen de la mitocondria
- aumento en el espacio intercelular del colágeno y del edema

Estudios con microscopía electrónica revelan que en la formación de colágeno es donde el láser actúa primariamente para estimular la curación de las heridas (105).

También la radiación láser actúa en los procesos enzimáticos que se realizan en la fase temprana de curación de las heridas, observándose en los bordes de las lesiones y en el epitelio basal un aumento de ácido succínico-dexidrogenasa, de ácido láctico-dexidrogenasa y de enterasas no específicas, que son las que aumentan la síntesis de colágeno por estímulo de la función de los fibroblastos (105).

Por todo ello se está usando el láser de baja potencia para estimular la cicatrización, sobre todo en pacientes con úlceras crónicas reistentes a la curación (105).

Igualmente se han apreciado otras acciones tróficas en los láser de baja potencia, como la regeneración de nervios traumatizados, estimulación del crecimiento capilar o estimulación de la osteogénesis. En esta última acción, Rodrigo P y cols. (Rodrigo P, Zaragoza JR e Iturrate C; 1985) (106), trataron un caso de osteomielitis con radiación

láser He-Ne de 7mW de potencia a una dosis de $0,5 \text{ J/cm}^2$ dando una sesión diaria durante 1 semana y, posteriormente, en forma alterna hasta un total de 16 sesiones, apreciándose desde los primeros días un estímulo de la cicatrización, obteniéndose la cicatrización completa aproximadamente a los 3 meses de iniciar el tratamiento.

El tratamiento con láser He-Ne de 632 nm y láser As-Ga de 904 nm del herpes simple recidivante y herpes zoster ha permitido evidenciar que la laserterapia acorta extraordinariamente el curso evolutivo de la enfermedad (Trelles MA, 1982) (107), mejorando rápidamente la sintomatología a las dos o tres irradiaciones, observándose que las secuelas, tanto cicatriciales como neuríticas, son prácticamente nulas en el herpes zoster. En el herpes simple recidivante se consiguieron curaciones controladas de hasta 2 años, en un tanto por ciento de casos que oscilaba entre el 80 y 95% (Fig. 48) (Cisneros JL y Trelles MA, 1984) (108).

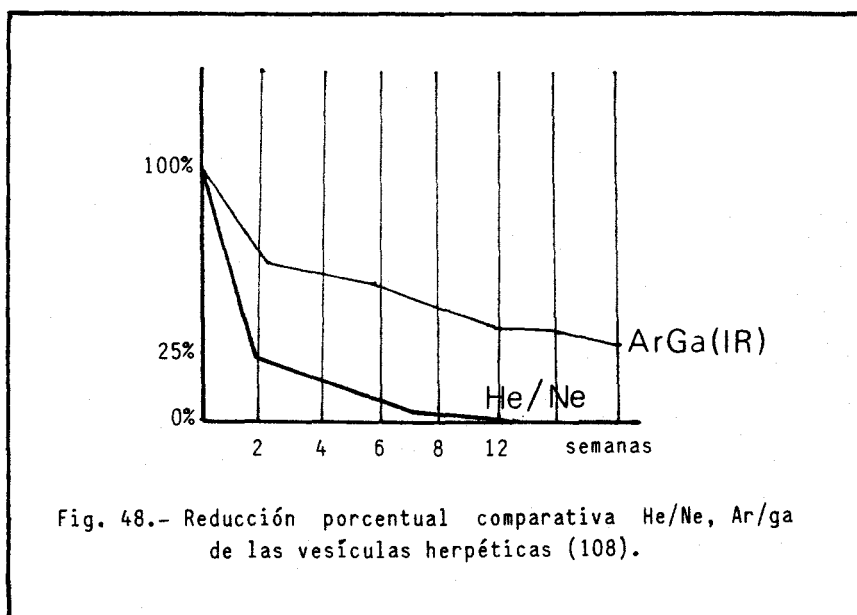


Fig. 48.- Reducción porcentual comparativa He/Ne, Ar/ga de las vesículas herpéticas (108).

El láser, entre otras posibles acciones, aumentaría la inmunorrespuesta, lo que justificaría la consideración de que esta terapia puede tener aplicaciones más generales en el tratamiento de otros tipos de enfermedades víricas.

b) Acción analgésica-antiinflamatoria

Es uno de los efectos terapéuticos más extendidos. La acción

terapéutica de la soft-láser está en función de los tre parámetros siguientes:

a) Frecuencia.— En el tratamiento de los dolores será necesario, generalmente, escoger un láser cuya radiación sea lo suficientemente penetrante para llegar a la zona requerida. El láser He-Ne, el láser de semiconductores y el láser Neodimio-Yag, cuyas radiaciones son escasamente absorbidas por el agua y por la hemoglobina, parecerían ser los que se adapten mejor a este tipo de fototerapia. Sin embargo, diferentes especialistas opinan que las radiaciones en el infrarrojo próximo ejercen una acción antiálgica propia y particularmente más intensa que las radiaciones rojas (87).

b) Potencia.—Se obtendrán ventajas, en determinados casos, aumentando mediante un sistema óptico la superficie de radiación con el fin de actuar más rápida y profundamente con un láser de potencia más acentuada (Neodimio-Yag), sin que por ello tenga una acción destructora (neuralgias trigeminales y post-zosterianas) (87).

c) Modalidad.—Será preciso, igualmente, adoptar la modalidad de la emisión a la causa del dolor. Los dolores por inflamación reaccionan bien a las radiaciones continuas del láser He-Ne y con las impulsiones de gran frecuencia de los láser de semiconductores y Neodimio-Yag; los dolores de origen trófico parece que se influyen favorablemente con las emisiones de frecuencia media (200 a 400 Hz) del láser en el infrarrojo próximo; también se ven influenciados los dolores debidos a éstasis venosas o linfáticas. Los dolores ocasionados por las vassodilataciones arteriales se calman eficazmente con frecuencias bajas (10 a 20 Hz); los espasmos requieren frecuencias muy lentas (5 a 10 Hz) (87).

El empleo terapéutico de los láser atérmicos puede ser:

- directo, por irradiación dirigida sobre la parte dolorosa.
- indirecto, por irradiación de puntos de transmisión, distanciados de la parte enferma.
- asistido, por inyección previa de colorantes vitales absorbidos específicamente a la frecuencia emitida por el láser (esta técnica se emplea actualmente en cancerología, pero no se utiliza aún en el tratamiento del dolor) (87).

FOTOTERAPIA DIRECTA

* Trastornos tróficos e inflamatorios.

Los resultados de la soft-láser terapia son particularmente favorables cuando los fenómenos álgicos dependen de trastornos tróficos o inflamatorios.

Las radiaciones en el rojo y en el infrarrojo próximo ejercen una acción cicatrizante estimulando la vascularización y la producción de fibras conjuntivas; aumentan la síntesis de colágeno por los fibroblastos, la síntesis de ADN y ARN y la actividad de ciertas enzimas (87).

Miro y cols. (99), pusieron en evidencia la acción sobre la microcirculación.

El efecto antiinfeccioso del láser ultravioleta (láser a nitrógeno) es directo por acción bactericida, pero el del láser rojo e infrarrojo contíguo es indirecto por el aumento del poder fagocitario de los leucocitos.

La secreción de PGE_2 (substancia algógena), disminuye rápidamente después de la radiación láser de úlceras experimentales. Estos resultados están relacionados con una repolarización de la membrana celular en las zonas inflamatorias (87).

* Distonía neurovegetativa

Se disponen de pocos datos fundamentales que justifique el efecto de las radiaciones láser sobre los trastornos neurodistónicos. Las observaciones clínicas indican la acción favorable de la soft-láser terapia directa cuando la sede de la infección es accesible a la irradiación en los casos de:

- Estados hipotónicos:

- tratamiento preventivo y curativo de jaquecas
- tratamiento de los dolores y de la pesadez pelviana por congestión linfovenosa en la mujer

- Estados hipertónicos:

- espasmos viscerales (tratamiento preventivo y curativo de dismenorreas)
- espasmos arteriales (arteritis, etc)

* Neuralgias y dolores postneuríticos

Las funciones electrofisiológicas de los nervios lesionados se ven favorablemente influenciadas por la radiación láser, siendo fuertemente satisfactorios los resultados clínicos obtenidos en la neuralgias postoperatorias y después de la hemorroidectomía. En los dolores postneuríticos, como las neuralgias post-zosterianas, el resultado terapéutico de las radiaciones láser es más incierto (87).

FOTOTERAPIA INDIRECTA

La acción de la laserterapia indirecta sobre las algias frecuentemente proporciona resultados mucho más espectaculares que la terapia directa y permite muchas veces precisar el diagnóstico.

* Neuralterapia

El reconocimiento de las zonas reactógenas es muchísimo más fácil utilizando el láser. El diagnóstico neuralterápico se basa en una prueba terapéutica: la neutralización de una zona reactógena provoca la rápida desaparición (instantánea), total y duradera, de los trastornos que genera. Esta neutralización puede obtenerse por la inyección local de un anestésico o por radiación láser.

Las emisiones láser, en la gama de los 600 a 1.000 nanómetros, reaccionan con las proteínas de estructura provocando desplazamientos electrónicos a nivel de la membrana celular; provocan también perturbaciones mitocondriales, ergastoplasmáticas, ribosomales, etc, que tendrían que tener un efecto estimulante del metabolismo celular y un efecto repolarizante a nivel de la membrana. Una célula turgente cuya membrana está normalmente polarizada no segrega mediadores químicos y no es neuro-perturbante (87).

Esta es una posible explicación de la acción neutralizante de la radiación láser de las zonas reactógenas. Aunque existen otras interpretaciones: la activación de la cadena de los transportadores de electrones intra-mitocondriales y, por ello, de la respiración celular

y de los mecanismos de fosforilación (la citocromo oxidasa es absorbente a 620 nanómetros), etc (87).

* Dermalgia refleja

Existen relaciones topográficas entre la zona infradérmica y los órganos: la detección de las zonas dolorosas (dermalgias) permite obtener un diagnóstico de las alteraciones viscerales. La neutralización de la dermalgia refleja puede obtenerse por inyección local de un anestésico o con la radiación láser.

Los mecanismos de neutralización de las dermalgias reflejas son muy parecidos a los de las zonas reactógenas.

* Acupuntura y auriculoterapia

La penetración de 10 a 15 mm de una radiación láser bajo la piel ha sido aplicada en acupuntura para reemplazar las agujas tradicionales (86).

Las radiaciones láser son generalmente tan eficaces como las agujas y tienen sobre esta técnica la ventaja de ser completamente asépticas, carecer de agresividad y ser de empleo sencillo (87).

Estos métodos no son eficaces, sin embargo, en el caso particular del tratamiento de dolores si no se procede a una previa neutralización de las zonas reactógenas hipotéticas (87).

PARTE 4ª.-EL LASER EN OFTALMOLOGIA

1.-APLICACIONES TERAPEUTICAS Y NO TERAPEUTICAS DEL LASER EN OFTALMOLOGIA

1) APLICACIONES TERAPEUTICAS

Según el Instituto Nacional de la Salud (1985) (109), en oftalmología clínica los láser utilizados actualmente son los láser de Argón, el cual debido a las ventajas técnicas y biológicas ha desplazado al primitivo láser de rubí. Posteriormente han aparecido el láser de Krypton, los láser de infrarrojos (YAG-láser y láser de CO₂) y los láser de ultravioletas.

A) Láser de Argón.-Su acción fundamental se debe a la fotocoagulación (Mainster MA, Ho PC y Mainster KJ; 1983) (110), (Krauss JM, Puliafito CA y Steinert RF; 1986) (111), y sus indicaciones son:

Polo anterior:

- Conjuntiva y córnea: destrucción de vasos en el pterigión y en neovascularizaciones corneales y en las placas pigmentadas retrocorneales (111).
- Iris: -midriasis, centrado pupilar
 - iridotomías en el tratamiento del glaucoma agudo por cierre angular.
 - fotocoagulación de los quistes del iris.
- Trabécula iridocorneal: en el tratamiento del glaucoma crónico simple y en el tratamiento de los procesos ciliares en el glaucoma afáquico con cámara anterior plana (Weber PA, Henry MA y Kapetansky FM; 1984) (112).

Polo posterior:

- Retinopatías isquémica proliferantes. Constituye el tratamiento casi exclusivo, de ahí su utilidad fundamental en el tratamiento de la retinopatía diabética proliferante y en las neovascularizaciones

secundarias o obstrucciones vasculares (especialmente trombosis de las venas retinianas).

- Maculopatías. Especialmente en los desprendimientos serosos y serohemorrágicos del epitelio pigmentario, como son la coroidopatía central serosa y la degeneración macular senil (Arnall Patz, 1983) (113).

