

Manuscript Number: OFTALMOLOGIA-D-14-00222R1

Title: EFECTOS PRODUCIDOS POR DIFERENTES TIPOS DE LASER EN CORNEA DE COBAYOS:
IDENTIFICACIÓN DE UN LASER CAPAZ DE PROVOCAR LESIONES SUPERFICIALES SIN DEJAR
CICATRICES. EFFECTS PRODUCED BY DIFFERENT TYPES OF LASER IN CORNEA OF GUINEA PIGS:
IDENTIFICATION OF A LASER CAPABLE OF PRODUCING SUPERFICIAL LESIONS WITHOUT LEAVING
SCARS.

Article Type: Original

Keywords: Córnea, cobayos, láser, láser de argón, lesión, cicatrización. Cornea, guinea pig, laser, laser
Argon, injury, healing.

Corresponding Author: Prof. horacio serra, PhD

Corresponding Author's Institution: Faculty of Chemical Science

First Author: Alicia C Suárez

Order of Authors: Alicia C Suárez; María F Suarez; Nicolás Crim; Rodolfo Monti; Julio A Urrets-Zavalía;
Horacio Serra

Abstract: Purpose: Climatic Droplets Keratopathy (CDK) is closely associated with superficial corneal
erosions and lack of protective mechanisms against the harmful effects of ultraviolet radiation (UVR)
during a prolonged period of time. One of the difficulties in studying the pathogenic mechanisms
involved in this human disease is the lack of an experimental animal model. In this paper we seek to
investigate the effects of four types of lasers at various powers and time conditions on the normal
guinea pigs' cornea in order to select only one laser condition that reversibly injures the epithelium
and superficial stroma, without leaving scarring.

Methods: Damage was induced in the cornea of guinea pigs using different powers and exposure times
of 4 types of Laser: Argon, CO₂, Diode and ND-Yag and such injuries were evaluated by biomicroscopy
(BM) and optical microscopy. Corneas from other normal animals were exposed to Argon laser (350
mW, 0.3 seconds, 50 µm of diameter) and the induced alterations were studied at different times using
BM, Optical Coherence Tomography (OCT) and Transmission Electron Microscopy (TEM).

Results: Only Argon laser at 350 mW, 0.3 seconds, 50 µm of diameter produced epithelium and
superficial stroma lesions. Some leukomas were observed by BM, and they disappeared by day 15.
Corneal thickness measured by OCT decreased in the eyes treated with Argon laser, during the first
week. By TEM, different ultra structural alterations in corneal epithelium and stroma were observed
during the early days, which disappeared by day 15.

Conclusions: It was possible to develop reproducibly corneal epithelium and anterior stroma injuries
using Argon laser at 350 mW, 0.3 seconds, 50 µm of diameter. In vivo and in vitro studies showed that
injured corneas with these laser conditions did not leave irreversible microscopic or ultra structural
alterations. This protocol of corneal erosion combined with exposure to ultraviolet radiation (UVR)
and partial deficiency of ascorbate (AA) in the animals' diet for an extended period of time has been
used in order to try to develop an experimental model of CDK.

Objetivo: La queratopatía climática esferoidea (QCE) está íntimamente asociada a erosiones corneales
superficiales y carencia de mecanismos protectores contra los efectos nocivos de la radiación

ultravioleta (RUV) durante muchos años. Debido a que una de las dificultades en el estudio de los mecanismos patogénicos de esta enfermedad humana es la ausencia de un modelo experimental, en este trabajo quisimos identificar cual es el mejor método para estudiar una de las variables involucradas en la génesis de esta enfermedad (erosiones superficiales de la córnea). A tal fin investigamos los efectos producidos por cuatro tipos de láser con diferentes condiciones de potencia y tiempo en la córnea de cobayos normales a los fines de seleccionar un láser y condición que lesione solamente el epitelio y estroma superficial, de manera reversible sin dejar cicatrices. Métodos: Se indujeron daños en la córnea de cobayos utilizando distintas potencias y tiempos con cuatro tipos de láser: Argón, CO₂, Diodo y ND-Yag en distintos grupos de animales y se evaluaron dichas lesiones por biomicroscopía (BM) y microscopía óptica (MO). Córneas de otros animales normales fueron expuestas a láser de Argón (350 mW, 0,3 segundos, 50 µm de diámetro) y las alteraciones inducidas se estudiaron a diferentes tiempos utilizando BM, Tomografía de Coherencia Óptica (TCO) y Microscopía Electrónica (ME).

Resultados: Solo el láser Argón a una potencia de 350 mW, 0,3 segundos, 50 µm de diámetro produjo lesiones de epitelio y estroma superficial, manteniéndose indemne el endotelio. Por BM se observaron algunos leucomas que desaparecieron hacia el día 15. Mediante TCO se observó un adelgazamiento del espesor corneal en los ojos tratados con esas condiciones de láser Argón durante la primera semana. Mediante ME, se observaron diferentes alteraciones ultra estructurales en epitelio y estroma corneal durante los primeros días, las cuales desaparecieron hacia el día 15.

Conclusiones: Fue posible desarrollar lesiones corneales en epitelio y estroma anterior de cobayos de manera reproducible mediante el uso de láser Argón. Los estudios in vivo e in vitro demostraron que las córneas lesionadas con este láser y en esas condiciones no dejaron alteraciones microscópicas ni ultraestructurales irreversibles. Este modo de erosión corneal combinado con exposición a radiación ultravioleta (RUV) y déficit parcial de ascorbato (AA) en la dieta de los animales durante un período prolongado de tiempo está siendo utilizado a los fines de intentar desarrollar un modelo experimental de QCE.

Suggested Reviewers:

Response to Reviewers: Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología
2015

Abril 13,

Director

Prof. Dr. Julián García-Feijó

Estimado Dr. García-Feijó

Es para mí un placer tener la posibilidad de enviar nuevamente nuestro trabajo de investigación básica (Ref. OFTALMOLOGIA-D-14-00222) a los fines de ser re considerado para la publicación en Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, luego de haber realizado algunas modificaciones para responder a los comentarios del evaluador externo (indicados en letras azules).

COMENTARIOS PARA LOS AUTORES:

El título y el objetivo no reflejan el verdadero objetivo que no es otro que la búsqueda de un modelo patológico experimental reproducible en corneas de animales para el estudio de la Queratopatía Climática Esferoidea.

Para ello recrean las condiciones ambientales y parten de la hipótesis de que algún láser puede producir una lesión similar a la que se supone en la QCE; cuando su aplicación daña solamente la córnea desde el epitelio hasta la porción anterior del estroma.

Concluyen que el láser argón, a una configuración de 350 mW con 0,3 seg, y un diámetro de 50 µm, combinadas con exposición a RUV y déficit de AA por períodos prolongados de tiempo podrían

conseguir intentar obtener un modelo experimental de QCE. No hay estudios anatómo-patológicos que corroboren este modelo, solo se basa en la reversibilidad de las lesiones corneales y la no lesión de la porción posterior de la córnea.

Por lo tanto, los autores deberán ajustar más el título y el objetivo a lo que realmente es, además de justificar mejor el modelo mediante estudio anatómo-patológico comparado con la QCE.

Si los autores no son capaces de evidenciar suficientemente el modelo de lesión en su pretensión de que remede una Queratopatía Climática Esferoidea, el artículo pierde claramente mérito.

RESPUESTAS A LOS COMENTARIOS EVALUADOR EXTERNO:

Hemos reemplazado el título anterior del manuscrito: "EFECTOS DEL LASER ARGON EN CORNEA DE COBAYOS: ESTUDIOS DE LESIONES PRODUCIDAS Y SU RECUPERACIÓN"; por el siguiente título: "EFECTOS PRODUCIDOS POR DIFERENTES TIPOS DE LASER EN CORNEA DE COBAYOS: IDENTIFICACIÓN DE UN LASER CAPAZ DE PROVOCAR LESIONES SUPERFICIALES SIN DEJAR CICATRICES".

En este trabajo se investigaron los efectos producidos por cuatro tipos de láser (Argón, CO₂, Diodo y ND-Yag) con diferentes condiciones de potencia y tiempo haciendo foco en la superficie de córnea de cobayos normales. Posteriormente se seleccionó el láser Argón a 350 mW, por 0,3 seg, y un diámetro de 50 micras; debido a que fue el único láser y la única configuración capaz de lesionar el epitelio y estroma superficial. Más aún los estudios cinéticos de recuperación de las lesiones producidas claramente demostraron que esta configuración de láser Argón no deja cicatrices corneales.

