

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Óptica con orientación en Optoelectrónica**

**Estudio de la presión intraocular en ojos *ex-vivo* mediante la
técnica de cavitación láser**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Carlos Andrés Zúñiga Romero

Ensenada, Baja California, México

2016

Tesis defendida por

Carlos Andrés Zúñiga Romero

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Santiago Camacho López
Director del Comité

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

Dr. Rodger Terence Evans

Dr. Israel Rocha Mendoza

Dra. Carolina Álvarez Delgado



Dr. Pedro Negrete Regagnon

Coordinador del Programa de Posgrado en Óptica

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Carlos Andrés Zúñiga Romero © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor

Resumen de la tesis que presenta Carlos Andrés Zúñiga Romero como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Óptica con orientación en Optoelectrónica.

Estudio de la presión intraocular en ojos *ex-vivo* mediante la técnica de cavitación láser

Resumen aprobado por:

Dr. Santiago Camacho López
Director de tesis

En este trabajo de tesis se presenta un estudio experimental sobre la implementación del modelo de presión intraocular (PIO) basado en el fenómeno de cavitación inducida por láser en ojos de cerdo *ex-vivo*, el cual forma parte y da continuidad a una serie de trabajos de investigación cuyo objetivo es el de poder determinar variaciones de presión establecidas dentro del rango clínico. Se realizó la adaptación de la técnica de modulación de la transmitancia espacial (STM, *por sus siglas en inglés*) dentro de la cámara anterior (CA) de los ojos de cerdo. Se utilizó un sistema de bombeo y de prueba; compuesto por un haz láser pulsado Nd:YAG (532 nm, 9 ns) y un haz láser de onda continua He-Ne (633 nm), respectivamente. Los resultados que aquí se basan en el análisis del primer tiempo de colapso, de las burbujas de cavitación en función de la energía por pulso del haz de bombeo y de la presión externa ejercida, definida como la PIO inducida por perfusión en los ojos de cerdo *ex-vivo*. Se presentan resultados de pruebas histológicas del fotodaño generado en la córnea tras variar el número de pulsos (1, 20, 200 y 2000) para la generación de cavitación en la CA. Los resultados experimentales demostraron una tendencia lineal creciente del tiempo de colapso de la burbuja de cavitación al aumentar la energía del pulso de bombeo (E_p : 3.3 a 5.5 mJ), o decreciente al aumentar la presión externa (E_p : 13 y 16 mJ, 10 - 60 mmHg) dentro del rango clínico establecido para la PIO. Del análisis histológico de la córnea se observó daño de aproximadamente 100 μm en la superficie del estroma pudiéndose disminuir o eliminar el daño generado si se reduce la energía del pulso de bombeo al nivel del umbral de detección del primer tiempo de colapso. Se encontró que ocurre la formación de enlaces del tipo cross-linker entre moléculas de glutatión en el HA tras ser irradiado por el haz de bombeo por más de 1 hora y 30 minutos.

Palabras Clave: Cavitación láser, tiempo de colapso, modulación de la transmitancia espacial, presión intraocular, glaucoma

Abstract of the thesis presented by Carlos Andrés Zúñiga Romero as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Optic with orientation in Optoelectronic.

Intraocular pressure study in *ex-vivo* eyes by laser cavitation technique

Abstract approved by:

Dr. Santiago Camacho López
Thesis Director

In this thesis, we present an experimental study of the implementation of a model for intraocular pressure (IOP) measurements based on the laser-induced cavitation phenomenon in *ex-vivo* pig eyes. This thesis work follows a series of previous research aiming to determining the IOP within the clinical range. We used a pump-probe laser system composed by a pulsed laser beam (Nd:YAG, $\tau_p = 9\text{ns}$, 532 nm) and a continuous wave laser beam (He-Ne, 633 nm) conveniently adapted to comprise with the technique known as spatial transmittance modulation (STM) within the anterior chamber (AC) of pig eyes. The results presented here are based on the analysis of the first collapse time of the generated cavitation bubble, and its relationship with the pump pulse energy and the induced IOP, defined as the induced IOP by perfusion in the *ex-vivo* pig eyes. Also, multipulse photodamage on the cornea by a histological analysis with haematoxylin and eosin. The experimental results showed an increasing linear trend of the collapse time with the pump pulse energy (E_p : 3.3 - 5.5 mJ) and a decreasing linear trend by increasing the external pressure (E_p : 13 and 16 mJ, 10 - 60 mmHg) within the clinical range. Histological analysis showed damage (100 μm) on the surface of the stroma when applying one pump pulse ($E_p = 13$ mJ), which could be reduced or suppressed if we used a pump energy per pulse ($E_p \approx 11$ mJ), the detection threshold of the first collapse time within the AC. We found the formation of cross-linker links between glutathione molecules in the AH for long pump pulse exposures of at least 1 hour and 30 minutes.

Keywords: Laser cavitation, collapse time, modulation of spacial transmittance, intraocular pressure, glaucoma

Dedicatoria

A ...

Agradecimientos

- Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de maestría y de estancia de investigación en el extranjero.
- A mi director de tesis Dr. Santiago Camacho López por brindarme siempre su apoyo, conocimiento y confianza a lo largo de mi trabajo de tesis, además, de tener siempre la mejor disposición y por ser también un compañero fuera de las horas de trabajo.
- Al comité de tesis, de quienes siempre recibí su apoyo y conocimiento para mejorar y aprender en ésta etapa de la maestría.
- Al Dr. Javier Rodríguez Vázquez de Aldana y el grupo de Óptica de la USAL, España, por aceptarme en su grupo para la realización de mi estancia de investigación y por brindarme todo el apoyo y facilidades antes, durante y después de mi estancia.
- A los próximos Dres. Gabriel y René I. Rodríguez por el apoyo durante mi estancia en la USAL.
- Al Dr. Marcos Plata, técnico del laboratorio, quien siempre me apoyo y estuvo al pendiente de mi trabajo en el laboratorio.
- A los M.C. Leopoldo M. y Yazmín, quienes me hicieron más fácil la adaptación y el inicio de mi proyecto en el laboratorio, además, siempre me sacaron de muchas dudas y me apoyaron en cuestiones técnicas.
- Al Rastro Municipal de Ensenada, B.C. por brindarme los ojos de cerdo *ex-vivo* para la realización de mi trabajo de tesis.
- Al Laboratorio de Patología y Análisis Clínicos de Ensenada, en especial al Dr. Nomura, Dr. Rodolfo Díaz Argüero y la Biol. Alba Chavarría González, por ofrecernos su apoyo para la pruebas histológicas de las córneas.
- Al Dr. Heriberto Márquez y el técnico Dr. Javier Camacho G., por su ayuda y orientación para las simulaciones realizadas y la utilización del espectrómetro, respectivamente.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xii
1. Introducción	1
1.1. Motivación	2
1.2. Justificación	5
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2. Objetivos Particulares	5
1.4. Organización de la tesis	6
2. Marco Teórico	8
2.1. Presión intraocular y el glaucoma	8
2.2. Anatomía del ojo humano: cámara anterior	11
2.2.1. Globo ocular: humano vs cerdo	14
2.3. Interacción láser-tejido	15
2.4. Cavitación inducida por láser	20
2.4.1. Rompimiento dieléctrico óptico en líquidos	22
2.4.1.1. Ionización multifotón	23
2.4.1.2. Ionización en cascada	23
2.4.2. Burbujas de cavitación y partición de la energía	25
2.4.2.1. Partición de la energía	28
3. Metodología	31
3.1. Descripción de las técnicas para la caracterización de la cavitación láser: importancia de la técnica STM	31
3.2. Inducción de la cavitación láser en cubetas con HA	34
3.2.1. Procedimiento	36
3.3. Inducción de la cavitación láser en ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	38
3.3.1. Procedimiento	41
3.3.1.1. Obtención de la curva presión vs tiempo de colapso	41
3.3.1.2. Variabilidad del tiempo de colapso en función de la presión y energía de bombeo	42
3.4. Colección y manipulación de ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	43
3.4.1. Extracción del HA	44
3.4.2. Manipulación de ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	45
3.5. Fotodaño en córneas de ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	46
4. Análisis y discusión de resultados	48
4.1. Caracterización de los haces de bombeo y prueba	48