También se usa en el tratamiento de ciertas maculopatías edematosas (diabética, aneurismas, obstrucciones venosas, etc.), de la histoplasmosis ocular y de neovascularizaciones idiopáticas (113).

- Tumores: especialmente la angiomatosis, hemangiomas coroides, algunos estadios de los melanomas coroides.
- Tratamiento profiláctico del desprendimiento de retina: se utiliza para el sellado de los desgarros retinianos evitando la evolución hacia el desprendimiento de retina. Es de gran utilidad en el sellado de las degeneraciones retinianas periféricas de alto riesgo como origen de desprendimiento de retina, tales como la degeneración en empalizada y las bridas vítreo-retinianas peligrosas.

B) Láser de Krypton

Aunque su acción fundamental también es la fotocoagulación (110), su acción es más profunda que el láser de Argón, actuando más sobre la coriocapilar y menos sobre la neuro-retina; de ahí su interés en las lesiones de las membranas neovasculares submaculares, que es su principal indicación, aunque también se puede utilizar en las patologías vistas en el láser de Argón.

c) YAG-láser

Produce una fotodisrupción (Mainster MA, Ho PC y Mainster KJ; 1983) (114), y se puede utilizar en forma micropulsada de emisión única o en emisión continua (CW-YAG-láser). En su primera forma sirve para la microcirugía endocular sin apertura del globo, seccionando tejidos; especialmente es mucho más útil que el Argón en la realización de iridotomías. Permite además la sección de la cápsula anterior y posterior

del cristalino (ésta última de gran interés en la cirugía extracapsular de la catarata con implantación de una lente intraocular de cámara posterior (Stark WJ, Worthen D, Holladay TJ y Murray G; 1985) (115). También es de utilidad en la sección de bridas vitreo-retinianas.

Balacco y cols. (Balacco-Gabrieli C, Avolio G, Lorusso VV y Castellano L; 1985) (116), en una reciente revisión del YAG-láser, resumen sus principales indicaciones en:

- glaucoma de ángulo cerrado
- glaucoma de bloqueo pupilar
- glaucoma crónico simple
- ectopia pupilar
- cataratas residuales (cortical y nuclear)
- quistes del iris
- adhesiones iridocorneales
- membrana y bridas vítreas
- capsulotomía posterior (Fastenberg DM, Schquartz PL y Hong Zen Lin) (117)
- edema macular quístico (Reese LT, 1983) (118)

En su segunda forma de acción, en emisión continua (CW-YAG-láser), actúa como un fotocoagulador de Argón, pero de mayor penetración, lo cual puede ser de utilidad en tumores corio-retinianos. Sin embargo, esta segunda forma de acción del YAG-láser es aún poco empleada y el sobre sus indicaciones precisas está escasamente establecido. Por lo tanto su acción fundamental es la coagulación transpupilar de la retina y coroides (Peyman GA, Conway MD y House B; 1983) (119).

D) Láser de CO₂

Se ha empleado para la fotocoagulación introduciendo una sonda intravítrea.

Mainster (Mainster MA; 1979) (120), experimenta las aplicaciones de esta radiación láser en vitrectomía y termoqueratoplastia y sugiere una variedad de otras potenciales aplicaciones para los láser de infrarrojos: tratamiento de la miopía patológica (por cambios locales en la curvatura corneal), resistencia a las infecciones víricas de la córnea (por inactivación térmica del patógeno), una aproximación

alternativa a la extracción extracapsular en la catarata y el tratamiento de la neoplasia orbital.

También se ha sugerido el uso del láser de CO_2 emitiendo en pulsos variables ($60\text{--}300\text{ s}^{-1}$) en la realización de limbectomías, queratectomías y queratotomías (Beckman H, Rota A y Barraco R; 1971) (121).

E) Láser de Ultravioletas

La radiación láser ultravioleta causa una específica reacción fotoquímica y produce la ablación de los tejidos corneales sin daño térmico a las estructuras adyacentes.

Esta radiación ultravioleta actúa en los polímeros orgánicos por un proceso descrito como "fotodecomposición ablativa", según la cual, las moléculas irradiadas se rompen en pequeños fragmentos volátiles por interacción fotoquímica directa sin calentar los tejidos adyacentes remanentes. La luz ultravioleta en esta frecuencia es altamente energética y cada fotón alcanza 6,4 electrón-voltio. La alta energía de cada fotón proporciona la energía fotoquímica que rompe directamente las ligaduras intramoleculares (Trokel SL, Srinivasan R y Baren B; 1983) (122).

Se utiliza fundamentalmente para realizar incisiones corneales (Marshall J, Trokel S, Rothery S y Schubert H; 1985) (123), teniendo un uso potencial en cirugía queratorefractiva: queratotomía radial, termoqueratoplastia y queratoplastia refractiva laminar (111). En principio, este tipo de láser puede ser usado para hacer simultáneamente todas las incisiones de un queratotomía radial, con un alto grado de resolución espacial y sin contacto directo con la córnea.

2) APLICACIONES NO TERAPEUTICAS DEL LASER EN OFTALMOLOGIA

Al lado de sus indicaciones esenciales en el dominio terapéutico, la emisión láser también puede utilizarse con fines diagnósticos y pronósticos.

Posee, en efecto, las propiedades ópticas de las radiaciones luminosas (reflexión, refracción, difracción, etc.), pero ciertas de sus características, y sobre todo la coherencia espacial y temporal, aportan una originalidad efectiva en los diferentes medios de propagación.

Juiciosas adaptaciones térmicas han permitido realizar fuentes de estimulación luminosas en electrofisiología y en adaptometría, pero también aprovechar ciertas propiedades ópticas particulares para evaluar la agudeza visual (efectos interferométricos) o la refracción del globo ocular.

También, el láser incorporado a un bastón, puede servir de ayuda visual a un ciego (86).

A) Aplicaciones en electrofisiología ocular

Ciertas características de la emisión láser responden a los criterios que se han deseado obtener de un fotoestimulador en electrofisiología ocular:

- la especificidad de la longitud de onda de la radiación permite realizar una estimulación susceptible de hacer aparecer respuestas propias a los sistemas fotópicos (conos) y escotópicos (bastones).
- la energía luminosa del haz láser, al igual que la duración de su emisión, son fáciles de regular.
- el impacto retiniano puede ser fácilmente reducido a pequeñas dimensiones, lo que permite una estimulación bien localizada pudiendo interesar exclusivamente el área macular.

Diferentes experimentos han demostrado el interés de los láser en electro-retinografía (ERG) y en la colección de los potenciales evocados visuales (PEV).

Así, el láser He-Ne de 632,8 nm de longitud de onda, es particularmente sensible para producir una respuesta de la actividad bioeléctrica de los conos con destellos de una duración aproximada de 70 mseg. Los trazos obtenidos tienen un aspecto que corresponden a respuestas del sistema fotópico. También, con este mismo tipo de láser, se ha recogido un ERG donde era posible disociar la actividad de los dos sistemas retininos (86).

Hirose y cols. (Hirose M, Mikaye Y y Hara A; 1977) (124), han puesto a punto un dispositivo que permite el registro simultáneo de ERG y PEV, estimulando una zona privilegiada de la retina, bajo el control

de observación biomicroscópico del fondo del ojo.

El láser He-Ne que ellos utilizan emite todos los 310 mseg una estimulación cuya duración es de 100 microseg. Doscientas estimulaciones pueden ser realizadas consecuentemente e integradas según las técnicas clásicas. Los electrodos colectores están incluidos en vidrio de contacto, que permite una observación fácil del fondo del ojo con la lámpara de hendidura y una focalización perfecta.

Para evitar los fenómenos de difusión luminosa retiniana que quitaría toda especificidad a la respuesta bioeléctrica, la retina cercana a la elegida para el impacto fotoestimulante se ilumina con un destello cuya potencia es superior a la de la emisión láser destinada a la estimulación ($1,7 \times 10^{-6}$ W y $0,59 \times 10^{-6}$ W/cm, respectivamente). Estas energías son netamente inferiores a los valores susceptibles de producir perturbaciones fisiológicas retinianas.

Con esta técnica, Hirose y cols. (124), recogen simultáneamente un ERG y PEV por estimulación del área macular correspondiente a un ángulo abierto de 3,75 grados.

Estas técnicas ofrecen un cierto interés porque sus perfeccionamientos y sus desarrollos deberían permitir realizar esta estimulación exclusiva de la mácula, demasiado difícil de obtener con los procedimientos habituales utilizados en electrofisiología ocular.

Los trazos así recogidos completarían nuestros conocimientos sobre la patología del polo posterior y sobre la transmisión retino-cortical de la actividad bioeléctrica de los conos maculares (86).

B) Láser y adaptometría

La curva adaptométrica registrada con las técnicas habituales es generalmente obtenida utilizando como fuente de iluminación la luz blanca.

Los estímulos coloreados tienen, sin embargo, un cierto interés clínico porque ellos permiten apreciar, en función de la longitud de onda, la sensibilidad de los dos sistemas retinianos fotópicos y escotópicos. Se obtiene así con la luz roja no coherente una curva adaptométrica donde la respuesta del sistema fotópico es preponderante (86).

Dubois-Poulsen y cols. (Dubois-Poulsen A, Magis C y Biais B, 1964) (125), utilizando estímulos coloreados provistos de filtros interferenciales, registran los valores de los umbrales correspondientes y proponen sustituir la adaptometría de la luz blanca, por una adaptometría coloreada y más particularmente el verde de 533 nm que permite obtener una amplitud de adaptación superior y una separación más marcada entre las respuestas fotópicas y escotópicas. Igualmente se ha utilizado un pequeño láser de He-Ne de un longitud de onda de 632,8 nm y una potencia de 2,3 mW.

Por lo tanto, los láser pueden utilizarse para estudiar las curvas de eficacia luminosa (86).

C) Determinación de la agudeza visual

Se basa en el principio de la interferometría que es un dispositivo óptico que permite, a partir de dos rayos monocromáticos salidos de una fuente luminosa y convergiendo sobre el plano pupilar, hacer aparecer sobre la retina franjas de interferencias percibidas bajo la forma de bandas yuxtapuestas, alternativamente claras y oscuras (86).

Cuando la fuente de iluminación es incoherente (lámpara de arco) el contraste de estas bandas sobre el fondo es suficiente, pero su luminosidad aparente es débil. Por contra, con un láser, los trazos de interferencias pueden ser de una nitidez perfecta.

El principio de determinación de la agudeza visual consiste, utilizando un láser He-Ne y un sistema óptico apropiado, hacer aparecer bandas de interferencia, susceptibles de ser orientadas en diversas direcciones, además de disminuir su luminosidad hasta un umbral de identificación, correspondiente a la eficacia visual central máxima (86).

Este método, propuesto experimentalmente por Campbell y Green (Campbell RW y Green DG; 1967) (126), tiene el interés de poder ser utilizado en caso de opacidades de los medios oculares y más particularmente en los sujetos con cataratas, antes de la intervención, para apreciar la eficacia macular.

Pero los resultados obtenidos por las experimentaciones no son convincentes ya que el 70% de los pacientes no pueden identificar la

orientación de las franjas de interferencia. Pero la característica anatómica de la catarata parece intervenir porque las opacidades muy densas no permiten la percepción de las imágenes interferenciales. En otros casos, la heterogeneidad de los cristalinicos con cataratas destruyen de forma anárquica las interferencias.

Aunque adaptando el complejo láser-interferómetro a un microscopio equipado de una lámpara de hendidura que, gracias a la finura del haz de focalización, permite a los rayos luminosos atravesar finas placas transparentes, dispuestas en el sentido de las cataratas de densidad limitada. Las imágenes de interferencia se obtienen entonces detrás del medio opaco (86).

D) Medida de la refracción

Cuando un haz láser se difunde por una superficie blanca, que mira un observador, éste último experimenta la impresión de una superficie irregular compuesta de pequeñas manchas más o menos claras, a veces coloreadas.

Esta percepción se explica por la proyección sobre la retina de franjas interferenciales que cobra nacimiento a partir de diferentes puntos de la pantalla difundiendo la luz coherente.

Utilizando un láser He-Ne, e invitando a los observadores amétropes desplazar su cabeza horizontalmente, mirando la región difusa situada a algunos metros, se constata que para los sujetos miopes, las impresiones manchadas parecen desplazarse del lado opuesto a la dirección del movimiento de la cabeza (Fig. 49) (86).

El hipermetrope experimenta una impresión inversa, contraria al emétrope que no percibe ningún desplazamiento.

El grado de ametropía puede entonces determinarse interponiendo delante del ojo del observador lentillas convexas o cóncavas de valor convenientemente elegido para suprimir toda sensación de movilidad de las imágenes.

Aunque la utilización de los reflectómetros láser en clínica conlleva varias dificultades ya que exigen condiciones rigurosas de

utilización y también una excelente cooperación de los enfermos cuyas respuestas deben ser precisas.