Nuestro grupo de trabajo viene investigando esta enfermedad degenerativa de la cornea humana hace varios años y ha recientemente publicado una revisión sobre la historia de esta enfermedad cuyas causas son multifactoriales, las características clínicas, el diagnóstico, el tratamiento y los últimos avances sobre patogénesis (CLIMATIC DROPLET KERATOPATHY: AN OLD DISEASE IN NEW CLOTHES. HORACIO M. SERRA, et al., ACTA OPHTHALMOLOGICA, 2015 JAN 28. DOI: 0.1111/AOS.12628. - ISSN: 1755-375X).

Entre algunos de nuestros hallazgos podemos mencionar que en pacientes con QCE se produce una reacción de hipersensibilidad en la córnea en donde inicialmente participan componentes pro-inflamatorios. PRO INFLAMMATORY CYTOKINES AND GELATINASES IN CLIMATIC DROPLET KERATOPATHY. Juha M. Holopainen, Alexandra Robciuc, Thamara A. Cafaro, Maria F. Suarez, Yrjö T. Konttinen, Khalid Tabbara, Taina Tervahartiala, Timo Sorsa, Julio A. Urrets-Zavalía, and Horacio M. Serra. IOVS, 2012; 53(7):3527-35. ISSN: 0146-0404.

Debido a que la córnea de estas personas están expuestas a un bombardeo crónico de partículas transportadas por el viento durante muchos años, y carecen de varios de los mecanismos protectores contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (RUV) tales como: 1) bajos niveles de ácido ascórbico (AA), 2) no utilización de lentes y/o sombreros durante su jornada laboral a la intemperie en zonas desérticas, se produciría la degradación de ciertas proteínas sensibles a los efectos directos e indirectos de la RUV y la acumulación progresiva en la zona sub epitelial de la córnea. CLIMATIC DROPLET KERATOPATHY IN ARGENTINA: INVOLVEMENT OF ENVIRONMENTAL AGENTS IN ITS GENESIS WHICH WOULD OPEN THE PROSPECT FOR NEW THERAPEUTIC INTERVENTIONS. Suárez María F Correa Leandro, Crim Nicolás Espósito Evangelina, Monti Rodolfo, Urrets-Zavalía Julio A, Serra Horacio M. BioMed Research International, March 2015, under review. ISSN: 2314-6133

Una de las dificultades para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en esta enfermedad es la ausencia de un modelo experimental. Por tal motivo estamos investigando si animales expuestos a las mismas condiciones ambientales desfavorables que los individuos que padecen QCE (lesiones reiteradas en la córnea, prolongada exposición a RUV, y falta de adecuados mecanismos protectores a los efectos de la misma) desarrollan anomalías corneales similares a estos pacientes. El animal apropiado para intentar reproducir esta enfermedad humana a nivel experimental es el cobayo ya que al igual que los humanos han perdido su capacidad para sintetizar AA (importante protector contra la RUV en la cornea) debido a la ausencia de la enzima L-gulonolactono oxidasa.

Las tres variables a investigar para intentar desarrollar un modelo experimental de QCE son:

1) las erosiones corneales,

- 2) exposición a altas dosis de RUV, y
- 3) falla en los mecanismos protectores contra dicha radiación.

En uno de nuestros trabajos previos cuando investigamos las variables 2 y 3 en un esquema experimental a corto tiempo (4 meses) pudimos demostrar que cobayos con deficiencia de AA y expuestos a RUV presentan alteraciones ultraestructurales en el estroma corneal. THE EFFECT OF VITAMIN C DEFICIENCY AND CHRONIC ULTRAVIOLET-B EXPOSURE ON CORNEAL

ULTRASTRUCTURE: A PRELIMINARY INVESTIGATION. Sally Hayes, Thamara A Cafaro, Patricia Borkowska, Jon Harris, Christina Kamma-Lorger, Craig Boote, Robert Young, Jennifer Hiller, Nicholas Terrill, Keith M Meek, Horacio M Serra. Molecular Vision. 2011, 17:3107-3115. ISSN: 1090-0535

Debido a que otra de las variables a estudiar en estos animales son los efectos producidos en la córnea por lesiones superficiales reiteradas durante un prolongado período de tiempo, es que realizamos este trabajo de investigación buscando que tipo de láser y en que configuración es capaz de provocar lesiones superficiales que puedan ser realizadas de manera reproducible.

La conclusión del este trabajo que deseamos publicar en Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, es que mediante estudios microscópicos y ultra estructurales, solo el láser Argón a 350 mW, por 0,3 seg, y a un diámetro de 50 micras produce lesiones en el epitelio y estroma superficial de la córnea de cobayos, que se recuperen al poco tiempo sin dejar cicatrices.

De esta manera podríamos utilizar este método para producir erosiones corneales repetidamente en cobayos y estudiar las tres variables simultáneamente (erosiones recurrentes, exposición a RUV y dieta deficiente en AA) durante un período prolongado de tiempo, a los fines de intentar desarrollar un modelo experimental de QCE.

Espero que con estas aclaraciones y cambios realizados, nuestro trabajo sea apropiado para su publicación en Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología.

Aprovecho esta oportunidad para saludarlo muy atentamente.

Horacio Marcelo Serra PhD.

Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología

Abril 13, 2015

Director**Prof. Dr. Julián García-Feijoó****Estimado Dr. García-Feijoó**

Es para mí un placer tener la posibilidad de enviar nuevamente nuestro trabajo de investigación básica (Ref. OFTALMOLOGIA-D-14-00222) a los fines de ser re considerado para la publicación en Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, luego de haber realizado algunas modificaciones para responder a los comentarios del evaluador externo (indicados en letras azules).

COMENTARIOS PARA LOS AUTORES:

El título y el objetivo no reflejan el verdadero objetivo que no es otro que la búsqueda de un modelo patológico experimental reproducible en corneas de animales para el estudio de la Queratopatía Climática Esferoidea.

Para ello recrean las condiciones ambientales y parten de la hipótesis de que algún láser puede producir una lesión similar a la que se supone en la QCE; cuando su aplicación daña solamente la cornea desde el epitelio hasta la porción anterior del estroma.

Concluyen que el láser argón, a una configuración de 350 mW con 0,3 seg, y un diámetro de 50 μ m, combinadas con exposición a RUV y déficit de AA por períodos prolongados de tiempo podrían conseguir intentar obtener un modelo experimental de QCE. No hay estudios anatómo-patológicos que corroboren este modelo, solo se basa en la reversibilidad de las lesiones corneales y la no lesión de la porción posterior de la córnea.

Por lo tanto, los autores deberán ajustar más el título y el objetivo a lo que realmente es, además de justificar mejor el modelo mediante estudio anatómo-patológico comparado con la QCE.

Si los autores no son capaces de evidenciar suficientemente el modelo de lesión en su pretensión de que remede una Queratopatía Climática Esferoidea, el artículo pierde claramente mérito.

RESPUESTAS A LOS COMENTARIOS EVALUADOR EXTERNO:

Hemos reemplazado el título anterior del manuscrito: “EFECTOS DEL LASER ARGON EN CORNEA DE COBAYOS: ESTUDIOS DE LESIONES PRODUCIDAS Y SU RECUPERACIÓN”; por el siguiente título:

“EFECTOS PRODUCIDOS POR DIFERENTES TIPOS DE LASER EN CORNEA DE COBAYOS: IDENTIFICACIÓN DE UN LASER CAPAZ DE PROVOCAR LESIONES SUPERFICIALES SIN DEJAR CICATRICES”.

En este trabajo se investigaron los efectos producidos por cuatro tipos de láser (Argón, CO₂, Diodo y ND-Yag) con diferentes condiciones de potencia y tiempo haciendo foco en la superficie de córnea de cobayos normales. Posteriormente se seleccionó el láser Argón a 350 mW, por 0,3 seg, y un diámetro de 50 micras; debido a que fue el único

láser y la única configuración capaz de lesionar el epitelio y estroma superficial. Más aún los estudios cinéticos de recuperación de las lesiones producidas claramente demostraron que esta configuración de láser Argón no deja cicatrices corneales.

Nuestro grupo de trabajo viene investigando esta enfermedad degenerativa de la cornea humana hace varios años y ha recientemente publicado una revisión sobre la historia de esta enfermedad cuyas causas son multifactoriales, las características clínicas, el diagnóstico, el tratamiento y los últimos avances sobre patogénesis (**CLIMATIC DROPLET KERATOPATHY: AN OLD DISEASE IN NEW CLOTHES**. HORACIO M. SERRA, et al., *ACTA OPHTHALMOLOGICA*, 2015 JAN 28. DOI: 0.1111/AOS.12628. - ISSN: 1755-375X).