Tabla de contenido (continuación)

4.1.1.	Propagación del haz de prueba	50
4.1.2.	Propagación del haz de bombeo	53
4.2.	Caracterización óptica del medio	55
4.3.	Técnica STM: aplicación en cubetas de cuarzo o plástico con HA . . .	63
4.4.	Técnica STM: aplicación en ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	71
4.4.0.1.	Presión vs tiempo de colapso, en ojo de cerdo <i>ex-vivo</i> . . .	71
4.4.0.2.	Variabilidad del tiempo de colapso en función de la presión y energía de bombeo	75
4.5.	Análisis del fotodaño en córneas de cerdo <i>ex-vivo</i>	78
5.	Conclusiones	87
5.1.	Caracterización de los haces de bombeo y prueba	87
5.2.	Caracterización óptica del medio	87
5.3.	Técnica STM: aplicación en cubetas de cuarzo o plástico con HA . . .	88
5.4.	Técnica STM: aplicación en ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	88
5.5.	Análisis del fotodaño en córneas de cerdo <i>ex-vivo</i>	90
5.6.	Trabajo a futuro	91
	Literatura citada	94

Lista de figuras

Figura	Página	
1.	Drenaje del humor acuoso en un ojo con glaucoma de ángulo abierto (a) y cerrado (b). En (a) se presenta una obstrucción funcional de los canales de drenaje (canal de Schlemm) y en (b) ocurre una obstrucción anatómica entre el iris y la córnea. Imagen tomada de (Foundation, 2016).	4
2.	Diagrama de herramientas de diagnóstico para el glaucoma según el parámetro a medir.	10
3.	Anatomía de globo ocular humano.	12
4.	Estratificación de la córnea. Imagen tomada de (García, 2016).	13
5.	Tomografía de Coherencia Óptica de la CA de un ojo (A) humano y (B) porcino (Bajraszewski et al., 2008; Leung, 2011). La escala en (B) corresponde a 5 milímetros.	14
6.	Mapa de interacción láser-tejido. Los círculos dan una estimación general de los parámetros del láser asociado (Markolf H. Niemz, 2007), mientras que el círculo coloreado indica la densidad de potencia utilizada para los experimentos de cavitación dentro de la CA de los ojos de cerdo que conforman el presente trabajo.	16
7.	Diagrama de fase del agua. La termocavitación es el cambio de fase de líquido a gas incrementando la temperatura, mientras que la cavitación es el cambio de fase por disminución de la presión.	21
8.	Esquema de la serie de eventos que se desencadenan por el rompimiento dieléctrico una vez que se supera más allá del umbral de formación del plasma ($10^{18} - 10^{20} \text{ cm}^{-3}$). Figura tomada de (Tinguely, 2013).	22
9.	Ionización multifotón: El electrón en la banda de valencia E_v es ionizado por absorción multifotón.	23
10.	Ionización cascada: Los electrones semilla absorben energía y colisionan con átomos vecinos, para luego producir un efecto de ionización en cascada.	24
11.	Ionización cascada con impurezas: Los electrones semilla y las impurezas absorben energía y colisionan con átomos vecinos.	25
12.	Esquema de una burbuja de cavitación en su primer tiempo de colapso y su rompimiento de simetría debido a la presión hidrostática (Tinguely, 2013).	27
13.	Rompimiento dieléctrico inducido por láser en agua a distintas duraciones del pulso. Las zonas oscuras muestran en el centro la formación del plasma y en la periferia se observan las ondas de choque y las burbujas de cavitación; la dirección del haz láser en todas las imágenes va en sentido de izquierda a derecha y la zona de enfoque del haz se genera después de la línea vertical (Hammer et al., 1998).	30
14.	(a) Modulación Espacial de la Transmitancia (STM) debido al crecimiento de la burbuja de cavitación y (b) Señal eléctrica típica de la técnica STM, donde se registra el crecimiento/colapso de la burbuja de cavitación generada con un solo disparo del haz de bombeo (Devia-Cruz et al., 2012).	33
15.	Arreglo experimental para la caracterización del haz de bombeo en un sistema de PEB.	35
16.	Arreglo óptico de la técnica STM en cubeta con HA bajo un sistema de presurización.	36
17.	Arreglo experimental de la técnica STM para el estudio de cavitación en cubetas con HA.	37

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
18. Arreglo óptico de la técnica STM en un ojo de cerdo <i>ex-vivo</i> presurizado.	38
19. Adaptación de la técnica STM dentro de la CA en un ojo de cerdo <i>ex-vivo</i> . La zona de irradiación indicada en la vista frontal (círculo amarillo), corresponde tanto al haz de bombeo como al de prueba.	39
20. Condiciones de irradiación y presurización en un ojo de cerdo <i>ex-vivo</i> para inducir cavitación láser y monitorearlo mediante la técnica STM. (A) Pieza sujetadora para ojos de cerdo, (B) Adaptación de la técnica STM en ojos de cerdo y (C) Ejemplo de haz esparcido cuando el haz de prueba se refleja en el iris y atraviesa la córnea.	40
21. Propagación de un haz gaussiano enfocado en espacio libre y frente a un obstáculo: ojo de cerdo.	41
22. Arreglo experimental de la técnica STM para cavitación en ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	42
23. Procedimiento para la manipulación de los ojos de cerdo <i>ex-vivo</i> . (A) Ojo de cerdo enucleado recién colectado del Rastro Municipal de Ensenada, (B) ojos de cerdo disecados y (C) almacenamiento de los ojos de cerdo.	44
24. HA de ojos cerdo en cubetas de cuarzo o plástico. La mezcla del HA de cada uno de los ojos de cerdo colectados, corresponde a antes (A) y después (B) de ser sumergidos los cerdos en la tina con agua hirviendo. En (C) se muestra el mecanismo para presurizar cada cubeta con HA.	45
25. Acción de la pilocarpina para estimular la relajación del iris.	46
26. Procedimiento para análisis histológico de córneas de cerdo irradiadas.	47
27. Esquema de la técnica STM con el haz de prueba cubriendo total (A) y parcialmente (B) la zona de generación de las burbujas de cavitación.	51
28. Simulación del haz de prueba propagándose en la CA de un ojo de cerdo a distintos ángulos de incidencia. La estrella indica la zona de generación de las burbujas de cavitación por el haz de bombeo.	52
29. Simulación del haz de bombeo enfocado con lente $L_1 = 12$ mm, propagándose en aire.	53
30. Simulación del haz de bombeo enfocado y propagándose dentro del modelo de ojo de cerdo.	54
31. Procedimiento para la preparación de las muestras de córnea de cerdo, para caracterización óptica.	55
32. Espectro de transmitancia directa en córnea de cerdo 2 horas post-mortem.	56
33. Curva del coeficiente de absorción del tejido corneal (ojo de cerdo).	57
34. Decaimiento en la intensidad del haz de bombeo a través de la córnea.	58
35. Espectros de absorción del HA 1 hora después de su colección.	59
36. Espectro de absorción de muestra completa (línea continua) y fracción (línea discontinua) de HA porcino, y su comparación con una solución de ácido ascórbico 0.1 mg/mL (línea punteada) (Yang et al., 2006).	60
37. Espectro de absorción de una cubeta con HA tras varios periodos de irradiación con el haz de bombeo.	61