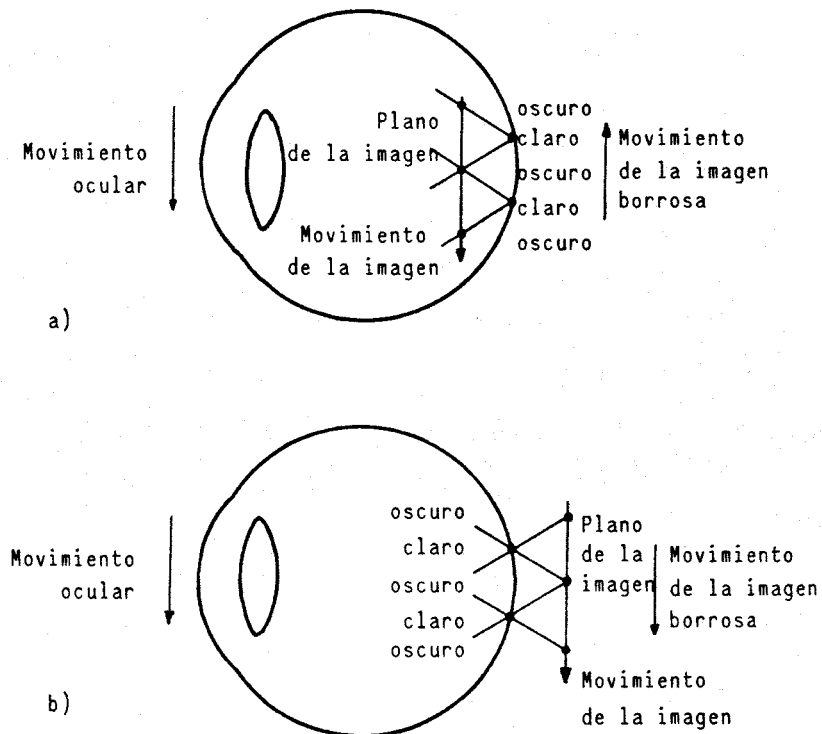


Fig. 49.- Movimiento de la imagen borrosa vista por el ojo.

- a) El movimiento se hace en sentido inverso del de la cabeza cuando la imagen se encuentra delante de la retina.
- b) El movimiento se hace en el mismo sentido del de la cabeza cuando la imagen se encuentra detrás de la retina (86).

E) Bastón láser

Esta ayuda visual ha sido concebida y realizada en los Estados Unidos, también se utiliza en Suecia. Su principio consiste en transformar la reflexión de una emisión láser sobre un obstáculo, en una vibración táctil o una señal sonora percibida por el ciego (86).



2.-INTERACCIONES DEL LASER CON LA CORNEA

La longitud de onda permite elegir la estructura ocular que se quiera irradiar. Así, si se quiere intervenir a nivel de la córnea, es necesario elegir una longitud de onda no comprendida entre los 400 y los 900 nm, ya que para esta banda de espectro de radiaciones electromagnéticas, la córnea es transparente, excepto si es portadora de una lesión pigmentada u opaca (86).

Las Figs. 50 y 51 muestran la absorción y la transmisión característica de la córnea para las distintas longitudes de onda.

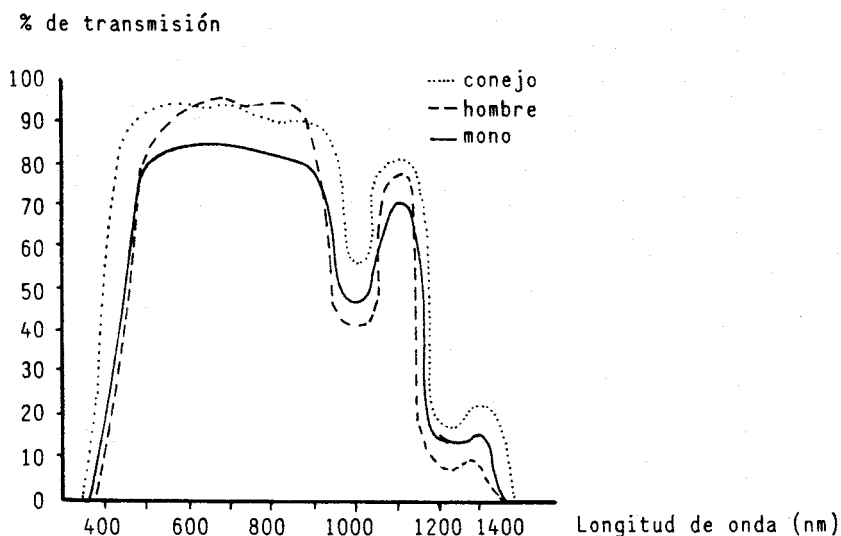


Fig. 50.- Porcentaje de transmisión de la luz en igual energía para cada longitud de onda a través de los medios oculares del mono, del conejo y del hombre (Haut J y cols) (86).

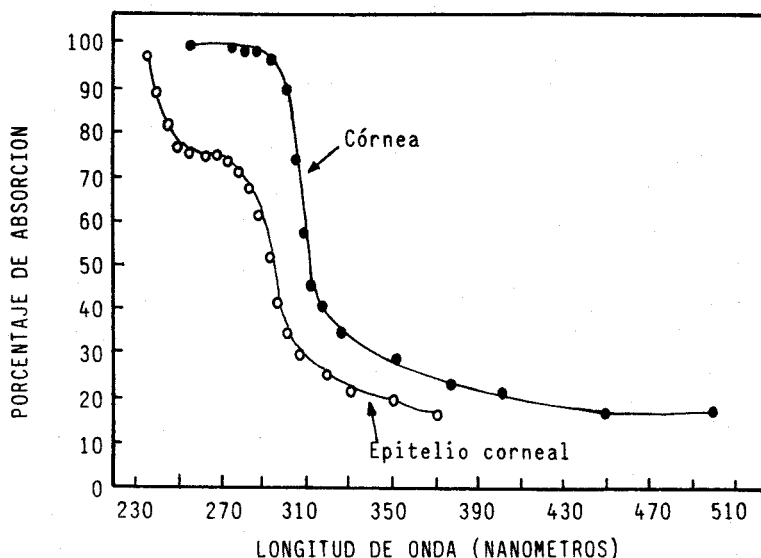


Fig. 51.- Absorción del epitelio y de la córnea del conejo (Kraus JM y cols.) (111).

Los ultravioletas no franquean la córnea que es opaca a las radiaciones cuya longitud de onda sea inferior a los 380 nm aproximadamente. Es, pues, a nivel de la córnea donde se pueden observar los efectos fotoquímicos unidos a una irradiación por ultravioletas (86).

Irradiando la córnea con longitudes de onda comprendidas entre los 260 y 290 nm se observa macroscópicamente una queratitis punteada superficial; al microscopio, las células del epitelio aparecen escamosas con un aspecto hinchado si la irradiación no es demasiado importante. Estas modificaciones serían debidas a la desnaturalización de las proteínas y ADN que serían destruidos. Otros aminoácidos también podrían ser destruidos, como la tirosina (precursor de la melanina), el triptófano y la fenil-alanina. Efectivamente, estas aminas aromáticas presentan picos de absorción en el ultravioleta (86).

Las lesiones aparecen en energías que varían de $0,2 \text{ J/cm}^2$ a 0.005 J/cm^2 , según las longitudes de onda y según las córneas irradiadas (Fig. 52), y también según los autores (86).

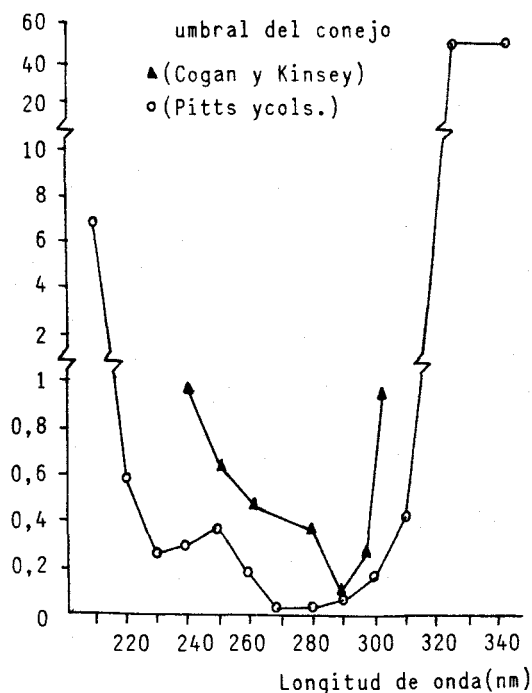


Fig. 52.- Umbral de exposición energética para obtener una fotoqueratitis en el conejo en función de las longitudes de onda (Haut J y cols.) (86).

Con un láser de 325 nm, Ebberts y Sears (Ebberts RW y Sears D; 1975) (127), observan microopacidades redondeadas localizadas en la profundidad del epitelio corneal, reversibles en 24-48 horas, siendo el umbral de aparición de estas opacidades de 0,8 J.

Como se indica en las Figs. 50 y 51, la absorción de la córnea aumenta rápidamente sobre los 300 nm. Se ha demostrado que es completa sobre los 293 nm (111).

Ya que el agua no absorbe significativamente la radiación entre los 193 y 293 nm, los componentes sólidos de la córnea pueden ser los responsables de la absorción por el tejido en esta región y de la mediación de muchos cambios fotoftálmicos.

La mayoría de los componentes sólidos de la córnea son proteínas, particularmente el colágeno, que comprende alrededor del 70% del peso seco del estroma. La absorción proteica máxima alrededor de los 190 nm ha sido asociada con la absorción por el enlace peptídico C-N (111).

Los ácidos nucleicos de la córnea están muy limitados al epitelio. Los ácidos nucleicos absorben fuertemente a los 248 nm, debido a un pico de 260 nm que corresponde a la absorción por las bases de los nucleótidos.

Se ha demostrado que la radiación ultravioleta produce numerosos efectos perjudiciales en la actividad celular. Estos están muy relacionados con los efectos por las radiaciones en el ADN y, mientras los más graves incluyen la muerte celular, otros incluyen mutagénesis, carcinogénesis, interferencia con la síntesis de ADN y proteínas, retraso de la difusión celular y cambios en la permeabilidad y motilidad (111).

Está bien establecido que los efectos ultravioletas en el tejido corneal están causados en parte por la absorción de la radiación en las nucleoproteínas.

Ya que absorbe fuertemente y es la estructura más anterior, el epitelio es la primera capa corneal afectada por la irradiación ultravioleta. Una posibilidad es que la energía absorbida se use principalmente para las reacciones fotoquímicas de ruptura de los enlaces químicos de ADN y proteínas.

El medio activo del láser ultravioleta es una combinación de gas

noble y gas halógeno en estado molecular que emite un fotón en disociación (122). Los gases reaccionan juntamente en un campo de alto voltaje para producir una especie de diatómico molecular excitado (de ahí la expresión anglosajona "excimer laser") (Krueger RR, Trokel SL y Schubert HD; 1985) (128).

La radiación láser ultravioleta causa una específica reacción fotoquímica y produce la ablación de los tejidos corneales sin daño térmico a las estructuras adyacentes (122).

Es generalmente aceptado que la fotocoagulación ocurre como resultado de una ruptura de uniones intermoleculares por la acción directa de los fotones con alta energía (123).

El efecto de la luz láser ultravioleta depende de la longitud de onda, irradiación y frecuencia.

Trokel y cols. (122), publican observaciones histológicas que demuestran satisfactoriamente que el láser ultravioleta emitiendo en 193 nm permite la remoción controlada del tejido corneal, ya que la profundidad y las dimensiones laterales de las incisiones pueden ser reguladas con gran precisión.

Teóricamente, dos mecanismos pueden jugar un papel en la producción de las incisiones:

- 1- fotoablación, o descomposición molecular inducida por el fotón.
- 2- eventos térmicos ultra-rápidos, o interacciones fotón-fotón en la absorción profunda de la radiación.

La irradiación de la córnea de conejo con láser de Argón y YAG-láser produce la curación clínica e histológica de procesos corneales hacia las 6 semanas siguientes a la exposición a la radiación láser. El umbral de exposición para el láser de Argón se sitúa alrededor de los 17 KJ/cm² (tiempo de exposición 200 mseg a 2 seg; 65 um); para el YAG-láser, el umbral de exposición se localiza en 115 KJ/cm² (Bathe H y Rasow B, 1977) (129).

Estos mismos autores comparan la fotocoagulación de la córnea por el láser de Argón (continuo a 480 y 540 nm), el láser de rubí (de impulsos

de 1 nseg y 694 nm) y el YAG-láser (continuo y 1060 nm).

El umbral corneal depende en parte de la transparencia del film precorneal. Las lesiones son más marcadas en las capas posteriores de la periferia corneal a causa de la disipación del calor a partir del iris.