Entre algunos de nuestros hallazgos podemos mencionar que en pacientes con QCE se produce una reacción de hipersensibilidad en la córnea en donde inicialmente participan componentes pro-inflamatorios. **PRO INFLAMMATORY CYTOKINES AND GELATINASES IN CLIMATIC DROPLET KERATOPATHY**. Juha M. Holopainen, Alexandra Robciuc, Thamara A. Cafaro, Maria F. Suarez, Yrjö T. Kontinen, Khalid Tabbara, Taina Tervahartiala, Timo Sorsa, Julio A. Urrets-Zavalía, and Horacio M. Serra · *IOVS*, 2012; 53(7):3527-35. ISSN: 0146-0404.

Debido a que la córnea de estas personas están expuestas a un bombardeo crónico de partículas transportadas por el viento durante muchos años, y carecen de varios de los mecanismos protectores contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (RUV) tales como: 1) bajos niveles de ácido ascórbico (AA), 2) no utilización de lentes y/o sombreros durante su jornada laboral a la intemperie en zonas desérticas, se produciría la degradación de ciertas proteínas sensibles a los efectos directos e indirectos de la RUV y la acumulación progresiva en la zona sub epitelial de la córnea. **CLIMATIC DROPLET KERATOPATHY IN ARGENTINA: INVOLVEMENT OF ENVIRONMENTAL AGENTS IN ITS GENESIS WHICH WOULD OPEN THE PROSPECT FOR NEW THERAPEUTIC INTERVENTIONS**. Suárez María F Correa Leandro, Crim Nicolás Espósito Evangelina, Monti Rodolfo, Urrets-Zavalía Julio A, Serra Horacio M. *BioMed Research International*, **March 2015, under review**. ISSN: 2314-6133

Una de las dificultades para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en esta enfermedad es la ausencia de un modelo experimental. Por tal motivo estamos investigando si animales expuestos a las mismas condiciones ambientales desfavorables que los individuos que padecen QCE (lesiones reiteradas en la córnea, prolongada exposición a RUV, y falta de adecuados mecanismos protectores a los efectos de la misma) desarrollan anormalidades corneales similares a estos pacientes. El animal apropiado para intentar reproducir esta enfermedad humana a nivel experimental es el cobayo ya que al igual que los humanos han perdido su capacidad para sintetizar AA (importante protector contra la RUV en la cornea) debido a la ausencia de la enzima L-gulono- γ -lactono oxidasa.

Las tres variables a investigar para intentar desarrollar un modelo experimental de QCE son:

- 1) las erosiones corneales,
- 2) exposición a altas dosis de RUV, y
- 3) falla en los mecanismos protectores contra dicha radiación.

En uno de nuestros trabajos previos cuando investigamos las variables 2 y 3 en un esquema experimental a corto tiempo (4 meses) pudimos demostrar que cobayos con deficiencia de AA y expuestos a RUV presentan alteraciones ultraestructurales en el estroma corneal. **THE EFFECT OF VITAMIN C DEFICIENCY AND CHRONIC ULTRAVIOLET-B EXPOSURE ON CORNEAL ULTRASTRUCTURE: A PRELIMINARY INVESTIGATION.** Sally Hayes, Thamara A Cafaro, Patricia Borkowska, Jon Harris, Christina Kamma-Lorger, Craig Boote, Robert Young, Jennifer Hiller, Nicholas Terrill, Keith M Meek, Horacio M Serra. *Molecular Vision*. 2011, 17:3107-3115. ISSN: 1090-0535

Debido a que otra de las variables a estudiar en estos animales son los efectos producidos en la córnea por lesiones superficiales reiteradas durante un prolongado período de tiempo, es que realizamos este trabajo de investigación buscando que tipo de láser y en que configuración es capaz de provocar lesiones superficiales que puedan ser realizadas de manera reproducible.

La conclusión del este trabajo que deseamos publicar en **Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología**, es que mediante estudios microscópicos y ultraestructurales, solo el láser Argón a 350 mW, por 0,3 seg, y a un diámetro de 50 micras produce lesiones en el epitelio y estroma superficial de la córnea de cobayos, que se recuperen al poco tiempo sin dejar cicatrices.

De esta manera podríamos utilizar este método para producir erosiones corneales repetidamente en cobayos y estudiar las tres variables simultáneamente (erosiones recurrentes, exposición a RUV y dieta deficiente en AA) durante un período prolongado de tiempo, a los fines de intentar desarrollar un modelo experimental de QCE.

Espero que con estas aclaraciones y cambios realizados, nuestro trabajo sea apropiado para su publicación en Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología.

Aprovecho esta oportunidad para saludarlo muy atentamente.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Horacio Serra', with a stylized flourish at the end.

Horacio Marcelo Serra PhD.

EFFECTOS PRODUCIDOS POR DIFERENTES TIPOS DE LASER EN CORNEA DE COBAYOS: IDENTIFICACIÓN DE UN LASER CAPAZ DE PROVOCAR LESIONES SUPERFICIALES SIN DEJAR CICATRICES.

EFFECTS PRODUCED BY DIFFERENT TYPES OF LASER IN CORNEA OF GUINEA PIGS: IDENTIFICATION OF A LASER CAPABLE OF PRODUCING SUPERFICIAL LESIONS WITHOUT LEAVING SCARS.

Alicia C. Suárez,^{1*} María F. Suárez,^{2*} Nicolás Crim,³ Rodolfo Monti,³ Julio A. Urrets-Zavalía,³ Horacio M. Serra.²

*: Estos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo

Autor para correspondencia: Horacio M. Serra. (hserra@fcq.unc.edu.ar)

¹Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Agronomía y Veterinaria; ²Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento Bioquímica Clínica;

³Universidad Católica de Córdoba, Clínica Universitaria Reina Fabiola, Servicio de Oftalmología.

Fuentes de apoyo: Subvenciones de SECYT-UNC, CONICET, FONCYT (2012, Argentina).

Ningún autor tiene interés comercial ni ha recibido apoyo de ninguna compañía.

Título abreviado: Uso de Láser Argón para producir lesión superficial corneal reproducible.

Recuperación de lesiones producidas por láser Argón en corneas de cobayos.

Sección a la que se dirige el artículo: artículos originales.

Los autores certifican que este trabajo no ha sido publicado ni está en vías de consideración para publicación en otra revista. Asimismo transfieren los derechos de propiedad (copyright) del presente trabajo a la Sociedad Española de Oftalmología.

EFFECTOS PRODUCIDOS POR DIFERENTES TIPOS DE LASER EN CORNEA DE COBAYOS:

IDENTIFICACIÓN DE UN LASER CAPAZ DE PROVOCAR LESIONES SUPERFICIALES SIN
DEJAR CICATRICES.

EFFECTS PRODUCED BY DIFFERENT TYPES OF LASER IN CORNEA OF GUINEA PIGS:

IDENTIFICATION OF A LASER CAPABLE OF PRODUCING SUPERFICIAL LESIONS
WITHOUT LEAVING SCARS.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract:

1
2 *Purpose:* Climatic Droplets Keratopathy (CDK) is closely associated with superficial corneal erosions and
3
4 lack of protective mechanisms against the harmful effects of ultraviolet radiation (UVR) during a prolonged
5
6 period of time. One of the difficulties in studying the pathogenic mechanisms involved in this human disease
7
8 is the lack of an experimental animal model. In this paper we seek to investigate the effects of four types of
9
10 lasers at various powers and time conditions on the normal guinea pigs' cornea in order to select only one
11
12 laser condition that reversibly injures the epithelium and superficial stroma, without leaving scarring.
13
14

15
16 *Methods:* Damage was induced in the cornea of guinea pigs using different powers and exposure times of 4
17
18 types of Laser: Argon, CO₂, Diode and ND-Yag and such injuries were evaluated by biomicroscopy (BM)
19
20 and optical microscopy. Corneas from other normal animals were exposed to Argon laser (350 mW, 0.3
21
22 seconds, 50 µm of diameter) and the induced alterations were studied at different times using BM, Optical
23
24 Coherence Tomography (OCT) and Transmission Electron Microscopy (TEM).
25
26