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
38. (A) Enlace cruzado del azobenceno entre moléculas de glutatión reducidas (<i>GSSH</i> , por sus siglas en inglés) y (B) Espectro de absorción UV-VIS del enlace tipo azobenceno en solución buffer a una serie de valores de pH (Beharry, 2012).	62
39. Señal típica de la técnica STM, aplicada en una cubeta de plástico con HA, para distintos valores de energía de bombeo. La presión externa es de 7 mmHg por encima de la presión atmosférica. La línea punteada indica la diferencia de amplitud máxima que se puede alcanzar, ya sea por la ausencia de la burbuja o cuando el diámetro de la burbuja el diámetro del haz de prueba.	63
40. Relación de E_p del haz de bombeo, en el rango de 1 a 16.5 mJ, con su correspondiente valor de fluencia utilizando la lente $L_1(f = 12mm)$. El área de la cintura del haz corresponde a la obtenida experimentalmente y mostrada en la tabla 7 en propagación libre (línea continua) y a la corregida por los efectos de refracción de la córnea (línea punteada).	64
41. 1 ^{er} tiempo de colapso para tres valores de energía del pulso de bombeo y presión externa ejercida dentro del rango clínico de la PIO sobre la presión atmosférica en cubeta de plástico.	64
42. 1 ^{er} tiempo de colapso a distinta presión externa ejercida sobre la presión atmosférica en cubeta de plástico con HA. La pendiente m en base al ajuste lineal es de ≈ 0.97 us/mmHg.	65
43. 1 ^{er} tiempo de colapso a distintas presiones externas sobre la presión atmosférica en cubeta de cuarzo con HA. La pendiente m en base al ajuste lineal es de $m(2.91 \text{ mJ}) \approx 0.5$ us/mmHg y $m(6.52 \text{ mJ}) \approx 0.6$ us/mmHg.	66
44. Señales típicas STM obtenidas en una cubeta de cuarzo con HA, sin presurizar, con una energía $E_p = 9.33$ mJ y utilizando una lente $L_1 = 25.4$ mm.	67
45. Arreglo óptico de la técnica STM en cubeta de cuarzo con agua destilada bajo un sistema de presurización.	68
46. Señales típicas STM utilizando pulsos de 120 fs, 1 kHz a 795 nm.	69
47. 1er. tiempo de colapso en función de la energía del haz de bombeo a 3 presiones externas en un medio de agua destilada.	69
48. 1er. tiempo de colapso en función de la presión externa ejercida (sobre la presión atmosférica) en un medio de agua destilada. $m \approx 0.06$ us/mmHg.	71
49. Señal típica STM adaptada a la CA de un ojo de cerdo <i>ex-vivo</i>	72
50. Señal STM aplicada en ojo de cerdo <i>ex-vivo</i> variando la energía del pulso de bombeo. La línea punteada indica la diferencia de amplitud máximo que se puede alcanzar.	73
51. 1 ^{er} tiempo de colapso promediado utilizando 2 ojos de cerdo a distintas presiones externas (sobre la presión atmosférica). La pendiente m en base al ajuste lineal es de $m(13 \text{ mJ}) \approx 1.2$ us/mmHg y $m(16.4 \text{ mJ}) \approx 1.05$ us/mmHg. El rectángulo superior naranja indica la zona por efectos de acomodación del ojo de cerdo en la CA.	74

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
52. Incertidumbre en la medición del 1 ^{er} tiempo de colapso. Datos sin promediar en 1 ojo de cerdo a distintas energías de bombeo.	75
53. Dispersión del 1 ^{er} tiempo de colapso sin promediar de 3 ojos de cerdo a distintas energías de bombeo.	76
54. Error en la medición sin promediar del 1 ^{er} tiempo de colapso de la burbuja de cavitación con 1 ojo de cerdo para distintas presiones (sobre la presión atmosférica).	77
55. Dispersión del 1 ^{er} tiempo de colapso sin promediar de 3 ojos de cerdo a distintas presiones (sobre la presión atmosférica). El ajuste lineal corresponde al promedio de los 3 ojos.	78
56. Micrografía de córnea de cerdo <i>ex-vivo</i> obtenida de un microscopio óptico de transmisión con contraste de fase. Se indican la presencia de queratocitos (<i>flechas blancas</i>) dentro de las fibras de colágeno en el estroma.	79
57. Micrografías con contraste de fase en transmisión mostrando el daño en córneas de cerdo <i>ex-vivo</i> . (A,B) corresponde a la muestra control y (C,D),(E,F),(G,H),(I,J) ojos irradiados con 1 (1Hz), 20 (1 Hz) \approx 200 (10Hz) y \approx 2000 (10 Hz) pulsos, respectivamente. (A,C,E,G,I) cubren la zona de epitelio y estroma, mientras que (B,D,F,H,J) la zona de estroma y membrana de Descemet. Se indica la zona de daño intencional por enfoque del haz de bombeo en la superficie de la córnea (<i>punta de flecha</i>).	83
58. Micrografías de daño en córnea para el segundo conjunto de ojos. La nomenclatura, amplificación y condiciones de irradiación son las mismas que en la Fig. 57.	84
59. Umbrales de lesión mínima visible (<i>MVL</i> , por sus siglas en inglés) y el máximo permisible (línea continua) a 1064 nm (Rockwell et al., 2010).	85
60. Propuesta de configuración STM colineal para los haces bombeo-prueba.	91
61. Transmitancia total (contiene la luz esparcida a un ángulo de 170 ° y la que pasa directamente a través del medio) de: HA, HV, cristalino, retina y córnea, de un ojo humano (Boettner and Wolter, 1962).	93

Lista de tablas

Tabla		Página
1.	Propiedades del HA en ojo humano (Sunita Agarwa et al., Textbook of Ophthalmology, 2002).	13
2.	Comparación de parámetros medidos en el globo ocular de cerdo y humano (Sanchez et al., 2011).	15
3.	Energías de disociación de enlaces químicos y energía del fotón para distintos sistemas láser.	18
4.	Mecanismos de interacción láser-tejido y sus aplicaciones en la medicina (Markolf H. Niemz, 2007).	20
5.	Conversión de la energía del pulso a energía mecánica y de vapor (Vogel, 1996).	29
6.	Divergencia del haz y parámetro de calidad determinado experimentalmente para los haces de bombeo y prueba.	49
7.	Comparación teórico/experimental del radio del haz de bombeo en la zona focal para dos lentes positivas.	49
8.	Parámetros para el modelo del globo ocular. Los parámetros Sep. y Ap/2 están en milímetros.	50
9.	Parámetros de propagación del haz de prueba en la CA de ojo de cerdo.	53
10.	Parámetros de propagación de haz gaussiano: Haz de bombeo enfocado en aire libre.	54
11.	Parámetros de propagación de haz gaussiano: Haz de bombeo enfocado en la CA de ojo de cerdo.	55
12.	Energía transmitida durante la generación de cavitación en agua destilada para distintas duraciones de pulso (Hammer et al., 1998).	70
13.	Dispersión en el 1er. tiempo de colapso en función de 3 valores de energía de bombeo para 3 ojos de cerdo <i>ex-vivo</i>	76
14.	Dispersión en el 1er. tiempo de colapso dentro de 3 zonas de energía de bombeo.	77
15.	Umbral de lesión mínima retinal teóricas utilizando un perfil de haz circular (Kennedy et al., 2004).	86

Capítulo 1. Introducción

El fenómeno de cavitación tiene una larga historia. Tal vez el primero en describir el fenómeno de ruptura en líquidos fue Leonard Euler en 1754, con su trabajo sobre la teoría de turbinas (Lauterborn, 1979), pero no fue hasta 150 años después cuando llegó a ser un problema en conexión con el desgaste en las propelas de los barcos. Años después con la invención de los pulsos láser del orden de nanosegundos, se introdujo el concepto de cavitación inducida por láser fenómeno observado con campos de luz intensos que crean un rompimiento dieléctrico en el líquido.