Con el láser de Argón, a intensidades medias, y después del lavado del film precorneal, no se produce lesión corneal. En ausencia de lavado, se pueden observar finas opacidades epiteliales reversibles. Para 65 a 80 $\mu/4$ W/500 mseg, se produce una lesión irreversible del estroma con formación de un cráter corneal que se extiende hasta el endotelio. Aumentando la potencia, la córnea se perfora (86).

Con el láser de rubí, a una intensidad media, no se produce lesión central; en la periferia, las lesiones profundas son más marcadas que con el láser de Argón.

Con el YAG-láser se observa un edema discreto de todas las capas en el centro de la córnea, pero no sobreviene perforación, incluso para una intensidad de 1.200 J. Las lesiones periféricas profundas son más importantes que con el láser de rubí y el láser de Argón (86).

Krasnov y cols. (Krasnov NN, Kasparov AA y Bolshunov AV; 1976) (130), encuentran recuperaciones más rápidas en pacientes con queratitis dentríticas tratados con láser de Argón que en los tratados con idoxuridina. Este efecto positivo sobre la córnea del láser de Argón también ha sido observado por Tokumaru y Fromer (Tokumaru T y Fromer C; 1975) (131), en el tratamiento de queratitis punteada herpética y lesiones corneales dentríticas.

Láser de CO₂

En conejos irradiados con láser CO₂, se ha estudiado el umbral de exposición energético para obtener una lesión corneal, mostrando que además de la potencia del haz, también interviene la duración de la exposición (Fig. 53) (Clarke AM y Wolbarsht ML; 1970) (132).

Fine y cols. (Fine S, Feigen L y McKeen D; 1968) (133), sobre la córnea de conejo constatan que para una energía de 0,5 a 1 W/cm², las lesiones aparecen incluso con una exposición inferior a 5 minutos. Si la energía es de 0,2 a 0,3 W/cm², la duración de exposición debe ser de 30

min. Con $0,1 \text{ W/cm}^2$ durante 30 min, no se alcanza ni el umbral clínico ni el umbral histológico.

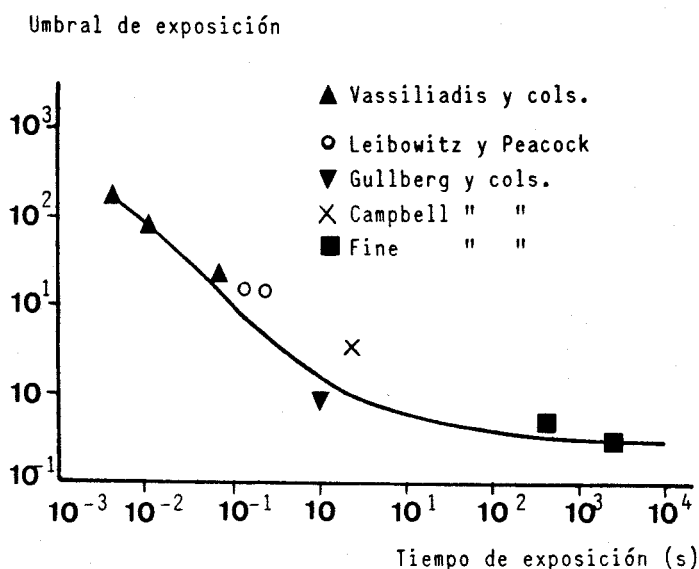


Fig. 53.- Umbral de exposición energética para obtener una lesión corneal con un láser de CO_2 ($10,6 \mu$) (132).

- Con $0,2 \text{ W/cm}^2/15 \text{ min}$, el examen histológico, al 12º día, pone en evidencia una hipertrofia de las células epiteliales y de la membrana basal del epitelio (anormalmente pobre en hemidesmosomas), así como modificaciones de los queratocitos, pero sólo en las capas superficiales del estroma.

- Con $0,3 \text{ W/cm}^2/10 \text{ min}$, las lesiones son más importantes, particularmente en el estroma. Se desarrolla una neovascularización de las capas medias. Numerosas estructuras, en forma de esferillas, son visibles al microscopio electrónico en la capa de células basales del epitelio, manifestando su sufrimiento; pero igualmente en el interior de las vacuolas intracitoplasmáticas de los queratocitos superficiales, que objetivan su actividad fagocitaria. Las lesiones más severas comportan un exceso calcáreo subepitelial, en relación a una queratitis en banda, comparable a la que ha sido descrita en el hombre.

- A medida que la intensidad aumenta, el láser de CO_2 produce primero un adelgazamiento corneal con compresiones de las capas del estroma superficial, después un cráter central, al cual corresponde una

depresión sobre la cápsula anterior del cristalino (incluso en ausencia de abertura de la cámara anterior), y, por último, una perforación de la córnea que se acompaña de un vaciamiento del humor acuoso, sin otra modificación tisular intraocular.

Campbell y cols. (Campbell CJ, Rittler MC, Swope CH y Koester CJ; 1968) (134), estudian el efecto del láser de CO₂ sobre la córnea de conejo con una fibra de 500 μ de diámetro, a diferentes intensidades:

- Lesiones ligeras. Aparecen a los 45,5 mW. Apenas son histológicamente visibles bajo la forma de un pequeño espesamiento de epitelio debido a un ligero hinchamiento de las capas más superficiales.

- Lesiones moderadas. Se observan con potencias de 100 a 150 mW. Las coagulaciones, clínicamente grisáceas, raramente se extienden hasta la membrana de Descemet. En algunos casos, el epitelio central es destruido. Los bordes de la úlcera están un poco salientes; la córnea aparece ligeramente adelgazada en hoyo, rodeada de un espesamiento edematoso del epitelio. El tercio superficial del estroma es el asiento de una necrosis de coagulación, rodeada de una degeneración hialina subyacente y de destrucción nuclear de los queratocitos. La membrana de Descemet permanece intacta, mientras que las células endoteliales están necrosadas si la intensidad es de 500 mW, o sólo vacuoladas si la intensidad es de 100 mW. Un exudado serofibrinoso cubre la cámara anterior.

- Lesiones severas. La perforación corneal es constante a 5.000 mW. El epitelio que bordea la lesión está coagulado. Debajo, los núcleos de los queratocitos están más o menos destruidos y las fibrillas de colágeno degeneradas. Existe un enorme exudado de la cámara anterior y una dilatación de los vasos del iris por iritis aguda.

Peabody y cols. (Peabody RR, Zweng CH, Rose HW, Peppers NA, Vassiliadis A y Park M; 1969) (135), establecieron el umbral terminal, del láser de CO₂, para la córnea de conejo en 0,55-1,2 J/cm², para intensidades de 10 a 35 mseg.

Las lesiones son mínimas, epiteliales y desaparecen clínicamente en 24 horas.

Borland y cols. (Borland RG, Brennan DH y Nicholson AN; 1971) (136), con un diámetro de irradiación de $0,05 \text{ cm}^2$ y una duración de exposición de 70 mseg, establecen que el umbral (correspondiente al 50% del umbral lesional), es de $5,8 \text{ W/cm}^2$ en el conejo.

La lesión de grado I obtenida así, corresponde clínicamente a una simple opalescencia epitelial, comprobada a las 24 horas en el conejo.

El grado II corresponde a una destrucción epitelial, para $1,97 \text{ W/cm}^2$ en el conejo.

El grado III comporta una necrosis de coagulación del estroma subyacente, observada a $17,4 \text{ W/cm}^2$.

Beckman y cols. (121), mediante un láser de impulsos con potencia de 25.000 W, determinan una vaporización ultra-rápida del tejido corneal.

Nd YAG-láser

Campbell y cols. (134), determinan que con una longitud de onda de 1060 nm emitida por el láser de neodimio, la transmisión de la córnea es del 93% de la energía de la radiación.

No han confirmado ninguna lesión para una intensidad inferior a 1,5 J. La lesión umbral, que corresponde clínicamente a una pequeña mancha grisácea, sin destrucción epitelial ni endotelial, se caracteriza histológicamente por un espesamiento del epitelio, un aumento de su eosinofilia, algunos núcleos picnóticos y una desintegración granular de su membrana basal. El edema del estroma es moderado con hinchazón y pérdida del paralelismo de las fibrillas de colágeno. Existe, sin embargo, un exudado de la cámara anterior.

Las lesiones severas se obtienen con 6 a 8 J y están constituidas por un defecto cilíndrico de todo el espesor corneal.

3.-TRATAMIENTO DE PROCESOS CORNEALES MEDIANTE RADIACION LASER

La córnea normal es completamente transparente para el láser de Argón y el láser de rubí, y transmiten íntegramente la totalidad de su energía a las formaciones anatómicas situadas detrás de ella.

1) El láser de Argón se ha utilizado nada más que para tratar elementos anormales, coloreados, de la córnea, como son:

- las neovascularizaciones corneales
- ciertos hilos de sutura
- los tumores melánicos

a) Fotocoagulación de la neovascularización corneal

Propuesta en 1973 por Massin y Gernet (137), y por Cherry y cols. (Cherry P, Faulker J, Shaver R, Wise J y Witter S; 1973) (138), y en 1974 por Bonnet y Bonamour (139).

Los neovasos acompañan muy frecuentemente a las opacidades corneales consecutivas a numerosas afecciones: queratitis infecciosas diversas, cicatrices de traumatismos, cicatrices de quemaduras térmicas y químicas, etc. La neovascularización forma parte de los procesos de cicatrización de la córnea.

Los neovasos corneales comprenden arteriolas que parten del limbo, que asientan en profundidad y son poco visibles y vénulas, más largas y superficiales y en las que se ve la sangre circular en dirección del limbo. Estos vasos están muy ramificados y, sobre todo, anastomosados entre ellos, de manera que los diferentes pedículos que parten del limbo frecuentemente se reúnen por una red anastomótica compleja (86).

Para su tratamiento, el haz láser se focaliza directamente sobre la córnea sin interposición de un vidrio de contacto (de esta manera se evita dañar el iris subyacente y la retina si la radiación atraviesa la pupila). Se elige un diámetro de 50 a 100 micras, justo un poco más grande que los vasos a obstruir, un nivel de energía elevado (500 a 1000 mW), y un tiempo siempre inferior a 0,2 seg para evitar las consecuencias de los movimientos del ojo. Es suficiente una anestesia tópica por colirio (86).

Bajo el efecto del impacto se ve vaciarse el vaso de su contenido sanguíneo. Se repiten los impactos a todo lo largo del vaso a partir del limbo, comenzando por las arteriolas antes de tratar las vénulas. Es necesario tratar todos los vasos visibles.

El tratamiento es fácil y puede ser hecho en una sólo sesión, salvo

en los casos de neovascularización particularmente abundante.

En la casi totalidad de los casos, los vasos corneales fotocoagulados se repermeabilizan en algunas semanas o algunos meses, de manera que es necesaria una nueva fotocoagulación o incluso una tercera. En realidad la neovascularización corneal se reproduce mientras que subsista la causa (86).

No obstante, esta indicación es discutida y algunos autores la han abandonado por tres motivos: dificultad de ocluir el pedículo arterial cuando éste es profundo, necesidad de un número importante de fotocoaguladores para interrumpir la vascularización y existencia de una larga red anastomótica o de troncos vasculares poco activos que se desarrollan una vez que se ha obliterado los troncos arteriales principales. Aunque tiene una fuerte indicación en la fotocoagulación de los neovasos que aparecen sobre el labio corneal interno en una incisión por catarata (86).

b) Sección de hilos de sutura corneales

Bernard y cols. (Bernard JA, Gourmet JC y Pouliquen Y; 1977) (140), han propuesto el empleo del láser de Argón para seccionar los hilos de Perlon 9 ó 10-0 utilizados para las suturas corneales. Se sabe, en efecto, que cuando el nudo ha sido enterrado, lo que es la regla, el hilo se vuelve intracorneal en la totalidad y el epitelio se vuelve a cerrar delante de él. Su extracción quirúrgica necesita cortar una trinchera en la córnea.

La sección de uno o varios hilos de sutura puede ser necesaria tras una operación de catarata con incisión corneal prelábica cuando los puntos están demasiado apretados y provocan un astigmatismo excesivo.

Un impacto de 500 μ , de 500 a 1000 mW y de menos de 0,2 seg, bien centrado, secciona instantáneamente el hilo. En los días siguientes es habitual que una de las cabezas se pueda extraer con unas pinzas. Al mismo tiempo, el astigmatismo que había provocado se reduce (86).

Una simple anestesia en colirio es suficiente para esta pequeña intervención, que se hará sin vidrio de contacto, como en la fotocoagulación de los neovasos corneales.