27
28
29 *Results:* Only Argon laser at 350 mW, 0.3 seconds, 50 µm of diameter produced epithelium and superficial
30
31 stroma lesions. Some leukomas were observed by BM, and they disappeared by day 15. Corneal thickness
32
33 measured by OCT decreased in the eyes treated with Argon laser, during the first week. By TEM, different
34
35 ultra structural alterations in corneal epithelium and stroma were observed during the early days, which
36
37 disappeared by day 15.
38
39

40
41 *Conclusions:* It was possible to develop reproducibly corneal epithelium and anterior stroma injuries using
42
43 Argon laser at 350 mW, 0.3 seconds, 50 µm of diameter. In vivo and in vitro studies showed that injured
44
45 corneas with these laser conditions did not leave irreversible microscopic or ultra structural alterations. This
46
47 protocol of corneal erosion combined with exposure to ultraviolet radiation (UVR) and partial deficiency of
48
49 ascorbate (AA) in the animals' diet for an extended period of time has been used in order to try to develop an
50
51 experimental model of CDK.
52
53

54
55
56 **Key words:** Cornea, guinea pig, laser, laser Argon, injury, healing.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Resumen

1
2 *Objetivo:* La queratopatía climática esferoidea (QCE) está íntimamente asociada a erosiones corneales
3
4 superficiales y carencia de mecanismos protectores contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta
5
6 (RUV) durante muchos años. Debido a que una de las dificultades en el estudio de los mecanismos
7
8 patogénicos de esta enfermedad humana es la ausencia de un modelo experimental, en este trabajo quisimos
9
10 identificar cual es el mejor método para estudiar una de las variables involucradas en la génesis de esta
11
12 enfermedad (erosiones superficiales de la cornea). A tal fin investigamos los efectos producidos por cuatro
13
14 tipos de láser con diferentes condiciones de potencia y tiempo en la córnea de cobayos normales a los fines
15
16 de seleccionar un láser y condición que lesione solamente el epitelio y estroma superficial, de manera
17
18 reversible sin dejar cicatrices. *Métodos:* Se indujeron daños en la córnea de cobayos utilizando distintas
19
20 potencias y tiempos con cuatro tipos de láser: Argón, CO₂, Diodo y ND-Yag en distintos grupos de animales
21
22 y se evaluaron dichas lesiones por biomicroscopía (BM) y microscopia óptica (MO). Córneas de otros
23
24 animales normales fueron expuestas a láser de Argón (350 mW, 0,3 segundos, 50 µm de diámetro) y las
25
26 alteraciones inducidas se estudiaron a diferentes tiempos utilizando BM, Tomografía de Coherencia Óptica
27
28 (TCO) y Microscopía Electrónica (ME).
29
30
31

32
33
34 *Resultados:* Solo el láser Argón a una potencia de 350 mW, 0,3 segundos, 50 µm de diámetro produjo
35
36 lesiones de epitelio y estroma superficial, manteniéndose indemne el endotelio. Por BM se observaron
37
38 algunos leucomas que desaparecieron hacia el día 15. Mediante TCO se observó un adelgazamiento del
39
40 espesor corneal en los ojos tratados con esas condiciones de láser Argón durante la primera semana.
41
42 Mediante ME, se observaron diferentes alteraciones ultra estructurales en epitelio y estroma corneal durante
43
44 los primeros días, las cuales desaparecieron hacia el día 15.
45
46
47
48

49 *Conclusiones:* Fue posible desarrollar lesiones corneales en epitelio y estroma anterior de cobayos de manera
50
51 reproducible mediante el uso de láser Argón. Los estudios in vivo e in vitro demostraron que las córneas
52
53 lesionadas con este láser y en esas condiciones no dejaron alteraciones microscópicas ni ultraestructurales
54
55 irreversibles. Este modo de erosión corneal combinado con exposición a radiación ultravioleta (RUV) y
56
57 déficit parcial de ascorbato (AA) en la dieta de los animales durante un período prolongado de tiempo está
58
59 siendo utilizado a los fines de intentar desarrollar un modelo experimental de QCE.
60
61
62
63
64
65

Palabras claves: Córnea, cobayos, láser, láser de argón, lesión, cicatrización.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

Introducción:

1
2 La córnea es un tejido avascular y transparente, formado por diversas estructuras: epitelio, membrana de
3
4 Bowman, estroma, capa de Dua, membrana de Descemet y endotelio (1). Una de las enfermedades
5
6 degenerativas de la córnea humana, caracterizada por un progresivo velamiento de la misma, es la
7
8 Queratopatía Climática Esferoidea (QCE) descrita por primera vez en el siglo XIX por Baquis (2). Muchos
9
10 años después se confirmaría que esta opacidad ocurre en la capa de Bowman y en el estroma superficial (3).
11
12 La QCE ha sido descrita en distintas partes del mundo, incluyendo Argentina (4), y ha recibido diferentes
13
14 denominaciones. La opacidad es producida por depósitos globulares proteicos descritos mediante
15
16 microscopía óptica, electrónica y confocal (5, 6). Muy pocas investigaciones se han llevado a cabo en el
17
18 siglo pasado para tratar de elucidar los mecanismos moleculares involucrados en la etiología y patogénesis
19
20 de esta enfermedad. En los últimos años solamente nuestro grupo de investigación y el grupo liderado por el
21
22 Dr. Fujii N. han aportado nuevos conocimientos sobre QCE (7). La historia de esta enfermedad cuyas causas
23
24 son multifactoriales, las características clínicas, el diagnóstico, el tratamiento y los últimos avances sobre
25
26 patogénesis han sido recientemente revisados por Serra H. y colaboradores (8). Hemos demostrado que en
27
28 pacientes con QCE se produce una reacción de hipersensibilidad en la córnea en donde inicialmente
29
30 participan componentes pro-inflamatorios muy importantes de la inmunidad (9). Debido a que la córnea de
31
32 estas personas están expuestas a un bombardeo de partículas transportadas por el viento durante todo el año,
33
34 y carecen de varios de los mecanismos protectores contra los efectos nocivos de la radiación ultravioleta
35
36 (RUV) (10) tales como disminución significativa de ácido ascórbico (AA) en plasma, trabajo a la intemperie
37
38 durante muchas horas al día en zonas desérticas o semi desérticas sin protección ocular como lentes de sol
39
40 y/o sombreros, se produciría la degradación de ciertas proteínas sensibles a los efectos directos e indirectos
41
42 de la RUV y la acumulación progresiva en las capas superficiales de la córnea (8). Una de las dificultades en
43
44 el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en esta enfermedad es la ausencia de un
45
46 modelo experimental, por tal motivo estamos investigando si animales expuestos a las mismas condiciones
47
48 ambientales desfavorables que los individuos que padecen QCE (lesiones reiteradas en la córnea, prolongada
49
50 exposición a RUV, y falta de adecuados mecanismos protectores a los efectos de la misma) desarrollan
51
52 anomalías corneales similares a estos pacientes. El animal apropiado para intentar reproducir esta
53
54 enfermedad humana a nivel experimental es el cobayo ya que al igual que los humanos han perdido su
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

capacidad para sintetizar AA (importante protector contra la RUV) debido a la ausencia de la enzima L-gulono- γ -lactono oxidasa (10), y además poseen una cornea estructuralmente similar a la humana (11). Entre las variables a investigar para intentar desarrollar un modelo experimental de QCE están las erosiones corneales, exposición a altas dosis de RUV, y falla en los mecanismos protectores contra dicha radiación. En uno de nuestros trabajos previos hemos demostrado que cobayos con deficiencia de AA y expuestos a RUV por un período corto de tiempo (4 meses) presentan alteraciones ultra estructurales en el estroma corneal.

Debido a que otra de las variables a estudiar en estos animales son los efectos producidos en la córnea por lesiones superficiales reiteradas durante un prolongado período de tiempo (años), es que realizamos este trabajo de investigación para estudiar qué tipo de láser y que configuración del mismo es capaz de provocar lesiones superficiales que puedan ser realizadas de manera reproducible sin dejar cicatrices en la cornea. De esta manera podríamos utilizar este láser para producir erosiones corneales repetidamente en cobayos y estudiar las tres variables simultáneamente (erosiones recurrentes, exposición a RUV y dieta deficiente en AA) durante un período prolongado de tiempo, a los fines de intentar desarrollar un modelo experimental de QCE.

Materiales y métodos.