La cavitación se puede describir como el proceso de formación de burbujas de vapor en un medio líquido inicialmente homogéneo, la cual puede ser clasificada en cuatro tipos, dependiendo del mecanismo físico de su creación: (i) acústico, (ii) hidráulico, (iii) partícula y (iv) óptico. La cavitación óptica bajo el mecanismo de formación mediante inducción láser, puede ocurrir de dos maneras: por pulsos del orden de μs a fs (Schaffer et al., 2002; Toytman et al., 2010; Thiyagarajan and Thompson, 2012) o en modo de onda continua (CW, por sus siglas en inglés) (Padilla-Martinez et al., 2014; Ramirez-San-Juan et al., 2010). La generación de cavitación cuando se utilizan láseres en modo CW dependerá de la potencia del haz y del coeficiente de absorción lineal del medio, principalmente. Esto desencadenará un aumento abrupto de la temperatura (termocavitación) y entonces alcanzar las condiciones de generación de las burbujas de cavitación y ondas de choque (Padilla-Martinez et al., 2014). Por otro lado, si se enfoca un haz láser pulsado, se inducen fenómenos ópticos no lineales que causan la ionización multifotón y cascada (rompimiento dieléctrico inducido por láser) responsables de la formación del plasma en la zona focal, seguidos de la creación de ondas de choque y burbujas de cavitación (Evans and Camacho-López, 2010). En estos fenómenos, la densidad de potencia del haz láser es el principal parámetro que rige estos fenómenos.

La dinámica de formación y evolución de las ondas de choque y de las burbujas de cavitación ocurre desde el inicio del pulso láser y se extiende hasta unos cientos de microsegundos. Una vez que la energía del pulso superó el umbral para la formación de la densidad del plasma ($10^{18} - 10^{20} \text{e/cm}^{-3}$) en la zona focal (Evans and Camacho-López,

2010) se crea una onda de choque seguida de la burbuja. En este sentido, si se tiene un estudio de la evolución de las burbujas de cavitación con una alta resolución temporal, es posible conocer el instante en que ocurre el primer y subsecuentes tiempos de colapsos de la burbuja. De acuerdo al modelo de *Rayleigh-Plesset*, conociendo el primer tiempo de colapso se puede determinar la presión ejercida por el medio p_0 si también se sabe el radio máximo que alcanza la burbuja R_{max} y la densidad del medio ρ .

Por otro lado, las aplicaciones del rompimiento dieléctrico inducido por láser (Laser-Induced Breakdown, *LIB*, por sus siglas en inglés) han crecido exponencialmente en las últimas décadas, principalmente en el campo de la medicina. Sin embargo, también existen otras áreas que aprovechan este fenómeno. Por ejemplo, la evaluación espectrocópica de contaminantes en el ambiente o para efectos de blindaje, en el que se usa el plasma para dar protección ocular durante la exposición a pulsos láser ultracortos. En lo que se refiere a las aplicaciones médicas de los láseres pulsados, existen al menos cuatro grupos: microcirugía intraocular, litotricia, angioplastia y ablación láser, donde los últimos dos se caracterizan por ser mecanismos de corte por evaporación explosiva del tejido más que por LIB.

Algunos ejemplos de LIB para procedimientos de microcirugía intraocular son: (i) capsulotomía anterior láser que consiste en realizar una apertura en la cápsula posterior del cristalino; (ii) tratamiento de sinequia que consiste en despegar cualquier adherencia del iris a otras estructuras oculares; (iii) cirugía fotorrefractiva corneal intraestomal y (iv) disrupción de membranas en el vitreo (Kennedy, 1997).

La iridectomía, que se define como la extirpación parcial del iris, se realiza principalmente para el tratamiento del glaucoma de ángulo cerrado y melanoma de iris. Las personas con glaucoma presentan una disminución de la capacidad visual debida al aumento de la presión intracocular (PIO), la cual, puede dañar el nervio óptico y conducir a la ceguera si no se trata.

1.1. Motivación

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014), las cataratas no operadas y el glaucoma son causantes del 33% y el 2% de ceguera, respectivamente. Uno de los

principales problemas con la ceguera por glaucoma es que su detección es tardía debido a que el paciente no presenta síntomas en etapas tempranas y, por otro lado, una vez que se presenta el daño la ceguera es casi irreversible. Según un aumento del crecimiento de la ceguera por glaucoma a nivel mundial (Quigley and Broman, 2006), de tener 60.5 millones de casos en 2010, se puede llegar a 79.6 millones de personas ciegas por glaucoma en 2020, donde más del 85% de los afectados es mayor de 40 años. En México no se tienen (hasta la fecha que se escribió este trabajo) estadísticas (INEGI y Secretaría de Salud) sobre la discapacidad visual por glaucoma. Sin embargo, (Quigley and Broman, 2006) se ha establecido una proyección de 5 millones de casos de glaucoma en México para el 2010, ocupando el tercer lugar de ceguera por glaucoma después de las cataratas y la retinopatía diabética.

El glaucoma es una enfermedad que se caracteriza por el aumento progresivo de la PIO por arriba de los 22 mmHg (una PIO normal está entre 10 y 21 mmHg), debido a la ausencia de drenaje del humor acuoso (HA) dentro de la cámara anterior (CA) del ojo. El aumento de la PIO trae como consecuencia el daño al nervio óptico lo cual origina la pérdida paulatina de la visión. En este contexto, existen diversos tipos de glaucoma: congénito, de ángulo cerrado y abierto, y de tensión normal.

Los dos tipos principales de glaucoma que se presentan en la mayoría de los casos son los de ángulo cerrado y abierto (Ver Fig. 1). El glaucoma de ángulo abierto se caracteriza por la obstrucción a nivel funcional del canal de Schlemm, cuya principal función es el de drenar el HA hacia el torrente sanguíneo, mientras que el glaucoma de ángulo cerrado se debe a una obstrucción anatómica, donde existe un acercamiento anormal entre la córnea y el iris, provocando un aplanamiento de la malla trabecular, siendo ésta última la que permite el flujo del HA de la cámara posterior hacia la CA del ojo (región comprendida entre la córnea y el iris).

Actualmente existen diversas herramientas de diagnóstico para el glaucoma de tipo abierto y cerrado, entre los que destacan el tonómetro (presión interna del ojo); el paquímetro corneal (espesor de la córnea), las pruebas de campo visual (perimetría Humphrey para pruebas de campo de visión total); la oftalmoscopia (forma y color del nervio óptico) y la gonioscopia (ángulo que forma el iris con respecto a la córnea). En revisiones regulares para la detección del glaucoma, se hace uso de la tonometría y oftalmoscopia para dar

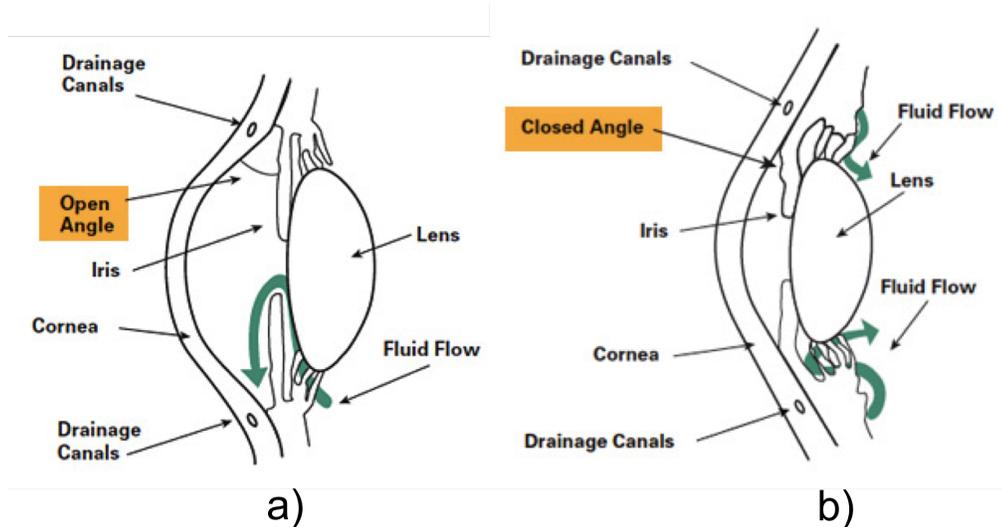


Figura 1: Drenaje del humor acuoso en un ojo con glaucoma de ángulo abierto (a) y cerrado (b). En (a) se presenta una obstrucción funcional del los canales de drenaje (canal de Schlemm) y en (b) ocurre una obstrucción anatómica entre el iris y la córnea. Imagen tomada de (Foundation, 2016).

un primer diagnóstico.