Este procedimiento simple y eficaz sólo es aplicable al hilo de Perlon, porque tiene la ventaja de ser negro y muy absorbente y de disipar fácilmente el calor.

c) Tumores melánicos

Se trata de nevos límbicos que pueden degenerar en nevo-carcinomas y en este momento aparece sobre la córnea que la recubren parcialmente. En razón de la fuerte pigmentación habitual de estas lesiones, se puede utilizar la energía suministrada mediante la radiación láser para destruirlos. Ha sido utilizado a tal efecto el láser de Xenon, pero los tumores no son destruidos completamente produciéndose recidivas locales, con extensión arbitraria y metástasis cerebrales principalmente; estas recidivas son debidas a la existencia dentro de estos tumores de zonas probablemente pigmentadas, en las cuales no se produce la fotocoagulación (86).

La fotocoagulación por Xenon o Argón no debe ser utilizada para el tratamiento de los tumores melánicos córneo-conjuntivales; cuando exista sospecha clínica de transformación maligna, debe realizarse una amplia exéresis quirúrgica.

2) Tratamiento experimental de ciertas úlceras corneales por el láser

a) Fotocoagulación con láser de Argón de úlceras por Pseudomonas

Fromer y L'Esperance (Fromer C y L'Esperance FA; 1971) (141), destruyen cultivos "in vitro" de Pseudomonas puestas previamente en contacto con el anticuerpo específico fluorescente, para aumentar la absorción de la radiación. Con 400 mW/mm^2 son necesarios 9 min de exposición, pero sólomente 7 min con 600 mW y 2min con 850 mW . La destrucción de las colonias no teñidas requiere, por contra, una exposición mucho más larga.

"In vivo", la experimentación se ha efectuado sobre córneas de conejo infectados por escarificaciones. El rayo se dirige tangencialmente para hacer un barrido de la úlcera. En ausencia de tratamiento, sobre un lote de 13 animales, se produce 7 veces una perforación y 6 veces una vascularización total de la córnea. Tras el tratamiento la infección se detuvo 10 veces en 13 casos (86).

b) Fotocoagulaciones experimentales de úlceras herpéticas

Tokumaru y Fromer (131), según el mismo principio, ponen en contacto ulceraciones herpéticas por escarificaciones en el conejo, con la fracción γ -globulina de los anticuerpos anti-virus simple, marcado con isocianato de fluoresceína, de manera, por una parte, de facilitar la reparación de las lesiones, y por otra parte, de aumentar la absorción luminosa en el curso de la fotocoagulación por el láser de Argón. No obstante, cuando hay más de 50 puntos ulcerados no es posible detener la progresión de las lesiones. De todas maneras, un importante inconveniente de esta cauterización es debida a la opacidad cicatricial que ella deja y, sobre todo, al defecto de la membrana de Bowman que produce, lo que favorece la penetración del virus en el estroma y el paso a una lesión corneal profunda.

c) Tratamiento experimental de úlceras corneales mediante radiación láser He-Ne de baja potencia

Arias (Arias JF; 1985) (142), provoca úlceras corneales mediante la desepitelización mecánica del epitelio de la córnea en conejos y le aplica radiación láser He-Ne de 632,8 nm a la dosis de 5 J/cm²/día durante 7 días, observando una reepitelización desde el punto de vista macroscópico en un tiempo comprendido entre las 48-72 horas, no estimulando el tratamiento la velocidad de reepitelización cuando se compara con un grupo control, ni existiendo diferencias histológicas con el mismo grupo a lo largo de la evolución.

3) Láser y cirugía de la córnea

Realizada mediante el láser de CO₂ y el moderno láser de ultravioletas, este último aún en fase de experimentación.

SECCION III: ANTIMETABOLITOS Y REEPITELIZACION

CORNEAL

ANTIMETABOLITOS

1.-GENERALIDADES

Como antimetabolitos o antagonistas metabólicos, se designan a aquellos fármacos que actúan interfiriendo con la función de un metabolito especial debido a su analogía química, siendo denominados también como inhibidores análogos. Impidiéndose, sobre todo, la síntesis de ácidos nucleicos, función básica en la multiplicación celular.

1) CLASIFICACION DE LOS ANTIMETABOLITOS

a) Antagonistas o análogos del ácido fólico

El ácido fólico es una vitamina necesaria para la síntesis de las bases púrica, pirimidínicas y de sus metabolitos, necesarios para la síntesis de los ácidos nucleicos.

Estos análogos del ácido fólico son productos de síntesis, estructuralmente muy semejantes a él. Los antagonistas más potentes son aquellos que derivan del mismo ácido fólico, con un grupo amino en la posición 4, tales como el metrotexate, la aminopterina y la pirimetamina.

b) Antagonistas o análogos de las purinas

Son sustancias que por su parecido estructural a las bases púricas, necesarias para la biosíntesis de los ácidos nucleicos, y por ello imprescindibles en los procesos de multiplicación y regeneración celular, pudiendo actuar de forma competitiva con los mismos.

- Análogos de la hipoxantina. Su principal representante es la 6-mercaptopurina, estructuralmente semejante a la hipoxantina, pero con un grupo sulfidrilo en posición 6 en vez del grupo hidroxilo.
- Análogos de la guanina. Su principal representante es la tioguanina, estructuralmente semejante a la base púrica guanina (Sans-Sabafren J y Rosell R; 1976) (143), pero reemplazando el oxígeno de la posición 6 por un átomo de

azufre. La acicloguanosina o aciclovir es un nucleósido púrico con una cadena lateral acíclica, pudiendo ser considerado como un análogo acíclico de la 2'Deoxiguanosina.

c) Antagonistas o análogos de las pirimidinas

Las bases pirimidínicas son componentes fundamentales en la biosíntesis de los ácidos nucleicos; los antagonistas o análogos estructurales de la pirimidina se dividen en:

- Análogos del Uracilo. Entre ellos está el fluoruracilo, (5FU), semejante estructuralmente a la base pirimidínica uracilo, pero con un átomo de flúor en la posición 5.
- Análogos de la Citidina. Los análogos de ésta ya no lo son directamente de la base pirimidínica, sino de su nucleósido; entre ellos está la Citarabina (Ara-C), parecida estructuralmente al nucleósido citidina, con la única diferencia de cambiar el azúcar D-ribosa, por una D-arabinosa.
- Análogos a la Timidina. Como antimetábolitos análogos estructuralmente a la Timidina están la 5-Iodo 2'Deoxiuridina (IDU), y la Triflúortimidina (F₃T). La F₃T es un análogo de la Timidina con 3 átomos de flúor en el puesto del H del grupo metílico. El IDU es un análogo de la Timidina, caracterizado por la presencia de un átomo de I en el grupo metílico de la Timidina.

La principal utilización de estas sustancias es por su acción citotóxica, interfiriendo la síntesis del ácido nucleico, efecto útil en el tratamiento de las neoplasias.

Estudios realizados con timidina marcada con tritio han demostrado que todos los antimetabolitos, tanto los antagonistas del ácido fólico como los antagonistas de las bases púricas y pirimidínicas, actúan sólo en la fase S del ciclo celular, impidiendo la síntesis del DNA, actuando en las células en proliferación activa y no sobre las células no proliferantes (142).

Los antimetabolitos tienen capacidad de inhibir la respuesta inmunitaria, poseen una acción inmunosupresora, no produciéndose la formación de anticuerpos frente a antígenos por alteración del tejido linfoide.

Una acción no demostrada en todos ellos, pero posible desde un punto de vista teórico debido a su particular mecanismo de acción, es la teratogénica, descrita para la mercaptopurina (Sokal JE y Lessman EM; 1960) (144), y para la idoxuridina (Itoi M y Gefter JW; 1975) (145).

2) MECANISMO DE ACCION DE LOS FARMACOS ANTAGONISTAS

Estos fármacos descritos son antagonistas metabólicos, compitiendo frente a los compuestos a los que se asemejan interfiriendo su función. Se puede simplificar su mecanismo de acción como el de dos sustancias, (agonista y antagonista), que compiten por un mismo receptor.

La disminución de la respuesta al agonista (ácido fólico, base o nucleósido), en presencia de un antagonista puede revertirse incrementando la dosis del agonista.

Las curvas dosis-respuesta se desplazan paralelamente hacia la derecha, según la dosis del fármaco antagonista. Pero siempre es posible obtener el efecto máximo incrementando la dosis del agonista.

Aunque la mayoría de los inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos se utilizan como antineoplásicos, algunos son utilizados como antimicrobianos o antivíricos, apoyándose en su mecanismo de acción. Estos antimetabolitos utilizados en terapia antinfeciosa pueden clasificarse en:

- a.- análogos a los nucleósidos.
- b.- aquellos que se unen a la DNA polimerasa.
- c.- aquellos que interaccionan directamente con el ADN.
- d.- aquellos que inhiben la DNA girasa.

Aunque son inhibidores selectivos de la síntesis de ácidos nucleicos en las bacterias o los virus, algunos bloquean también la transcripción en las mitocondrias de las células del huésped.

Los principales inhibidores de la síntesis de los ácidos nucleicos de bacterias y/o virus son:

- Idoxuridina (IDU, 5 IUdr). Es convertido en Idoxuridina trifosfato (IDU-TP), que se incorpora al ADN vírico haciéndolo más susceptible de ruptura y transcribiendo un ADN erróneo.
- Citarabina (Ara-C). El Ara-C TP compite con el dCTP en la reacción de polimerización del ADN; inhibidor potente de la DNA polimerasa inducida por el virus.
- Trifluórtimidina (F₃T). La F₃T inhibe la DNA polimeras y la timidina quinasa, transformándose en F3TMP, F3TDP y F3TTP, y éstos compuestos alteran la síntesis del ADN tanto en la célula normal como en la célula infectada por el virus.
- Vidarabina (Ara-A). El Ara-ATP compite con el ATP en la síntesis del ADN, inhibiendo también la poliadenilación del RNA "in vivo" e "in vitro".
- Aciclovir (ACV). Una vez fosforilado por la timidina quinasa específica del virus Herpes, se bloquea la replicación del ADN vírica específicamente por un derivado trifosfato activo.
- Acido Nalidíxico. Inhibe la DNA girasa bacteriana, enzima implicada en la replicación del ADN y su transcripción.
- Novobioxina. Inhibe la DNA girasa.
- Rifamicina. Inhibe la RNA polimerasa procariota dependiente de ADN.

2.-TRIFLUORTIMIDINA (F3T)

1) ESTRUCTURA QUIMICA

La Trifluórtimidina (F3T, F3TdR, trifluorotimidina deoxiribosa, 5-trifluorometil-2'-deoximidine), es un nucleósido pirimidínico halogenado. Este compuesto es un análogo de la timidina, de la cual se diferencia por tener 3 átomos de flúor sustituyendo al hidrógeno 5 del grupo metilo (Fig. 54).

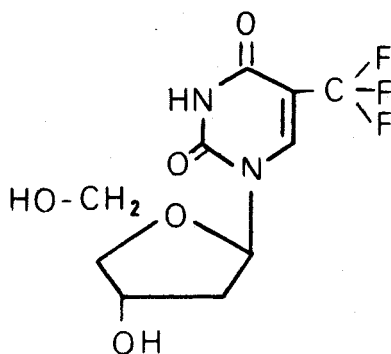


Fig. 54.- Estructura química de la Trifluortimidina (F3T)

2) FARMACOCINETICA

Sugar y cols. (Sugar JE, Varnel E, Centifanto Y y Kaufman HE; 1973) (146), establecieron que una de sus ventajas eran su alta solubilidad. A concentraciones de 1mg/dl es altamente soluble (Pavan-Langston D, Lass J y Campbell R; 1979) (147). También lo es en dimetil-sulfóxido, pero no se ha informado del uso clínico de tales soluciones.

Soluciones acuosas son inestables. El pH óptimo para su estabilidad es de 1 a 4. A pH 7,4 la vida media es de 1,5 días a 30°, y de 16 horas a 37°.

Intravenosamente, la F3T tiene una vida media de 30 min. En 24 horas se excreta el 60-93% en la orina como compuesto inalterado y como metabolitos de la F3T, 5-carboxideoxiuridina (5-COOH- 2'dUd) y 5-carboxiuracil (5-COOH-U), los cuales no tienen actividad antivírica.

Los tejidos contienen sólo 2-30 ng/g de F3T (compuesto inalterado o sus metabolitos) después de 24 horas. La F3T se encontró en tejidos, tales como médula ósea y nódulos linfáticos en mayor proporción, los cuales mostraron más signos de daños tóxicos.

En el curso de un estudio del efecto de la F3T en gotas al 5% sobre iritis herpética en conejos, Sugar y cols. (146), estudiaron su penetración en el humor acuoso. En los ojos infectados por herpesvirus, el humor acuoso contenía 37 ng/ml a los 30 min de la administración, y 3,4 ng/ml después de 60 min, y no estaba presente a los 90 min. En ojos infectados la F3T penetró mucho peor, y sólo se encontraron niveles de 5-6 ng/ml.