Animales: Cobayos hembras cepa Ssi:Al, provenientes del Bioterio del Instituto Biológico Argentino S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina, de entre 3 y 5 meses de edad fueron utilizados. Los animales fueron mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y se los distribuyó en grupos de a dos en jaulas de acero inoxidable con el piso cubierto de aserrín. Fueron alimentados ad libitum con alimento para Conejos (Conejo Casero, Cargill, Pilar Córdoba, Argentina) y el AA fue suplementado en el agua. La temperatura de la habitación fue mantenida a 22°C y se programaron ciclos de luz (36W tubos fluorescentes) de 12hrs (12hrs luz/12hrs oscuridad). El protocolo de experimentación fue aprobado por la comisión de evaluación de protocolos de la Facultad de Ciencias Químicas, de acuerdo a lo establecido en los estatutos de Uso de Animales Para la Investigación en Visión y Oftalmología de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO).

Tipos de laser: Se utilizaron 4 tipos de láser: Argón (Novus 2000, Coherent, USA), Diodo (Microlase SL, Keeler, UK), Nd-Yag (Coherent 7970 Yag Laser, Coherent, USA) y CO₂ (Smartoffice+, Deka, Italy). Se utilizaron equipos de uso oftalmológico para los láseres de Argón, diodo y Nd-YAG, siendo el CO₂ de uso ginecológico. El láser de Argón es un láser de gas, que emite en una longitud de onda de 512 nanómetros (nm) y es de baja potencia. El láser de Dióxido de carbono (CO₂) es un laser de gas, infrarrojo, que emite en una banda de longitud de onda entre 9,4 y 10,6 micras. La potencia que suministra puede ir desde milivatios a kilovatios. El láser de Diodo emite en una longitud de onda de 800 nm, emplea un diodo semiconductor, y es de baja potencia. El láser de Neodimio-YAG (Nd-YAG), también es infrarrojo, de no contacto, emite a una longitud de onda de 1064 nm y permite modificar diferentes variables en cada disparo.

Modelos experimentales: Modelo I: Cuatro grupos experimentales de cobayos (n=4) fueron tratados con los siguientes láser con distintas potencias y tiempos de exposición. (Grupo 1: Láser Argón, Grupo 2: Láser Dióxido de Carbono, Grupo 3: Láser Diodo y Grupo 4: Láser Nd-Yag) (Tablas 1 a 4). Un grupo control de 4 animales no fue tratado con láser. Los animales fueron anestesiados con ketamina 5mg/kg (im), asociado a proparacaína (Anestalcon®, Laboratorios Alcon, Buenos Aires, Argentina) y se le instiló fluoresceína tópica (Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina) previa a la realización de 15 disparos láser en la zona central de la córnea con foco en el epitelio.

Estudios in vivo e in vitro:

Biomicroscopía: una lámpara de hendidura portátil (XL-1, ShinNipon, Ohira Co., Niigata, Japan) con magnificación de 10X fue utilizada para evaluar la córnea y erosiones luego de efectuados los disparos con los láser. Fotografías fueron obtenidas con una cámara digital (Kodak, Rochester, New York).

Microscopía óptica: Alrededor de los 30 minutos posteriores al daño inducido por los láser se procedió a sacrificar a los animales mediante una sobredosis de ketamina 15mg/kg, con el fin de obtener corneas para estudios histológicos. Las corneas fueron fijadas en formaldehído al 10% v/v en PBS por 24 horas, deshidratadas y embebidas en tacos de parafina. Se obtuvieron cortes de 6 µm y se montaron en vidrios, dejándose secar toda la noche a 37°C y luego se tiñeron con Hematoxilina Eosina (HE).

Modelo II: Debido a que solamente el láser Argón en su configuración de 350 mW, 0,3 segundos de exposición y 50 μm de diámetro no dañó el estroma medio y profundo ni el endotelio corneal (crucial estructura para el mantenimiento de la integridad de este órgano), decidimos continuar con el estudio empleando sólo ese láser y esas condiciones en cobayos normales (n=10). El ojo izquierdo de cada animal recibió 15 disparos focalizados en la córnea; mientras que ojo derecho no fue tratado (Controles). Los diferentes estudios in vivo e in vitro se realizaron a los tiempos indicados en siguiente esquema.



Estudios in vivo e in vitro:

Biomicroscopía: Realizada como se describió anteriormente. *Tomografía de Coherencia Óptica:* Además se realizaron estudios de la córnea con un OCT VISANTE (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), previo uso de anestesia (ketamina 5mg/kg (i m), asociado a proparacaína (Anestalcon®, Laboratorios Alcon) como anestesia tópica.

Para las evaluaciones histológica y ultra estructurales de las córneas, los animales fueron sacrificados a los diferentes tiempos como se indica en el esquema presentado anteriormente.

Microscopía Óptica: Las corneas fueron extraídas y procesadas como se describió anteriormente.

Microscopía Electrónica: Las córneas fueron fijadas por inmersión en el fijador de Karnovsky conteniendo glutaraldehído 1,5% v/v y paraformaldehído 4% w/v en solución cacodilato 0,1 M; luego fueron post fijadas en tetróxido de osmio 1%, deshidratadas y embebidas en Araldita. Las muestras fueron cortadas utilizando un ultra-micrótopo con cuchillas de diamante JEOL JUM-7 y montadas en grillas de níquel. Luego fueron contra-teñidas con acetato de uranilo y citrato; estas secciones fueron examinadas utilizando el microscopio electrónico Zeiss LEO 906E (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Estadística: Los resultados fueron comparados utilizando el test de Student, considerando diferencia significativa un valor de $p < 0,05$.

Resultados

Modelo experimental I: Las tablas 1, 2, 3 y 4 resumen los resultados de los daños tisulares observados mediante MO de las corneas de los cobayos tratados con los cuatro tipos de láser. Todas las condiciones ensayadas mostraron alteraciones en epitelio, estroma y endotelio excepto cuando los animales fueron tratados con el láser de Argón a 350 mW, 0,3 segundos y 50 μm de diámetro en donde solamente se observaron alteraciones en el epitelio y estroma superficial. Los estudios de BM indicaron que no hubo perforación de la córnea en ninguno de los animales correspondientes a los cuatro grupos experimentales. En la figura 1 se observan imágenes de BM y MO de casos representativos de corneas no expuestas al láser Argón (córnea control), y de corneas expuestas al láser Argón a 350 mW o 650 mW por 0,3 segundos y 50 μm de diámetro.

Modelo experimental II: En esta etapa se decidió utilizar solamente el láser de Argón a 350 mW, con 0,3 segundos, y 50 μm de diámetro para investigar el proceso de recuperación de las corneas de los cobayos a diferentes tiempos utilizando estudios *in vivo e in vitro*. En los estudios de BM se observó la presencia de leucomas a 1 hora, 18 horas y 7 días cuando fue utilizado este tipo de láser a 350 mW por 0,3 segundos y 50 μm de diámetro, mientras que los leucomas aún se observaron hasta el día 15 cuando se utilizó el láser de Argón a 650 mW por 0,3 segundos en otro grupo experimental (Tabla 5).

Mediante TCO se observó un adelgazamiento del espesor corneal (aunque no fue estadísticamente significativo) en los ojos de animales tratados con el láser de Argón a 350 mW, por 0,3 segundos, y 50 μm de diámetro, con respecto a los no tratados (controles) a las 18 horas post exposición. El espesor de la corneas se recuperó casi completamente al final de la primera semana (figura 2). Imágenes representativas de los estudios de ME en los distintos grupos experimentales se observan en la figura 3. Las corneas del grupo control mostraron un epitelio estratificado no queratinizado típico, el estroma presentó la matriz extracelular y fibras de colágeno regularmente ordenadas con algunos queratocitos con características de fibroblastos distribuidos en el mismo. A la hora, las corneas del grupo tratado con láser Argón si bien exhibieron un epitelio seriamente alterado con numerosas células picnóticas, el estroma se mantuvo aun

conservado, sin cambios en el arreglo de las fibras de colágeno. A las 18 hs, no se observan grandes cambios con respecto a la primera hora post-tratamiento (imágenes no mostradas). Luego de una semana, el epitelio corneal todavía presenta algunas células picnóticas, mientras que en el estroma se observan miofibroblastos rodeados de una matriz extracelular bastante desorganizada. En el día 15 post-tratamiento, el epitelio se observa ya recuperado, los queratocitos son de aspecto normal, y las fibras de colágeno se encuentran más organizadas.

La aplicación de láser de Argón a un grupo de 6 animales (350 mW, 0,3 segundos, y 50 μ m de diámetro) una vez al mes durante 6 meses produjo las mismas alteraciones corneales, una recuperación de las lesiones en igual número de días y ausencia de cicatrices (datos no mostrados).