La medición de la PIO mediante la técnica de tonometría por aplanamiento o Goldmann, es el más comúnmente utilizado, aunque existen otros tipos como: de no contacto, de rebote, de fosfenos, transpalpebral, entre otros, todavía ninguno de ellos da una mayor precisión de la PIO como el tonómetro de Goldmann. La tonometría por aplanamiento está basada en la modificación de la Ley Maklakov-Fick, llamada Ley de Imbert-Fick, la cual establece la relación entre la fuerza necesaria para aplanar una esfera y la presión dentro de la misma, multiplicada por el área aplanada. Sin embargo, se deben imponer ciertas suposiciones sobre la superficie a analizar para que ésta sea válida, las cuales son: superficie perfectamente esférica, seca, flexible y de paredes infinitamente delgadas. El hecho de que la córnea no cumpla con alguna de las premisas de la Ley Imbert-Fick y que éstas dependan de la edad, género, y otras características físicas, hacen que la estimación de la PIO no sea una medida exacta y precisa. Por ejemplo, para personas con un espesor corneal grueso se obtiene una sobreestimación de la PIO, dando un diagnóstico falso positivo. Además, se deben incluir los errores sistemáticos de medición, como los causados por los movimientos del paciente. Es por ello que se requiere del desarrollo de nuevas tecnologías que ofrezcan mayor precisión y exactitud, que no sean invasivas y sean reproducibles y confiables en la medición de la PIO. Bajo estas premisas, la técnica de cavitación láser que se describirá a continuación surge como una nueva herramienta

para la medición de la PIO.

1.2. Justificación

El presente proyecto forma parte de una colaboración de más de 7 años con la Clínica de Ojos de Tijuana con el objetivo de desarrollar un método para determinar la PIO basado en el efecto de cavitación inducida por láser. En trabajos recientes (Devia-Cruz, 2014; Martínez, 2015), se ha demostrado la viabilidad del método, a través de la implementación de un sensor óptico basado en el efecto de cavitación, utilizando una cubeta de cuarzo con agua destilada bajo un sistema de presurización. Posteriormente se usó un modelo de ojo artificial el cual también puede ser presurizado. El siguiente paso en el desarrollo del proyecto es implementar este método en un globo ocular *ex-vivo* para validar el método en este modelo y resolver problemas de configuración óptica del sensor, así como también, para analizar posibles efectos del fotodaño en alguna de las zonas de interacción de los haces bombeo-prueba con el tejido ocular.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Implementar el método de la presión intraocular basado en el fenómeno de cavitación inducida por láser en ojos de cerdo *ex-vivo*, con el cual se puedan determinar variaciones de presión dentro del rango clínico de PIO.

1.3.2. Objetivos Particulares

1. Determinar la geometría adecuada de incorporar un haz de bombeo-prueba para inducir y seguir la evolución de una burbuja de cavitación en un ojo de cerdo *ex-vivo*.
2. Estudiar la forma idónea de detección óptica de la burbuja de cavitación generada dentro del globo ocular.

3. Analizar el fotodaño por la irradiación del haz de bombeo en córneas de cerdo *ex-vivo*.
4. Estudiar del fenómeno de cavitación en el globo ocular presurizado. Principalmente la relación del 1er tiempo de colapso de las burbujas de cavitación con la energía del pulso de bombeo y de la presión externa ejercida en el ojo para el rango de interés clínico de la PIO.

1.4. Organización de la tesis

A continuación se enlista el contenido de cada uno de los capítulos:

Capítulo 1: En este capítulo se da una introducción sobre el fenómeno de cavitación inducido por láser y sus aplicaciones. Se menciona la motivación que dio origen a la línea de trabajo que precede el presente trabajo y finalmente, se establecen los objetivos generales y particulares planteados.

Capítulo 2: Como parte de los antecedentes, se expone la importancia y relación de la presión intraocular con el glaucoma, describiendo las causas principales que lo generan y las herramientas de diagnóstico que actualmente se utilizan. Posteriormente, se da una breve descripción anatómica de 3 estructuras que se encuentran en la CA y que están en contacto directo con la irradiación láser bajo las condiciones experimentales del presente trabajo. Se justifica el uso de ojos de cerdo *ex-vivo* como modelo de globo ocular humano con glaucoma. Por último, se describe el fenómeno de cavitación láser, incluyendo los conceptos de: rompimiento dieléctrico, dinámica de las burbujas de cavitación y la partición de energía en el fenómeno de cavitación.

Capítulo 3: Al inicio de este capítulo se da una breve descripción de las técnicas que permiten un estudio resuelto en el tiempo de la evolución de las burbujas de cavitación, haciendo énfasis en la importancia de utilizar la técnica de la modulación espacial de la transmitancia (*STM*, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se explican las condiciones bajo las cuales se indujo cavitación en cubetas de cuarzo o plástico con HA y dentro de

la CA de los ojos de cerdo *ex-vivo*. Al final del capítulo se describe la metodología que se utilizó para el análisis del fotodaño en córneas de cerdo mediante pruebas histológicas. Por último, se describe el protocolo para la manipulación y preservación de los ojos de cerdo *ex-vivo*.

Capítulo 4: En este capítulo se presentan y se discuten los resultados sobre la caracterización de los haces de bombeo y prueba, y de la respuesta óptica del medio (HA), así como de los resultados de cavitación inducida por láser en HA para cubetas de cuarzo o plástico utilizando la técnica STM. Específicamente se analizan las curvas de la dependencia del primer tiempo de colapso (τ_c) en función de la presión externa aplicada (P) y la energía por pulso del haz de bombeo (E_p): P vs τ_c y E_p vs τ_c . También se muestran los resultados de la aplicación de la técnica STM adaptada al ojo de cerdo *ex-vivo*, analizando la tendencia de la curva P vs τ_c . Por último, se muestran y se analizan las micrografías de las pruebas histológicas realizadas en distintas córneas con un número distinto de pulsos depositados.

Capítulo 5: Se presentan las conclusiones a las que se llegó en función de los resultados obtenidos y de los objetivos planteados. En este capítulo se presentan también algunas propuestas de trabajo a futuro.

Capítulo 2. Marco Teórico

Al inicio de éste capítulo se describirá la relevancia de la presión intraocular con el desarrollo del glaucoma, las causas que lo generan y las herramientas que actualmente existen para el diagnóstico del glaucoma. Por otro lado, se da una breve descripción anatómica de las estructuras oculares expuestas durante la irradiación láser para el trabajo de esta tesis. Se justifica la utilización de ojos de cerdo *ex-vivo* como modelo de globo ocular humano para la simulación del glaucoma. Se analizan los distintos tipos de interacción láser-tejido en función de la duración del pulso y la densidad de potencia, y por último, se presenta un análisis sobre la cavitación inducida por láser, específicamente se discuten: el rompimiento dieléctrico en función de la duración del pulso, la dinámica de la burbujas de cavitación y la partición de la energía del pulso con distintos procesos físicos durante el fenómeno de cavitación.