La cinética de penetración antiviral no muestra puntos de saturación a concentraciones altas, indicando que penetra en la córnea por difusión no facilitada (O'Brien W y Edelhauser H; 1977) (148).

3) MECANISMO DE ACCION

La sustitución de 3 átomos de flúor en el grupo 5-metilo de la timidina es la base del mecanismo de acción por los cambios que produce en las características de su molécula.

La F3T es fosforilada por la timidina quinasa transformándose en F3TMP, F3TDP y F3TTP, y estos compuestos, imitando la actividad normal de la deoxitimidina trifosfato, son los que alteran la síntesis del ADN, tanto en la célula normal como en la infectada por el virus, mediante los siguientes mecanismos:

- Inhibición de la timidina quinasa
- Inhibición de la timidilato-sintetasa
- Inhibición de la DNA polimerasa DNA dependiente
- Rotura de la cadena de ADN

La F3T inhibe la timidilato sintetasa en una proporción del 70% con una concentración de 0,6 nM. La parte activa es el 5-monofosfato de la F3T, el cual es producido después de entrar en la célula.

La F3T bloquea pasos a la ruta de la timidina y, sobre todo, el efecto sobre la síntesis de ADN.

En estudios con células HeLa en presencia de 1nM de F3T se encontró que el ARNm temprano era formado y asociado normalmente con ribosomas pero no había asociación de ARNm tardío con los ribosomas, presumiblemente porque no fue formado. Esto fue interpretado como el resultado de la incorporación de F3T dentro del ADN progenitor el cual podría volverlo



incapaz para transcribir el ARNm tardío, mientras que el ARNm temprano, transcrito por el genoma progenitor, podría ser formado normalmente. Esta suposición se basaba en la observación de que cuando las células fueron infectadas con virus conteniendo F3T en su ADN, el ARNm temprano no era transcrito normalmente.

Parece probable que la acción antiviral de la F3T resulta de su incorporación en el ADN viral, lo que causa disturbios en las funciones de transcripción tardía, conduciendo a una síntesis de proteína anormal.

La F3T cuando se dio temprana y frecuentemente, suprimió la enfermedad, indicando que la replicación viral era importante en el inicio de la enfermedad, sin embargo, después de que ésta había comenzado a desarrollarse, el fármaco no tenía efecto apreciable, indicando que la multiplicación viral no debe ser importante en el mantenimiento de la enfermedad (McNeill JI y Kaufman HE; 1979) (149).

4) ACCIONES BIOLÓGICAS

Las acciones biológicas de la F3T reflejan su efecto sobre la síntesis del ADN.

La F3T a concentraciones de 0,012 ng/ml, inhibe la división de las células humanas en un 50%, aunque este efecto es revertido si se añade timidina en una concentración ligeramente menor de la equimolar.

También se ha observado un efecto antitumoral tanto en animales como en hombres, ya que la F3T inhibe el crecimiento de células de leucemia y de adenocarcinoma.

En cultivos de células de linfoma de cobaya, se obtiene una inhibición del crecimiento del 50% con una concentración de F3T de 0,017 nM.

Cuando se inyectan dosis de F3T en el saco de huevos fértiles entre las 34 y 90 horas de incubación se encontró que era teratógena. La dosis efectiva para producir teratogenicidad fue de 0,1-0,5 ng cuando se administra al 2º día de incubación, 0,75-1,75 ng en el 3º día y 2,4-3,1 ng en el 4º día. Se afectó principalmente el sistema esquelético, con paladar hendido, focomielias y acortamiento o curvatura de los huesos. La hipoplasia renal bilateral fue ocasionalmente observada en los días 19 y

20 del período embrionario, probablemente debido a la hemorragia masiva renal (Lopez BJ; 1983) (150).

4) ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Kaufman y cols. (Kaufman HE y Heidelberg C; 1964) (151), infectaron conejos con virus Herpes sobre una córnea escarificada y 3 días más tarde, cuando las úlceras estaban desarrolladas, el ojo fue tratado con gotas de F3T o placebo cada 2 horas durante 2 días. La F3T administrada en una concentración de 0,1% fue efectiva en la eliminación de las úlceras; también fue igualmente efectiva en el tratamiento de úlceras producidas por virus Herpes resistentes al IDU.

Sugar y cols. (146), estudiaron el efecto de la F3T sobre iritis herpética, reduciendo el desarrollo de ésta con gotas al 5% de F3T en comparación con los ojos controles. También es efectiva en uveitis herpética (148).

La DE_{50} para el HVS tipo 1 es de 0,4 a 8 nM/ml de F3T (Collins P y Bauer D; 1977) (152).

Heidelberg (Heidelberg C; 1975) (153), estudió la actividad de la F3T sobre la replicación del virus vaccinia en las células HeLa y notó que era incorporada al ADN en el puesto de la timidina en proporción del 24%, perdiendo por ello su capacidad infectiva. El examen a microscopía electrónica del citoplasma de las células HeLa muestra que estos virus son más largos, menos densos y estructurados y que las dimensiones de su ADN son inferiores a las del ADN del virus vaccinia normal.

La F3T puede inhibir la replicación de algunos serotipos adenovirales conocidos como causa de queratouveítis. Los serotipos pueden ser generalmente inhibidos a mayor o menor extensión "in vitro" (Lenette DA y Eiferman RA; 1978) (154).

No hay publicaciones de su actividad contra otros miembros del grupo de virus herpes y del grupo de poxvirus, y el espectro de actividad de la F3T está así limitado a los virus herpes, vaccinia y adenovirus.

La F3T ha sido bien tolerada y tiene pocos efectos tóxicos colaterales, pero no reduce la tasa de recrudescencia o recurrencia de la queratitis herpética (Hyundiuk R, Charlin RE, Alpren TV y Schultz R;

1978) (155).

3.-ANTIVIRICOS Y CICATRIZACION DEL EPITELIO CORNEAL

Son muchos los estudios que se han realizado para ver la manera en que los fármacos antivíricos afectan al epitelio corneal, ya que, independiente de su capacidad antivírica, por ser antimetabolitos cabría esperar que afectasen la normal reepitelización de córneas previamente desepitelizadas, así como al epitelio ya regenerado.

En este sentido, Langston y cols. (Langston RH, Pavan-Langston D y Dohlman CH; 1974) (156), provocan desepitelizaciones a conejos mediante un trépano a los que les administran IDU al 0,5% y adenina arabinósido (Ara-A) al 3% (las concentraciones usadas clínicamente), y establecen que ningún agente antivírico retarda la proporción de cierre de los defectos epiteliales cuando se comparan con un grupo control, cerrando las úlceras en un espacio de tiempo comprendido entre las 48-72 horas (Fig. 55).

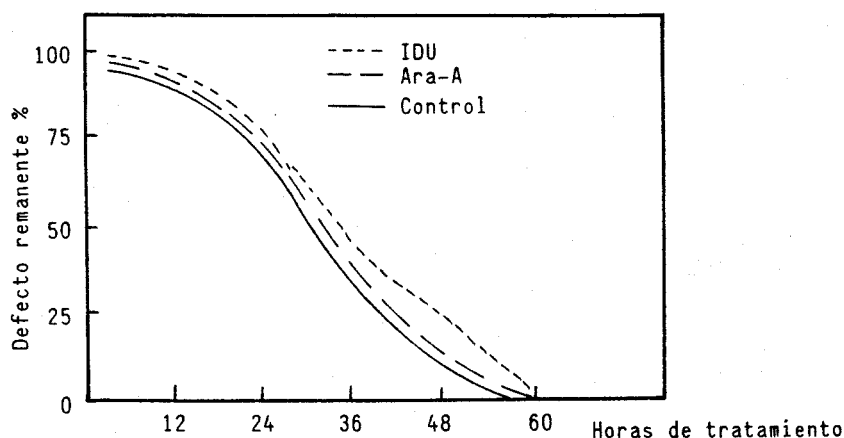


Fig. 55.- Proporción de reepitelización de úlceras del epitelio corneal en conejos. Los ojos fueron tratados con IDU al 0,5%, Ara-A al 3,0% y colirio placebo, cuatro veces al día (Langston RH y cols) (156).

Sin embargo, la regeneración del epitelio de los ojos tratados con IDU mostraron signos de toxicidad (queratitis punteada superficial, edemas y opacidades sub e intraepiteliales y persistentes defectos epiteliales), que no estuvieron presentes en los ojos controles (156).

Posteriormente, Foster y Pavan-Langston (Foster CS y Pavan-Langston D; 1977) (157), determinan los efectos tóxicos en la curación de úlceras

corneales, producidas mediante un trépano, del IDU al 0,1%; adenina arabinósido monofosfato (Ara-Amp) al 3% y F3T al 1%, y establecen que ni el IDU ni la F3T retrasan el cierre de los defectos epiteliales, aunque a las 48 horas de producir la úlcera quedaba el 48% de la superficie ulcerada en el grupo tratado con F3T y el 22% en los ojos que habían recibido IDU, comparado con el 12,5% del grupo control; todos los defectos habían cicatrizado totalmente a las 96 horas (Fig. 56).

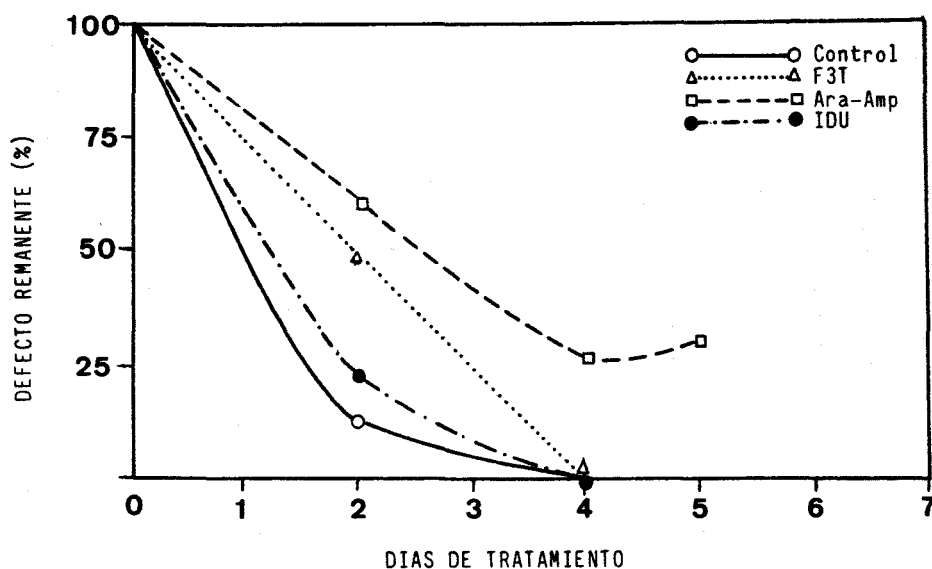


Fig. 56.- Proporción de curación de defectos corneales epiteliales en conejos. Cada punto representa la media del grupo de tratamiento (Foster y Pavan-Langston) (157).

Las córneas que recibieron Ara-Amp sí retrasaron el cierre epitelial, siendo en este grupo donde se apreciaron más efectos tóxicos a nivel histológico (pérdida del epitelio o reducido a una simple capa basal, edema estromal con infiltración celular y vascularización e iritis) mientras que en los otros grupos (IDU y F3T) sólo se apreció un edema intracelular de la capa basal y un suave adelgazamiento del epitelio restante (157).

En 1981, Desbordes y cols. (Desbordes JM, Thompson P, Giraud J, Denis J y Pouliquen Y; 1981) (158), provocan úlceras en conejos mediante vapor de yodo para comprobar el efecto sobre la reepitelización de cinco de los antiviricos más comúnmente usados en clínica: vidarabina al 3%, aciclovir (ACV) al 3%, IDU al 0,24%, iododesoxicitidina al 1% y F3T al 1% y encuentran que aunque todos los antiviricos retrasan la cicatrización,

la diferencia con respecto al grupo control sólo es estadísticamente significativa para la F3T ($p < 0,05$).

El examen histológico de estas córneas puso en evidencia diferencias notables en la calidad del epitelio regenerado, siendo sólo el epitelio tratado con vidarabina semejante al grupo control. La F3T se reveló como la más tóxica de todos los productos empleados, ya que el epitelio de los ojos tratados con este fármaco presentó menos de tres capas celulares, un edema intracelular e intercelular y una capa basal sin ninguna organización (158).

Por lo que parece lógico que los antivíricos no tienen influencia sobre el deslizamiento de las células epiteliales, primer fenómeno que entra en juego para cerrar el defecto, sino que es sobre el segundo fenómeno, el de la multiplicación celular, donde ellos deben actuar (158).