Discusión

El objetivo de este trabajo de investigación no consistió en estudiar mecanismos moleculares involucrados en la recuperación de la córnea luego de la realización de injurias producidas por diferentes tipos de láser, sino más bien determinar que láser, que potencia y cuánto tiempo es necesario para provocar erosiones reproducibles que afecten la córnea desde el epitelio hasta el estroma superficial a los fines de utilizar este método de erosiones como una variable para intentar desarrollar un modelo experimental de QCE. Los estudios sobre cicatrización de heridas provocadas en la córnea tienen una larga historia ya que comenzaron hace aproximadamente siete décadas. Desde que Friedenwald y Buschke en el año 1944 publicaron uno de los primeros trabajos acerca de recuperación del epitelio corneal luego de erosiones inducidas mediante el uso de agujas en cornea de rata (13), muchos otros estudios han sido realizados describiendo distintos tipos de erosiones (químicas o mecánicas) y como se produce la recuperación de la córnea. La respuesta de cicatrización corneal es una compleja interacción entre células estromales, epiteliales e inmunes, en la cual participan activamente citocinas, factores de crecimiento y sus receptores (14-15). Para estudiar las variaciones en la respuesta de la córnea a los distintos tipos de erosiones e investigar mecanismos celulares de migración, proliferación, y diferenciación, como también mecanismo de barrera, cicatrización, e inflamación, entre otros; es que se han empleado diversos instrumentos para generar lesiones. Entre los instrumentos más usados para producir lesiones corneales se encuentran el dulled-blade (hoja desafilada) (16), empleada para generar lesiones que no remueven la membrana basal y el

1 rotating burr (fresa) que es capaz de remover completamente la membrana basal (17-19). El excimer láser ha
2 sido otra opción para estudiar cicatrización corneal, ya que la recuperación implica re-epitelización,
3 ensamblaje de la membrana basal, re-inervación y cicatrización (20,21).
4
5

6 Las ventajas de utilizar los distintos tipos de lesiones, así como los conocimientos obtenidos del empleo de
7 cada uno de ellos sobre los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de cicatrización han sido
8 recientemente publicados en una excelente revisión de la Dra. Mary Ann Stepp y colaboradores (22). La
9 elección del animal adecuado para estos estudios de lesión y recuperación corneal no es menos importante
10 que la selección del instrumento a utilizar. La preferencia de un animal sobre otro dependerá del objetivo del
11 estudio. Se han empleado desde vertebrados inferiores (23,24), hasta especies animales como pollos, ratas,
12 conejos, gatos, perros y ratones (22).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Hasta lo que nosotros conocemos cobayos no han sido utilizados para realizar estudios comparativos
24 de los efectos de distintos tipos de láser sobre la córnea de estos animales. En esta investigación aplicamos
25 sobre el epitelio corneal de cobayos diferentes tipos de láser (CO₂, ND-Yag, Argón, y Diodo)
26 frecuentemente utilizados en medicina, a los fines de investigar las erosiones corneales producidas cuando
27 son aplicados con diferentes potencias y tiempos. Nuestro objetivo final era encontrar que láser y que
28 condiciones de aplicación dañaban solamente la córnea desde el epitelio hasta la porción anterior del
29 estroma. Debido a que el láser de Argón a 350 mW, por 0,3 segundos, y 50 μm de diámetro, lesionó
30 solamente la porción anterior de la córnea, continuamos los estudios con este láser y esas condiciones.
31 Utilizando técnicas in vivo e in vitro estudiamos las lesiones inducidas, el proceso de recuperación de la
32 córnea y la existencia de cicatrices. Diferentes estudios han sido realizados en oftalmología para investigar
33 las aplicaciones y ventajas de estos 4 tipos de láser. Aplicaciones del láser de CO₂ en córnea humana, bovina,
34 porcina, y de conejo han demostrado cambios en el epitelio y en el estroma cuando las corneas se
35 examinaron por MO. (25-29). De acuerdo a los estudios realizados por Gilmour M.A (30) el láser de CO₂
36 debe ser usado con mucha precaución en el tejido corneal porque puede provocar daños en todas las
37 estructuras corneales e incluso perforar este tejido. Si bien la aplicación de este láser no perforó la córnea de
38 cobayos en nuestro estudio, indujo importantes daños en todas las estructuras de este tejido. El láser de Nd-
39 YAG se utiliza para resolver la opacificación de la cápsula posterior, que puede ocurrir luego de la
40 facoemulsificación, mediante una capsulotomía posterior (31). El láser de Argón además se emplearse
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

frecuentemente en fototerapia de retina, ha sido utilizado con otras finalidades en oftalmología. Vieira y colaboradores (32) emplearon este láser, con foco intraestromal, para retirar suturas de la córnea, con una potencia de 340 mW, 0,1 segundo, y diámetro de 5 a 100 micras, sin observar úlceras o infecciones. Kremery colaboradores (33) encontraron que el láser argón a potencias y tiempos variados, induce en córneas de cobayos teñidas con rosa de bengala como foto sensibilizador desde un mínimo daño hasta importante disrupción lamelar. Resultados similares fueron observados en nuestro estudio utilizando este láser sobre corneas de cobayos teñidas con fluoresceína.

El Laser de Diodo se utiliza entre otras cosas, para tratamiento de retinopatía del prematuro y glaucoma. Chew et al. (34) utilizando láser de argón y diodo compararon la transmisibilidad de corneas humanas, y efectos fototérmicos sobre córnea e iris. Utilizaron córneas claras, intermedias y opacas e hicieron foco en estroma medio. La energía empleada con láser argón de 488 nm y diodo de 810 nm, fue de 1000 mW durante 0,1 segundo y de 980 mW durante 0,1 segundo, respectivamente. El láser diodo no produjo daño térmico en la córnea y la transmisibilidad fue del 89, 87 y 85% en los 3 tipos de córnea usados. Las diferencias observadas con nuestro modelo experimental pueden deberse a la utilización de distintos tipos de córneas y de configuración del láser diodo. Con el láser de argón, Chew et al. observaron una transmisibilidad de 78, 73 y 70% y daño en las corneas opacas. Estos autores concluyeron que el diodo laser podría ser el ideal para la iridotomía / iridioplastia en glaucoma de ángulo cerrado agudo con cornea opaca. Para tener un conocimiento más profundo sobre el uso de láser en oftalmología veterinaria, Spiess BM publicó en el año 2012 una revisión basada en recomendaciones de la literatura sobre este tema (35).

Podemos concluir que nuestro trabajo de investigación permitió determinar mediante la realización de estudios microscópicos y ultra estructurales, con qué tipo de láser y bajo que configuración es posible desarrollar lesiones en corneas de cobayos reproducibles y controladas, en epitelio y estroma anterior sin dejar cicatrices. Por tal motivo ya hemos comenzado a utilizar aplicaciones sobre la córnea de cobayos de láser argón a una configuración de 350 mW con 0,3 seg. y un diámetro de 50 μ m, combinadas con exposición a RUV y déficit de AA por períodos prolongados de tiempo (años) a los fines de intentar obtener un modelo experimental de QCE.