2.1. Presión intraocular y el glaucoma

La principal función del ojo es recibir la señal de luz que proviene del medio ambiente y transmitirla al cerebro donde se crea una imagen. Para que esto suceda se requiere que las estructuras del ojo involucradas, como la córnea y el cristalino, sean transparentes para poder transmitir la luz hasta los fotorreceptores ubicados en la retina. Este tipo de estructuras son avasculares, es decir, el soporte de nutrientes y oxígeno no debe de ser transportado por flujo sanguíneo, ya que interferiría en la transparencia de las estructuras involucradas. Otro punto a considerar es el hecho de que el ojo debe de mantener una cierta presión interna que provea de la rigidez necesaria para la alineación óptica de la córnea, el cristalino y la retina. Para lograr esto, el ojo produce, acumula y circula un fluido llamado humor acuoso (HA), el cual se produce en el epitelio ciliar, pasa a la cámara posterior y anterior, y por último se drena por el canal de Schlemm o el sistema venoso episcleral hacia el torrente sanguíneo. Por lo tanto, el HA tiene tres funciones principales: (i) *estructural*: ya que la cámara anterior y posterior poseen estructuras que por sí mismas podrían colapsar; la PIO debida al flujo del HA mantiene la forma y dimensiones de éstas cavidades y permite que conserven su posición más adecuada; (ii) *nutrición*: debido al contacto del HA con estructuras avasculares, éste provee nutrientes y oxígeno a la córnea

y cristalino, y (iii) *refracción*: contribuye a la refracción de la luz que penetra por el ojo para que converja en la retina, aunque la capacidad de refracción del HA es menor que la del cristalino.

Uno de los problemas del HA es que cualquier desbalance en su producción o en el sistema de drenaje, puede provocar anomalías en la PIO. Por ejemplo, en caso de drenaje insuficiente, la acumulación del fluido contenido dentro del globo ocular provocará un aumento de la PIO por encima de los niveles fisiológicos funcionales (11 a 21 mmHg por arriba de la presión ambiente).

El glaucoma es una neuropatía óptica donde los efectos mecánicos directos por la elevación de la PIO, resulta en el daño o degeneración del nervio óptico y, por lo tanto, la pérdida de la visión. Actualmente se conocen dos tipos principales de glaucoma: (i) abierto, provocado por una obstrucción lenta de los canales de drenaje a nivel fisiológico, pero manteniendo el ángulo entre el iris y la córnea tal como debería de ser, y (ii) cerrado, donde existe un bloqueo físico en los canales de drenaje. Normalmente se produce por un cierre paulatino del ángulo entre el iris y la córnea. Aunque existen otros tipos de glaucoma como: tensión normal, congénito, pigmentario, traumático, pseudoexfoliativo, entre otros, los del tipo abierto y cerrado corresponden aproximadamente al 90 % de todos los casos de glaucoma (Foundation, 2016).

El glaucoma es una enfermedad asintomática en las etapas tempranas. Una vez que se empiezan a presentar síntomas de pérdida del campo visual, el daño en la retina es casi irreversible, por lo que las técnicas de exploración oftálmica temprana cobran una gran importancia. Actualmente existen diversos instrumentos para el diagnóstico del glaucoma, los cuales se pueden clasificar según el parámetro físico a medir como: (i) ángulo iridocorneal (gonioscopía), (ii) espesor corneal (paquímetro corneal), (iii) forma y color del nervio óptico (oftalmoscopía), (iv) campo visual (perimetría de Humphrey) y (v) presión intraocular (tonómetro) (Ver Fig. 2). Aunque en un primer diagnóstico se debe incluir cada una de las mediciones anteriormente mencionadas para sustentar el grado y daño por glaucoma, la técnica por excelencia utilizada hoy en día es la tonométrica.

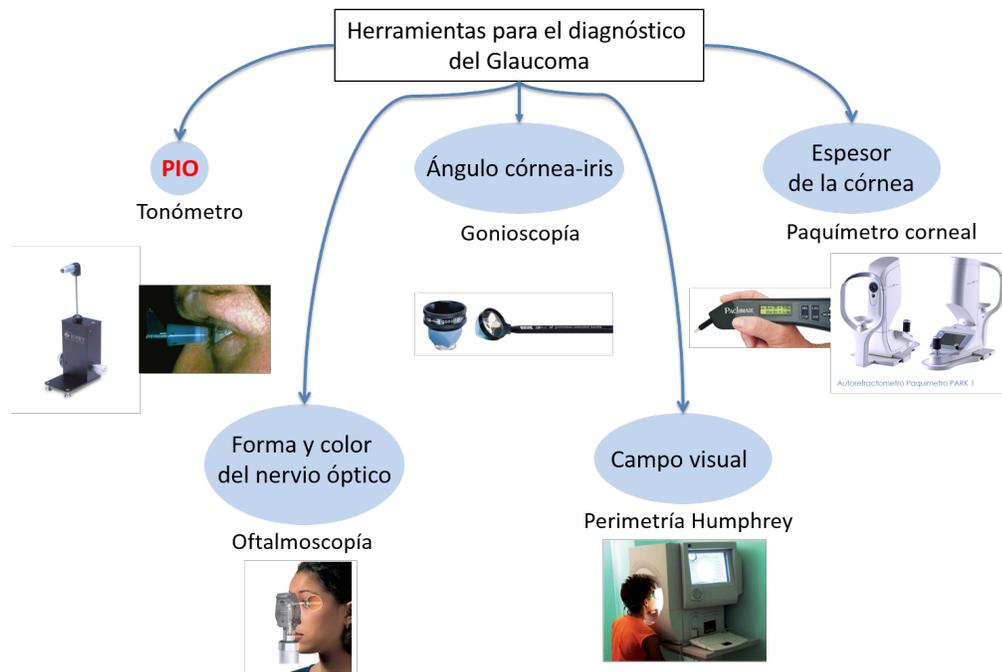


Figura 2: Diagrama de herramientas de diagnóstico para el glaucoma según el parámetro a medir.

En la década de los 50s Hans Goldmann diseñó la tonometría de aplanación mediante la adaptación de la llamada Ley de Imbert-Fick, la cual se escribe como:

$$F/A = P. \quad (1)$$

donde F es la fuerza externa aplicada para aplanar una superficie esférica, A es el área aplanada y P la presión interna dentro de la esfera. La validez de la Ec. 1 está sujeta a ciertas suposiciones, la cual se cumple para:

1. Esferas perfectas. La córnea es esférica pero no geoméricamente perfecta, siendo menor el radio de curvatura en el área central que en la periferia.
2. Membranas infinitamente delgadas. La córnea tiene un grosor de aproximadamente $550 \mu\text{m}$ y el grosor en el área medida varía de persona a persona (Idalia et al., 2012).
3. Esferas perfectamente elásticas y flexibles. Los tejidos oculares presentan una rigidez propia significativa, independiente de la PIO.
4. Esferas con propiedades elásticas homogéneas. La córnea, el limbo esclero-corneal y

la esclerótica no comparten propiedades biomecánicas similares.