Su modo de acción se caracteriza, en efecto, por una inhibición de la síntesis de la replicación del ADN; el IDU y la desoxicitidina (que se transforma en IDU en el citoplasma celular) se incorporan en el lugar de la timidina en el ADN viral pero también en el celular. Ellos dificultan así el metabolismo del virus y de la célula (158).

La vidarabina, transformada en derivado trifosfato en la célula, inhibe preferencialmente la DNA polimerasa viral. La F3T se incorpora quizás en el ADN viral y celular, pero sobre todo la DNA polimerasa y la timidina quinasa (158).

Un sólo producto parece específicamente antiherpético: el ACV (aciclovir), que es activo sólo en las células infectas, ya que produce la timidina quinasa viral capaz de fosforilar al aciclovir (158).

Concluyen los autores confirmando la toxicidad de la F3T, superior a todos los productos utilizados en el estudio.

Foster y Pavan-Langston (157), también encuentran una toxicidad epitelial en el grupo tratado con F3T superior al IDU.

Gasset y Katzin (Gasset AR y Katzin D; 1975) (159), observan un retardo en la cicatrización de las heridas estromales, ensayado por el estudio de la fuerza de ruptura a la tracción, cuando se usaba la F3T. Igualmente demuestran la progresión de la toxicidad de este fármaco en función de

la dosis administrada.

Esto no debe hacernos olvidar la eficacia antivírica del producto, que es superior a la del IDU sobre queratitis experimental del conejo y sobre la queratitis herpética humana (Pavan-Langston D y Foster CS; 1977) (160).

La F3T sería incluso más eficaz que la adenian arabinósido en el tratamiento de las úlceras geográficas con alcance estromal (Coster DJ, Jones BR y McGill JI; 1979) (161).

La F3T posee una excelente penetración intraocular, ya que se encuentra bajo forma intacta en el humor acuoso (Pavan-Langston D y Nelson DJ; 1979) (162).

La cantidad de F3T absorbida en la administración tópica del tratamiento de la queratitis herpética es demasiado pequeña como para causar signos de toxicidad general.

Arias JF (142), provoca desepitelizaciones en córneas de conejos a los que posteriormente aplica IDU al 0,1% cada 2 horas y observa que el porcentaje de regeneración epitelial a las 24 horas fue del 38,6%, comparado con el 50,76% del grupo control, aunque esta diferencia desaparece antes de alcanzarse la total reepitelización que se consigue en un período de tiempo comprendido entre las 48-72 horas, tanto para el grupo IDU como para el grupo control. No encontrando diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de reepitelización corneal en el lote tratado con IDU en relación al grupo control, ni atipias celulares en ningún momento del estudio.

López (150), en un estudio para comprobar la toxicidad de la F3T sobre la córnea y la influencia que ésta ejerce sobre la reepitelización, aplica esta sustancia al 1% sobre ojos de conejos cuyas córneas fueron previamente desepitelizadas y sobre ojos normales, a distintos intervalos de tiempo (30, 60, 120 y 240 min), comparando los resultados con un grupo control.

Observa que en el grupo control se produce la normal reepitelización (desde el punto de vista macroscópico e histológico), en un espacio de tiempo que oscila entre las 96-120 horas, y en cuanto a los

grupos tratados con F3T obtiene las siguientes conclusiones:

Córneas desepitelizadas

- La F3T muestra una intensa actividad antimitótica sobre el epitelio de la córnea del conejo, demostrado por el retraso en la reepitelización.
- La F3T muestra un intenso retraso en el proceso de reepitelización, retraso que va en razón directa de la frecuencia de administración, siendo mayor a mayor frecuencia de administración.
- El efecto más lesivo se encontró al utilizarla cada 30 min, y el menor cuando se utilizó cada 240 min. Existiendo pues una progresión de la toxicidad de este fármaco en función de la dosis administrada.
- La F3T muestra un efecto de inhibición mitótica tan potente que incluso cuando la córnea ha sido cubierta casi o incluso totalmente, vuelve a presentar soluciones de continuidad, ya que las nuevas células epiteliales no pueden realizar mitosis.
- Los efectos tóxicos de la F3T se hacen evidentes a partir del 5º día, aumentado en días posteriores, con independencia de la frecuencia de administración. Entre los efectos tóxicos se encontraron: edema intra e intercelular, descamación de las capas más superficiales, algunos núcleos picnóticos, edema perinuclear e infiltrado celular.

Córneas epitelizadas

- La F3T mostró una importante actividad antimitótica sobre el epitelio de la córnea, objetivado por la disminución progresiva del número de capas que ocurre tras la administración.
- La pérdida de células epiteliales por efecto de la F3T puede llegar a provocar soluciones de continuidad en el epitelio a las 72 horas de su aplicación, aunque este período de tiempo

es variable y parece estar directamente relacionado con la frecuencia de administración.

- El efecto más lesivo sobre el epitelio se encontró al utilizarla cada 30 min, y el menos lesivo al utilizarla cada 240 min. Existiendo también una progresión de la toxicidad de este fármaco en función de la dosis administrada.
- La F3T ejerce su acción mediante la inhibición del ADN celular lo que se objetiva directamente por la ausencia de mitosis con la correspondiente disminución del número de capas e indirectamente por los demás fenómenos tóxicos: desestructuración y edema intracelular de la capa basal, infiltrado celular necrosis celular y edema perinuclear e intracelular (150).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los padecimientos corneales tienen una especial importancia porque con frecuencia dejan opacidades permanentes que disminuyen seriamente la agudeza visual y porque sus complicaciones que muchas veces las acompañan (infección sobreañadida, perforación), pueden producir la pérdida del ojo.

La cicatrización debida a la ulceración corneal es una causa importante de ceguera y alteración de la visión en todo el mundo.

El epitelio corneal juega un importante papel en la integridad y transparencia de la córnea, constituyendo la primera y principal barrera de protección de la misma, protegiéndola contra la entrada de microorganismos hacia el interior y contra las agresiones físicas o químicas de agentes externos.

La cicatrización de una úlcera corneal se completa con la regeneración del epitelio corneal lesionado y con la firme adhesión del mismo a los tejidos subyacentes, siendo estos procesos inidispensables para lograr una buena curación de la úlcera corneal.

En la curación de las heridas superficiales de la córnea se observan dos procesos en la fase de reepitelización:

- 1º. El restablecimiento de una capa continua de epitelio sobre el área ulcerada, realizado por el deslizamiento de las células epiteliales adyacentes al defecto y el subsiguiente espesamiento de esta capa epitelial a los niveles normales, logrado mediante un incremento en la actividad mitótica de las células epiteliales.

Aunque pequeños defectos epiteliales pueden curar sólo con emigración celular, es necesaria la proliferación celular para cubrir un defecto más grande, siendo ambos procesos imprescindibles para lograr una buena reepitelización, ya que el fallo en alguno de ellos son la base sobre la que asientan numerosas enfermedades.

- 2º. Cuando la continuidad del epitelio ha sido restablecida, se lleva a cabo el desarrollo de la estrecha adhesión entre el

epitelio ya formado con el tejido corneal subyacente.

El epitelio corneal está firmemente unido a la membrana basal y al estroma subyacente mediante complejos de unión especializados, compuestos de hemidesmosomas y fibrillas de anclaje entre la membrana celular de la capa basal y la membrana basal epitelial. Las anormalidades distróficas o traumáticas de estos complejos de unión son de gran importancia en la curación de la herida corneal porque pueden producir en la clínica significantes problemas de erosiones corneales recurrentes y defectos epiteliales persistentes.

Hay una serie de patologías corneales que se ven provocadas o agravadas porque la reepitelización corneal es retrasada, defectuosa o no ocurre nunca, como en las quemaduras alcalinas, queratitis metaherpética, erosión corneal recurrente, queratitis seca, queratitis neurotrófica, queratoconjuntivitis primaveral, etc. En estos casos el tratamiento precoz es fundamental para prevenir posteriores complicaciones.

La erosión corneal recurrente se debe a defectos en la membrana basal del epitelio de la córnea y a que los hemidesmosomas de la capa basal del epitelio no se adhiere a la membrana basal, resultando una anormal y frágil adhesión entre la membrana basal y las células epiteliales; el epitelio de la córnea permanece laxo sobre la membrana basal con un leve edema subepitelial y las capas epiteliales laxas son más vulnerables a la separación y erosión. Clínicamente se caracteriza por la aparición de erosiones corneales que se desarrollan a continuación de una herida, o también de una forma aparentemente espontánea, sin causa alguna, tendiendo a recaídas repetidas y persistentes.

En esta condición clínica y en otras en las que se desarrollan úlceras crónicas y tórpidas, no existe actualmente buenas soluciones terapéuticas, por lo que bajo distintas líneas de investigación se está intentando favorecer esta reepitelización mediante el ensayo de diferentes sustancias químicas, fundamentalmente esteroides anabolizantes y vitaminas y, en los últimos tiempos mediante factores de crecimiento (como el factor de crecimiento epidérmico), y agentes físicos (radiaciones láser, ultravioletas, magnetoterapia, corrientes electromagnéticas pulsátiles,..)

Ya que la regeneración del epitelio corneal normal se realiza con una cronología lo suficientemente precisa y conocida, el estudio de la dinámica de esta reepitelización corneal es una de las vías de estudio más importante para poder evaluar el efecto que cualquier tipo de tratamiento ejerza sobre la misma.

Mediante el presente trabajo vamos a intentar estudiar la acción que sobre dicha reepitelización ejerce un elemento físico del que distintos trabajos de investigación sugieren una acrecentada actividad mitótica cuando se aplica sobre tejidos a las dosis utilizadas normalmente: la radiación láser de infrarrojos de 904 nm a las dosis máximas y mínimas de las utilizadas en clínica, y en condiciones normales y de inhibición mitótica (por administración simultánea de un fármaco antivírico de acción antimetabólica conocida), para ver si podemos modificar o no el metabolismo celular y con ello la dinámica de reepitelización corneal, mediante el estudio de la regeneración epitelial del conejo, previamente desepitelizados, bajo la acción de estos agentes e intentar demostrar la naturaleza del efecto sobre el mismo y de ese modo ver las posibilidades de aplicación en el futuro como un medio que permita modular dicho crecimiento epitelial.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

Para la realización del presente trabajo hemos usado un láser de infrarrojos de una longitud de onda de 904 nm, y como antimetabolito la Trifluorotimidina (F₃T) al 3%, aplicada mediante colirio de uso oftálmico.

Como animal de experimentación hemos utilizado 42 conejos de 3-5 meses de edad y con un peso aproximado de 2,5-3 Kg; los animales han llevado un ritmo de vida circadiano, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. La temperatura ambiente media fue de 18° C y la humedad relativa del aire del 75%. La alimentación se realizó con pienso especial para conejos.

No hemos tenido en cuenta, en nuestro estudio, el sexo del animal por considerar que los procesos regenerativos del epitelio corneal no dependen del mismo.

Los animales fueron divididos en 3 Lotes y 6 Grupos (Tabla 17):

- Lote I: Conejos con córneas desepitelizadas que:
 - no recibieron ningún tratamiento en el ojo izqdo. (control): Grupo 1.
 - recibieron la aplicación tópica de F₃T al 3% a la dosis de 1 gota/2 horas: Grupo 2.
- Lote II: Conejos con córneas desepitelizadas a los que se les aplicó:
 - radiación láser de infrarrojos a la dosis mínima (5 J/cm²/día) y denominada "L₁", en el ojo izqdo: Grupo 3.
 - radiación láser de infrarrojos "L₁" (5 J/cm²/día), más F₃T al 3% (1 gota/2 horas): Grupo 4.
- Lote III: Conejos con córneas desepitelizadas a los que se les aplicó:
 - radiación láser de infrarrojos a la dosis máxima (15 J/cm²/día) y denominada "L₂", en el ojo izqdo: Grupo 5.
 - radiación láser de infrarrojos "L₂" (15 J/cm²/día), más F₃T al 3% (1 gota/2 horas): Grupo 6.

LOTE	Nº DE CONEJOS	OJO	GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS
I	14	Izqdo.	1 (CONTROL)	-	-
		Dcho.	2 (F ₃ T)	F ₃ T	1 gota/2 horas
II	14	Izqdo.	3 (L ₁)	Láser IR	5 J/cm ² /día
		Dcho.	4 (L ₁ + F ₃ T)	Láser IR + F ₃ T	5 J/cm ² /día + 1 gota/2 horas
III	14	Izqdo.	5 (L ₂)	Láser IR	15 J/cm ² /día
		Dcho.	6 (L ₂ + F ₃ T)	Láser IR + F ₃ T	15 J/cm ² /día + 1 gota/2 horas

Tabla 17.- Distribución de los grupos de tratamiento.