1
2 **Referencias:**
3
4

- 5
6 1. Dua H, FarajL,Said D, Gray T, Lowe J . Human Corneal Anatomy Redefined: a Novel Pre-
7 Descemet's Layer (Dua's Layer) Ophthalmology. 2013; 120: 1778-85.
8
9
10 2. Baquis E. Die colloïde: Degeneration der Cornea. Ein Beitrag zur Kenntniss der Entstehung
11 des Colloïds aus epithelial en Elementen. Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.
12 1898; 46: 553-620.
13
14
15 3. Forsius H. Climatic changes in the eyes of Eskimos, Lapps and Cheremisses. ActaOphthalmol
16 1972; 50:532-538.
17
18
19 4. Urrets-Zavalía JA, Knoll EG, Maccio JP, Urrets-Zavalía EA, Saad JA, Serra HM. Climatic
20 Droplet KeratopathyIn The Argentine Patagonia. Am J Ophthalmol. 2006; 141:744-746.
21
22
23 5. Johnson GJ, Overall M. Histology of spheroidal degeneration of the cornea in Labrador. Br J
24 Ophthalmol. 1978; 62:53-61.
25
26
27 6. Urrets-Zavalía JA, Croxatto JO, Holopainen JM, Cafaro TA, Esposito F, Neira W, et al. In vivo
28 confocal microscopy study of climatic droplet keratopathy. Eye . 2012; 26:1021-1023.
29
30
31 7. Kaji Y, Nagai R, Amano S, Takazawa Y, Fukayama M, Oshika T. Advanced glycation end
32 product deposits in climatic droplet keratopathy. Br J Ophthalmol. 2007; 91:85-88.
33
34
35 8. Serra, HM, Holopainen JM, Beuerman R, Kaarniranta K, Suárez MF, Urrets-Zavalía Julio A.
36 Climatic Droplet Keratopathy: An Old Disease In New Clothes. En prensa ACTA, 2014.
37
38
39 9. Holopainen JM, Robciuc A, Cafaro TA, Suarez MF, Konttinen YT, Alkatan HM, et al . Pro
40 Inflammatory Cytokines and Gelatinases in Climatic Droplet Keratopathy. Invest Ophthalmol
41 Vis Sci. 2012; 53: 3527-3535.
42
43
44 10. Serra HM, Suárez MF, Espósito E, Urrets-Zavalía JA. Vitamin C Functions in the Cornea:
45 Ultra-Structural Features in Ascorbate Deficiency.In: The Handbook of Nutrition, Diet and the
46 Eye. Edited by Victor R. Preedy. King's College London, Academic Press is an imprint of
47 Elsevier, United States. 2014; p: 311-320.
48
49
50 11. Cafaro TA, Ortiz SG, Maldonado C, Espósito FA, Croxatto JO, Berra A, et al. The cornea of
51 Guinea pig: structural and functional studies. Veterinary Ophthalmology. 2009; 12: 234–241.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

12. Hayes S, Cafaro TA, Boguslawska PJ, Kamma-Lorger CS, Boote C, Harris J, et al. The effect of vitamin C deficiency and chronic ultraviolet-B exposure on corneal ultrastructure: a preliminary investigation. *Mol Vis*. 2011; 17: 3107-3115.
13. Friedenwald JS, Buschke W. Some factors concerned in the mitotic and wound-healing activities of the corneal epithelium. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1944; 42: 371-383.
14. Netto MV, Mohan RR, Ambrosio Jr R, Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea*. 2005; 24: 509-522.
15. Dupps WJ Jr, Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res*. 2006; 83: 709-720.
16. Pal-Ghosh S, Blanco T, Tadvalkar G, Pajooresh-Ganji A, Parthasarathy A, Zieske JD, et al. MMP9 cleavage of the beta4 integrin ectodomain leads to recurrent epithelial erosions in mice. *J Cell Sci*. 2011; 124: 2666-2675.
17. Pal-Ghosh S, Pajooresh-Ganji A, Tadvalkar G, Stepp MA. Removal of the basement membrane enhances corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2011; 93: 927-936.
18. Terai K, Call MK, Liu H, Saika S, Liu CY, Hayash Y, et al. Crosstalk between TGF-beta and MAPK signaling during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011; 52: 8208-8215.
19. Boote C, Du Y, Morgan S, Harris J, Kamma-Lorger CS, Hayes S, et al. Quantitative assessment of ultrastructure and light scatter in mouse corneal debridement wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53:2786-2795.
20. Azar DT, Pluznik D, Jain S, Khoury JM. Gelatinase B and A expression after laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol*. 1998; 116: 1206-1208.
21. Kato T, Chang JH, Azar DT. Expression of type XVIII collagen during healing of corneal incisions and keratectomy wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 78-85.
22. Stepp MA, Zieske JD, Trinkaus-Randall V, Kyne BM, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, et al. Wounding the cornea to learn how it heals. *Exp Eye Res*. 2014; 121: 178-193.

23. Hu W, Haamedi N, Lee J, Kinoshita T, Ohnuma SI. The structure and development of
Xenopus laevis cornea. *Exp Eye Res.* 2013; 116: 109-128
24. Zhao XC, Yee RW, Norcom E, Burgess H, Avanesov AS, Barrish JP, Malicki J. The zebrafish
cornea: structure and development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 4341-4348.
25. McCally RL, Barger CB, Green WR, Farrel RA. Stromal damage in rabbit corneas exposed
to CO2 laser irradiation. *Exp Eye Res.* 1983; 37: 543-550.
26. Krauss JM, Puliafito CA, Steinert RF. Laser interactions with the cornea. *Surv Ophthalmol.*
1986; 31: 37-53.
27. Keates RH, Pedrotti LS, Weichel H. Carbon dioxide laser beam control for corneal surgery.
Ophthalmic Surgery. 1981; 12: 117-122.
28. Chandonnet AB. Preliminary study of CO2 laser annular thermokeratoplasty. *Lasers in
Medicine and Surgery.* 1992; 12: 266-273.
29. Widder RA, Severin M, Kirchoff B. Corneal injury after carbon dioxide laser skin resurfacing.
Am J Ophthalmol. 1990; 125: 392-394.
30. Gilmour MA. Lasers in Ophthalmology. *Vet Clin North Am Small Pract.* 2002; 32(3):649-
672.
31. Gilmour MA. Laser Applications for corneal disease. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2003;
18(3): 199-202.
32. Vieira E, Watzl V, Azevedo M, Souza WF, Dos Santos R X, Ruiz SA. Utilização do laser de
argônio para remoção de sutura corneana. *Arq Bras Oftalmol.* 2004; 67(6):901-904.
33. Kremer L, Even A, Sadbank J, Giler S, Yassur Y. Effect of green argon (514 nm) laser
exposure on rose Bengal-stained guinea pig cornea. *Isr J Med Sci.* 1996; 32(12):1243-1248.
34. Chew PTK, Wong JS, Chee CKL, Tock EPC. Corneal transmissibility of diode versus argon
lasers and their photothermal effects on the cornea and iris. *Clinical and experimental
Ophthalmology.* 2000; 28: 53-57.
35. Spiess BM. The use of lasers in veterinary ophthalmology: Recommendations based on
literature. *Photon Lasers Med.* 2012; 1: 95-102.

Leyendas de figuras

1 **Figura 1:** Imágenes representativas de BM con tinción de fluoresceína (izquierda), y de MO con tinción de
2 (HE) (derecha) de córneas de cobayos. Córnea control (A). Córnea tratada con láser Argón a 350 mW, 0,3
3 segundos de exposición y 50 μ m de diámetro (B). Córnea tratada con láser Argón a 650mW, 0,3segundos de
4 exposición y 50 μ m de diámetro (C). En los cortes histológicos las flechas indican la profundidad del daño
5 inducido por el láser. BM: 10X. MO: 40X.
6
7
8
9
10
11

12 **Figura 2:** Imágenes representativas de córneas de cobayos (OCT Visante). Control (A); 1 hora post-
13 tratamiento con láser Argón a 350mW, 0,3segundos de exposición y 50 μ m de diámetro (B); 18 horas post-
14 tratamiento (C); 7 días post-tratamiento (D). Variaciones en el espesor corneal (media \pm ES) a los diferentes
15 tiempos post tratamiento con láser (E).
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Figura 3:** Imágenes representativas de ME. Control(A): epitelio estratificado y estroma típico. 1 hora post-
25 tratamiento con láser argón a 350mW, 0,3segundos y 50 μ m de diámetro (B): En el epitelio se observan
26 varias células picnóticas, pero el estroma está aún conservado. 7 días post-tratamiento (C): El epitelio
27 muestra algunas células picnóticas, pero se observa una importante recuperación. En el estroma se observan
28 miofibroblastos y una matriz extracelular bastante desorganizada. 15 días post-tratamiento (D): El epitelio y
29 estroma se muestran casi totalmente recuperados. Epitelio (Ep), estroma (Es). Magnificación: (A) 3000X, (B
30 superior) 3000X y (B inferior) 6000X; (C superior) 3000X y (C inferior) 4600X; (D superior) 4000X y (D
31 inferior) 6000X.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figura 1
[Click here to download high resolution image](#)