Debido a las complicaciones que tiene el tonómetro de Goldmann al no cumplir con al menos algunas de las suposiciones, pero gracias a los avances en la tecnología, surgieron nuevos instrumentos tonométricos (de contacto y no contacto) entre los que se pueden mencionar:

1. *De fosfenos*. Cuando se aplica presión sobre la esclerótica a través del párpado, genera un fenómeno visual entópico percibido por el paciente como un fosfeno. La presión umbral para la creación de un fosfeno aporta una estimación de la PIO.
2. *De contorno*. Consiste en un método de medida continua de la PIO en el que se usa un cono de contacto con una cavidad que simula la curvatura anterior de la córnea. En la pieza se encuentra un sensor piezorresistivo de presión, el cual al oprimir la pieza sobre el área corneal central mide la PIO directamente en la superficie externa de la córnea.
3. *De sople de aire*. Consiste en el aplanamiento transitorio de la córnea por un chorro de aire, mientras que un haz de luz infrarroja se refleja en la superficie aplanada. La cantidad de luz reflejada durante el periodo de aplanación se compara con la cantidad de aire que provocó dicha aplanación.

2.2. Anatomía del ojo humano: cámara anterior

Dado que en el presente trabajo se considera la utilización de un globo ocular para la generación de cavitación, es necesario conocer la anatomía de las estructuras que constituyen el ojo, además de describir algunos parámetros ópticos reelevantes.

En la Fig. 3 se representa la anatomía de un globo ocular humano donde sin especificar la distribución espacial de los láseres utilizados para irradiar, se señalan las tres zonas principales de interacción: córnea, HA e iris.

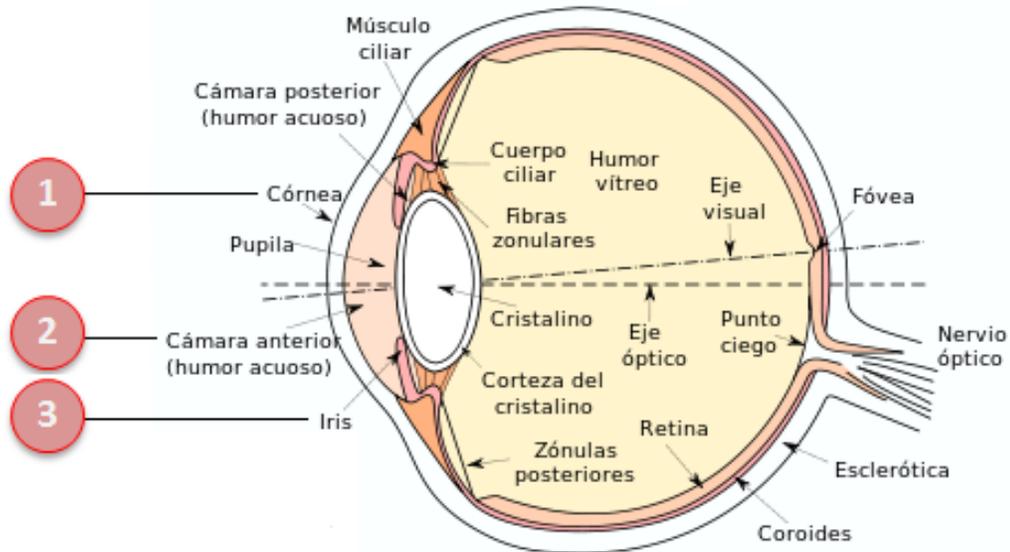


Figura 3: Anatomía de globo ocular humano.

La córnea es una estructura avascular rodeada de fluidos (e.g., lágrimas) en la parte anterior y HA en la zona posterior. En la periferia de la córnea gradualmente se transforma a esclera, siendo la zona de transición entre ambas estructuras, la llamada limbo esclero-corneal. En la córnea se diferencian cinco capas que de la superficie anterior a la posterior (Fig. 4), son:

- (i) *Epitelio*. Estratificado por células basales (mitosis), aladas y escamosas, es la zona de la córnea que tiene contacto con el exterior, cuyas funciones principales son: transparencia, barrera a los fluidos y microorganismos, y estabilizador de las lágrimas. Tiene un espesor de alrededor 50 - 100 μm . Algunos parámetros ópticos y físicos son: diámetro = 11.7 mm, índice de refracción = 1.376 y contenido de agua 78%.
- (ii) *Membrana de Bowman*. Tejido transparente de aproximadamente 17 μm de espesor. Está compuesta de colágeno y ayuda a la córnea a mantener su forma.
- (iii) *Estroma*. Constituido por un 80 % de agua y 20 % en sólidos, forma parte del 90 % del espesor corneal. Tiene un grosor aproximado de 500 μm y está formado por fibras de colágeno (tipo I), queratocitos (células cuya función es secretar el colágeno tipo I) y matriz.
- (iv) *Membrana de Descemet*. Estructura acelular con un grosor de 5 a 20 μm y compues-

ta principalmente por fibras de colágeno, sirve como soporte para el endotelio.

- (v) *Endotelio*. Es una capa única de células escamosas de aproximadamente $5 \mu\text{m}$ de espesor. La función principal es la de regular el fluido que entra a la córnea desde la CA.

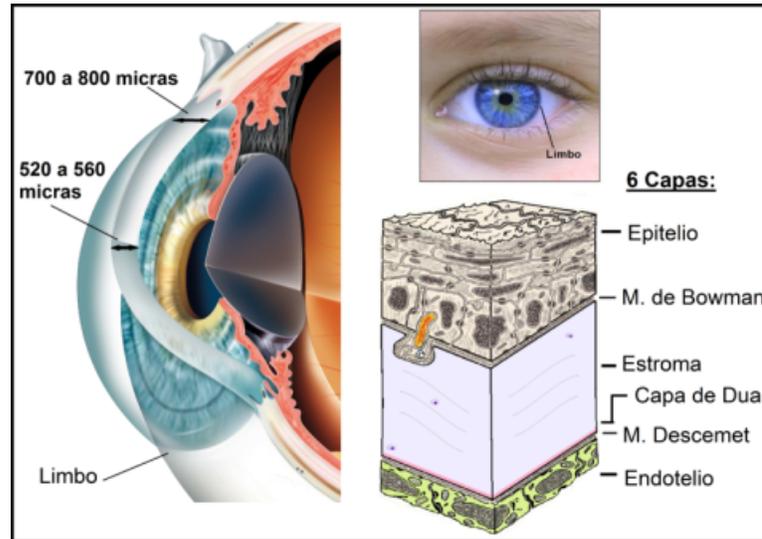


Figura 4: Estratificación de la córnea. Imagen tomada de (García, 2016).

Como se mencionó en la sección 2.1, el HA es una solución incolora que circula de manera continua desde la cámara posterior hacia la cámara anterior. Sus principales funciones son establecer la PIO, conservar la transparencia, el intercambio de metabolitos con la córnea, cristalino y vítreo, así como, la eliminación de restos hemáticos y productos de la inflamación.

Tabla 1: Propiedades del HA en ojo humano (Sunita Agarwa et al., Textbook of Ophthalmology, 2002).

Propiedad	Valor
pH	7.1 - 7.3
Índice de refracción	1.34
Composición de agua †	98.69 %
Tasa de flujo	1.5 - 4.5 $\mu\text{L}/\text{min}$
Volumen	0.31 mL

El HA se produce mediante tres procesos fisiológicos que contribuyen a la formación y composición química, las cuales son la ultrafiltración; la difusión y la secreción activa. En

†La composición restante del HA corresponde a iones libres como: Na^+ , Cl^- , K^+ , principalmente, y el resto en proteínas, urea, lactato, glucosa, alanina, valina, lisina, ácido ascórbico y glutatión.

lo que se refiere al sistema de drenaje, éste se lleva a cabo mediante el flujo no convencional (ruta uveoescleral) y convencional (canal de Schlemm), siendo éste último el que da un mayor flujo de salida (70 - 95%). En la tabla 1 se resumen algunas de las propiedades óptico/físicas del HA, la cuales sirvieron para elegir la solución adecuada para la preservación de los ojos de cerdo *ex-vivo* (pH), diseño óptico del modelo de ojo de cerdo (índice de refracción) con el software WinLens3D Basic y generación de las burbujas de cavitación (composición y volumen).