La desepitelización corneal fue realizada tras la instilización de una gota de tetracaína al 1% mediante raspado mecánico efectuado con una torundra de gasa estéril, teniendo especial cuidado en no sobrepasar los límites del limbo esclerocorneal, así como de no dañar las capas subyacentes.

La administración del tratamiento farmacológico, F₃T al 3%, se realizó mediante la aplicación de 1 gota en el saco conjuntival a intervalos de 2 horas durante 16 horas diarias, dejando 8 horas de descanso nocturno sin tratamiento.

El tratamiento físico se realizó en colaboración con el Servicio de Laserterapia del Hospital Universitario de Sevilla, mediante la aplicación diaria a través de una fibra óptica, de un láser de infrarrojos de semiconductores (As-Ga) de la marca PROBIONIC con una potencia pico (Pp)

de 120 W, una duración de impulsos (d) de 200 nseg, y a una frecuencia (f) de 999 Hz (frecuencia trófica).

Las dosis aplicadas fueron obtenidas mediante la fórmula:

$$\vec{P} = P_p \cdot d / T, \implies \vec{P} = P_p \cdot d \cdot f, \text{ donde}$$

\vec{P} = potencia media

P_p = potencia pico

d = duración de los impulsos

T = período entre impulsos

f = frecuencia

Aplicando a esta fórmula las características del láser de infrarrojos utilizado en nuestro trabajo, tenemos que:

$$\vec{P} = 120 \times (200 \cdot 10^{-9}) \times 999 = 0,023976 \text{ W}$$

y teniendo en cuenta que

$$E = \vec{P} \cdot t, \text{ donde}$$

E = energía (dosis total aplicada)

\vec{P} = potencia media

t = tiempo (en segundos)

tenemos:

$$E_{1\min} = 0,023976 \times 60 = 1,43856 \text{ julios} = E_1$$

$$E_{3\min} = 0,023976 \times 180 = 4,31568 \text{ julios} = E_2$$

Pero como en las aplicaciones del láser más que conocer la dosis total aplicada nos interesa saber la densidad energética aplicada, y teniendo en cuenta que ésta es la dosis aplicada por centímetro cuadrado, se puede calcular conociendo la dosis total aplicada y dividiéndola por la superficie de aplicación. Esto es:

$$D_E = \frac{D_T \text{ (julios)}}{S \text{ (cm}^2\text{)}}, \text{ donde}$$

D_E = densidad energética

D_T = dosis total aplicada

S = superficie de aplicación

En nuestro caso, el diámetro de la fibra utilizada fue 6 mm, por lo que la superficie de aplicación era de:

$$S = \pi r^2 = 3,14 \times (0,3)^2 = 0,28 \text{ cm}$$

Entonces,

$$D_{E1} = \frac{E_1}{S} = \frac{1,43856}{0,28} \approx 5 \text{ J/cm}^2 = L_1 \text{ (dosis mínima)}$$

$$D_{E2} = \frac{E_2}{S} = \frac{4,31568}{0,28} \approx 15 \text{ J/cm}^2 = L_2 \text{ (dosis máxima)}$$

La duración total del tratamiento para todos los grupos fue de 10 días.

VALORACION MACROSCOPICA

Se realizó un control evolutivo de la superficie corneal ulcerada cada 8 horas durante los 10 días de seguimiento, mediante la aplicación de fluoresceína sódica al 2%. Las distintas superficies ulceradas se esquematizaron en unas figuras en las que se dibujó cada 8 horas la superficie ulcerada de cada ojo hasta el final del tratamiento.

Hay que tener en cuenta que las córneas y las superficies ulceradas dibujadas en estas figuras no son exactamente del mismo tamaño que las reales, sino que proporcionalmente se aumentaron un poco para poder ver así mejor dichas úlceras y cómo evolucionaban en el tiempo, facilitando igualmente las posteriores mediciones a que fueron sometidas. Pero hemos de anotar que en los análisis estadísticos realizados en la reepitelización macroscópica, este pequeño aumento efectuado en la esquematización no altera en absoluto los resultados obtenidos, ya que el estudio de la evolución de la ulceración a lo largo del tiempo se realizó mediante el análisis de las rectas de regresión obtenidas con los datos, y en este caso, al efectuar siempre el mismo aumento, la superficie medida será proporcional en todos los casos, no alterándose, pues, los resultados obtenidos.

La evolución de la reepitelización a lo largo del tiempo fue representada, como hemos dicho anteriormente, mediante rectas de regresión

lineal, obtenida con los valores de cada grupo mediante la fórmula:

$$y = A + Bx \quad /1/, \text{ donde}$$

$$B = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$A = \frac{\sum y - B \cdot \sum x}{n}$$

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{[n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2] [n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

donde:

A = término constante

B = coeficiente de regresión

r = coeficiente de correlación

n = número de términos

Las rectas obtenidas en cada grupo fueron comparadas con las de los demás, para ver si había o no diferencias estadísticamente significativas, mediante la fórmula:

$$t_{exp} = \frac{|B_1 - B_2|}{SD \sqrt{\frac{1}{(xx)_1} + \frac{1}{(xx)_2}}} \quad /2/, \text{ donde:}$$

B = coeficiente de regresión

$$(xx)_1 = \sum (x - \bar{x})_1^2 = n \cdot \sigma_{x1}^2$$

$$(xx)_2 = \sum (x - \bar{x})_2^2 = n \cdot \sigma_{x2}^2$$

$$SD = \sqrt{\frac{(n_1 - 2) S_1^2 + (n_2 - 2) S_2^2}{n_1 + n_2 - 4}}$$

$$S_1^2 = \frac{1}{n_1 - 2} \left[\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n_1}}{\sum (x - \bar{x})_1^2} \right]$$

$$S_2^2 = \frac{1}{n_2 - 2} \left[\sum (y - \bar{y})^2 - \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n_2}}{\sum (x - \bar{x})_2^2} \right]$$

n_1 = tamaño de la primera

n_2 = tamaño de la segunda

resultándonos un valor de t_{exp} que se distribuye según la t de Student con $n_1 + n_2 - 4$ grados de libertad.

VALORACION MICROSCOPICA

Para los estudios microscópicos fue sacrificado un animal de cada grupo:

- cada 12 horas, los primeros 4 días .
- cada 24 horas, desde el día 5º al 10º.

Sus ojos fueron enucleados y sus córneas divididas a la mitad, dejando una parte para el estudio con microscopía óptica y la otra para el estudio con microscopía electrónica de transmisión (M.E.T.), según la siguiente pauta:

A) ESTUDIO CON MICROSCOPIA OPTICA

Se realizó en todos los grupos cada vez que era sacrificado un animal, es decir, cada: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 240 horas.

Para ello, una vez enucleados los ojos, se fijaron inmediatamente en formal al 10%, conservándose a una temperatura media de 4º C hasta su posterior procesamiento histológico.

La preparación histológica se realizó mediante la inclusión de las muestras en parafina según procedimiento habitual; para ello se introducen las muestras en el aparato de la marca AUTOTECHNICON, que realiza el proceso automáticamente, pasando las muestras sucesivamente por formol, alcoholes absolutos, xilol y finalmente por parafina, donde la muestra ya queda fijada.

Una vez obtenidos los cortes histológicos, fueron sometidos a tres tipos de tinciones, según Smith y Bruton (Smith A y Bruton J, 1977) (163), de acuerdo a los diferentes métodos de estudio practicados por nosotros:

a) Tinción de hematoxilina-eosina (HE)

Esta técnica de tinción, hematoxilina ácida y eosina de Ehrlich, fue realizada para el estudio histológico de la regeneración epitelial, para la observación de la morfología de la capa basal, del número de capas en las distintas zonas del epitelio y del número de capas totales en las distintas zonas de la córnea (periférica, pericéntrica y central).

b) Tinción de PAS

Tinción del ácido peryódico de Schiff, realizada para estudiar la membrana basal epitelial, por ser dicha membrana PAS positiva y captar selectivamente este colorante.

c) Reacción de Feulgen para DNA intranuclear

Esta técnica de tinción tiñe selectivamente los núcleos, por lo que fue utilizada en el estudio citométrico para medir la superficie nuclear de las células del epitelio.

Los estudios realizados mediante microscopía óptica consistieron en:

- EN CADA GRUPO:

- 1) Estudio de la regeneración epitelial, para el cual se diseñaron unas gráficas donde se representaron, para cada corte histológico, la morfología de la célula basal, el número de capas basales, intermedias, superficiales y totales, en las distintas zonas de la córnea (paracentral, periférica y central).
- 2) Estudios citométricos del epitelio en regeneración, que para todos los cortes histológicos de los distintos grupos consistieron en:
 - número de capas totales de la zona central de la córnea.
 - número de células en la zona periférica y en la zona central, por unidad de longitud constante (40 μ).

- superficie celular media (en mm^2), en la zona periférica y en la zona central de la córnea.
- superficie nuclear media (en mm^2), en la zona periférica y en la zona central de la córnea.
- relación núcleo/célula, en las mismas zonas que las anteriores, y obtenida mediante la división entre la superficie nuclear y la superficie celular.

Los estudios citométricos se llevaron a cabo en cada corte histológico mediante la toma de fotografías de las distintas zonas de la córnea para su posterior análisis cuantimétrico con el aparato de morfometría MOP AMO 3, de la casa KONTRON, que es un analizador cuantitativo semiautomático de imágenes, en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de Sevilla. Los valores correspondientes a la zona periférica fueron el resultado de la media de los valores de las dos zonas periféricas de la córnea.

Con los valores obtenidos en cada estudio de cada grupo se realizaron unas tablas y unas rectas de regresión dadas por /1/, para ver su evolución a lo largo del tiempo de seguimiento.

- ENTRE GRUPOS:

Se procedió a comparar los valores obtenidos en cada estudio entre los diferentes grupos, para comprobar si hubo o no diferencias estadísticamente significativas, mediante:

- el análisis de la Varianza, cuando se comparaban 3 ó más grupos.
- el análisis del Test de Student, cuando se comparaban 2 grupos entre sí.

Igualmente, en cada estudio se procedió a la comparación de las distintas rectas de regresión de cada grupo mediante la fórmula dada por /2/, para ver si hubo o no diferencias estadísticamente significativas.

Todos los estudios de microscopía óptica se realizaron con el Microscopio Universal de Investigación NU-2 de la casa CARL ZEISS, en el Centro Nacional de Medios de Protección, del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Delegación Provincial de Sevilla.

B) ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (M.E.T.)

Se realizó en todos los grupos a las 24, 48, 72, 96, 168 y 240 horas tras la desepitelización.

Para ello se obtuvieron unas muestras de 1 mm³ aproximadamente que fueron fijadas en glutaraldehído al 4% en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,4; postfijadas en tetróxido de osmio al 2% en tampón collidine 0,2 M durante 2 horas a 4° C, y teñidas en bloque con acetato de uranio al 0,5% en tampón veronal. Posteriormente fueron deshidratadas en una serie de gradientes de alcohol e incluídas en Epon 812.

Las secciones ultrafinas se obtuvieron en un ultramicrotomo ULTRATOME REICHERT-JUNG con cuchillas fabricadas mediante el aparato de la casa LKB, tipo 7801 B, y fueron teñidas con acetato de uranio y citrato de plomo. Previamente se habían realizado las secciones finas, con el mismo ultramicrotomo, que se tiñeron con azul de toluidina para elegir las zonas más representativas.

La observación de las muestras se efectuó con el microscopio electrónico de transmisión (M.E.T.) PHILLIPS EM 300, a 60 KV, en el Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Universidad de Córdoba y en el Departamento de Anatomía Patológica de la Ciudad Sanitaria "Virgen del Rocío" de Sevilla.

Los campos más representativos fueron fotografiados en placas AGFA SCIENTIA FILM, de 6,5 x 9 cm. y posteriormente positivados a papel.

Los estudios realizados con M.E.T. consistieron en:

- estudio morfológico de la regeneración epitelial
- estudio ultraestructural de las células en regeneración, observando:
 - tamaño y morfología del núcleo
 - membrana nuclear

- existencia de cromatina nuclear
 - organelas citoplasmáticas
 - membranas celulares
 - uniones intercelulares
 - microvellosidades de las células superficiales
 - edemas y vacuolas intra e intercelulares
 - atipias celulares
 - etc.
- estudio de la membrana basal del epitelio, observando su continuidad y, fundamentalmente, la cantidad y calidad de los hemidesmosomas en su unión con la célula basal epitelial; realizando posteriormente un estudio comparativo entre los distintos grupos de dichos hemidesmosomas y la observación de la posible existencia del retículo de fibrillas de anclaje.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. ANTONIO MARTIN AROCA
titulada ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA REEPITELIZACION
CORNEAL DEL CONEJO BAJO LA ACCION
DE LA RADIACION LASER DE INFRARROJOS DE 904 NM
acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Sevilla, 10 de Julio 1987

El Vocál,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,