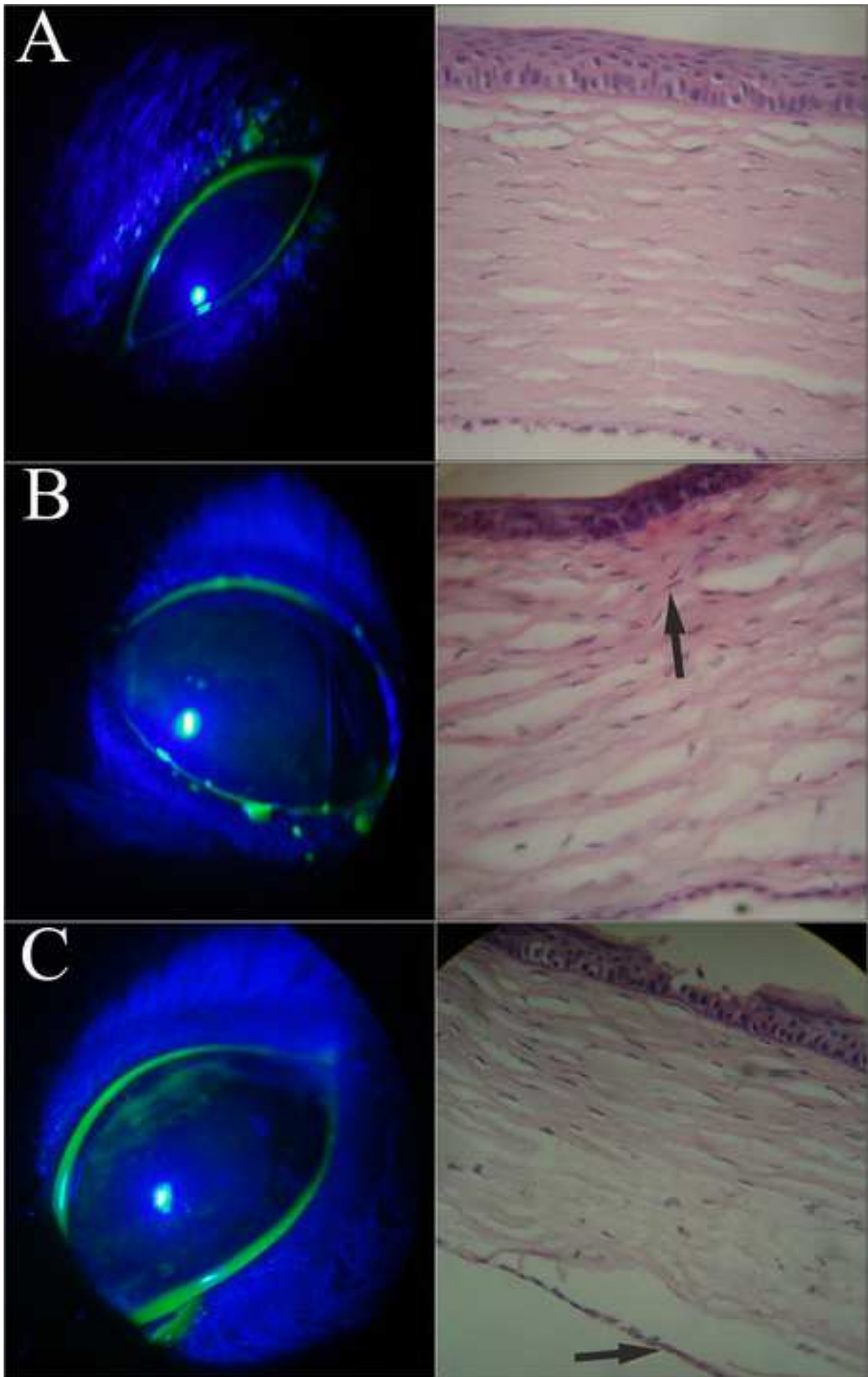


Figura 2
[Click here to download high resolution image](#)

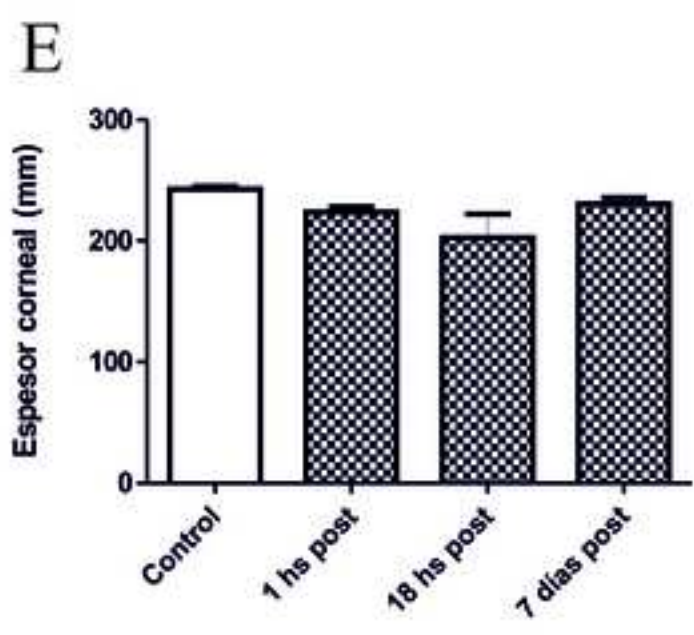
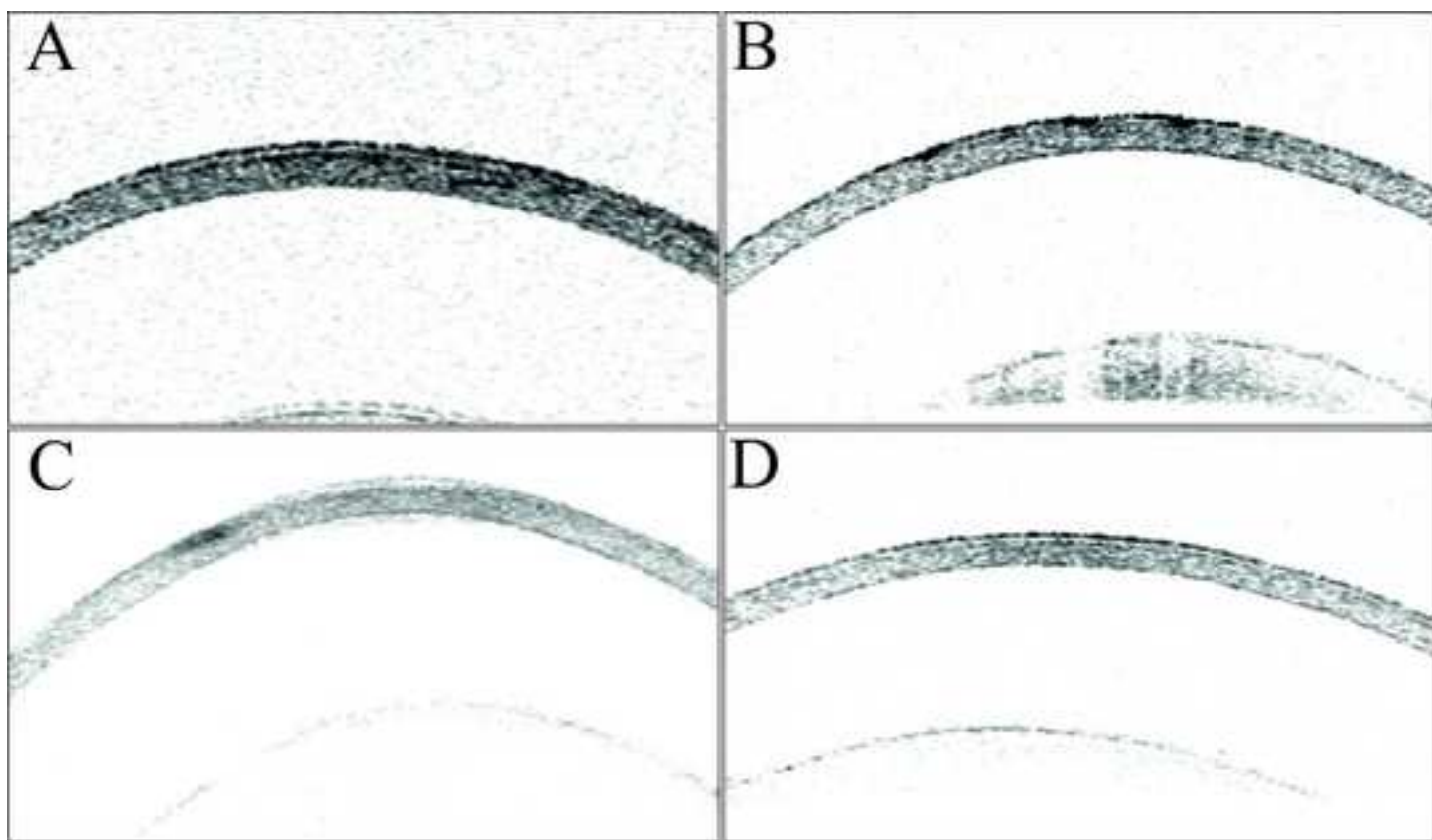


Figura 3
[Click here to download high resolution image](#)