2.2.1. Globo ocular: humano vs cerdo

El único mamífero grande que está siendo utilizado como modelo para la inducción experimental de glaucoma es el mono (Sanchez et al., 2011). A pesar de ser un modelo ideal al del ser humano, la disponibilidad de monos es muy baja debido a razones éticas y económicas. Por otro lado, el modelo de ojo *ex-vivo* de cerdo ha sido ampliamente usado en investigación de ciencias de la visión debido a su morfología similar al del ojo humano (Sanchez et al., 2011). Por ejemplo, ha sido usado en estudios neuroretinales debido a su similitud en la distribución de las capas retinales con la de la retina humana y también ha servido como un modelo animal validado para simulaciones de glaucoma (Ruiz-Ederra et al., 2005; Sanchez et al., 2014). Además, ha sido usado en investigaciones de cirugía de cataratas, en estudios de transplante corneal y como un modelo de aberrometría.

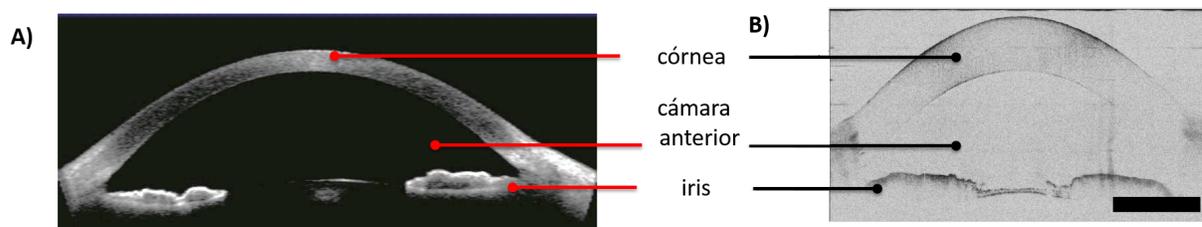


Figura 5: Tomografía de Coherencia Óptica de la CA de un ojo (A) humano y (B) porcino (Bajraszewski et al., 2008; Leung, 2011). La escala en (B) corresponde a 5 milímetros.

Adicionalmente, se han empleado varias herramientas que permitan el diagnóstico en oftalmología, tales como la tomografía de coherencia óptica (Optical coherence tomography, *OCT*, por sus siglas en inglés); la imagen topográfica corneal; la electroretinografía multifocal (respuesta eléctrica de los fotorreceptores en la retina); la paquimetría ultrasónica

(espesor corneal), entre otras. La Fig. 5 muestra la comparación entre la sección de la CA de un ojo humano (A) y el porcino (B), utilizando la técnica de OCT. Con la OCT se puede tener un análisis morfométrico de cada una de las estructuras que componen la CA: córnea, iris, cristalino y HA, como lo son el espesor corneal; el diámetro \varnothing corneal; el ángulo iridocorneal; la profundidad de la CA; el diámetro del iris, etc. En la tabla 2 se enlistan los parámetros medidos por paquimetría ultrasónica y OCT en globos oculares de cerdo y humano.

De los resultados obtenidos por (Sanchez et al., 2011) se puede decir que: (i) la permeabilidad de la esclera en ojo porcino es comparable a la del ser humano; (ii) el espesor corneal porcino es al menos dos veces mayor que la córnea humana y su espesor varía entre 666 y 1013 μm , dependiendo de la edad del cerdo; (iii) la secuencia de proteínas del cristalino porcino es la misma encontrada en el cristalino humano, pero las dimensiones en radio y espesor central es mayor en la de un humano que la de un cerdo, por lo que se dificulta el uso del modelo porcino para el desarrollo de lentes intraoculares; (iv) la retina porcina muestra gran similitud con la retina humana, excepto por su vascularización; (v) la longitud axial de los ojos de cerdo es ligeramente mayor que la de un ser humano y (vi) el ojo de cerdo tiene una menor reacción inflamatoria que la del ojo humano, aunque no se han determinado las causas, se cree que la pigmentación del ojo de cerdo, mayor que la del humano, puede ser uno de los motivos.

Tabla 2: Comparación de parámetros medidos en el globo ocular de cerdo y humano (Sanchez et al., 2011).

Parámetro medido	Ojo de cerdo	Ojo humano
\varnothing Horizontal del iris visible	14.31 mm	11.7 mm
\varnothing Vertical del iris visible	12 mm	10.6 mm
\varnothing Anteroposterior	23.9 mm	24 mm
Paquimetría ultrasónica	877.9 μm	520 μm
Radio corneal promedio	8.45 mm	7.80 mm

2.3. Interacción láser-tejido

Existen distintos fenómenos de reacción en un tejido biológico al ser irradiado por un haz láser ya sea en modo continuo o pulsado. Algunas de las propiedades y/o parámetros que gobiernan la interacción de un haz láser con un medio son la longitud de onda, el estado

de polarización, la intensidad del campo eléctrico, la irradiancia, la densidad de energía, el tiempo de exposición, el tamaño del haz y la duración del pulso; o bien las propiedades del medio como lo pueden ser el coeficiente de absorción (lineal o no-lineal), la reflexión y esparcimiento (propiedades ópticas), la homogeneidad, la isotropía, la conductividad térmica, el tiempo de relajación electrónica del material, entre otras.

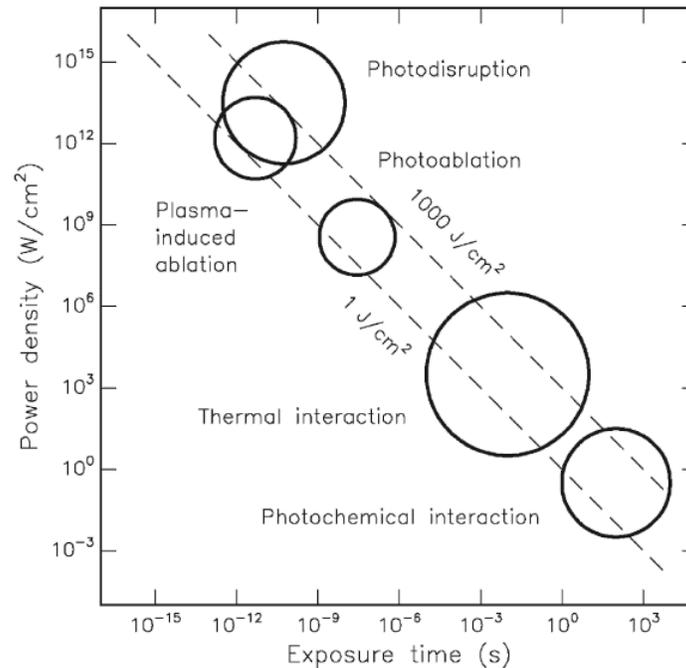


Fig. 3.1. Map of laser-tissue interactions. The circles give only a rough estimate of the associated laser parameters. Modified from Boulnois (1986)

Figura 6: Mapa de interacción láser-tejido. Los círculos dan una estimación general de los parámetros del láser asociado (Markolf H. Niemz, 2007), mientras que el círculo coloreado indica la densidad de potencia utilizada para los experimentos de cavitación dentro de la CA de los ojos de cerdo que conforman el presente trabajo.

A continuación se describen los cinco tipos de categorías de interacción que se pueden obtener en el tejido biológico al irradiarlo con un haz láser: *fotoquímica*, *térmica*, *fotoblación*, *ablación inducida por plasma* y *fotodisrupción*, los cuales están expresados en función del tiempo de exposición y la densidad de potencia o irradiancia W/cm^2 como se presenta en la figura 6. De acuerdo a este mapa la escala de tiempo puede ser dividida en 5 secciones: *interacción fotoquímica* para tiempos de exposición > 1 s; *interacción térmica* para tiempos > 1 μ s; *fotoblación* de 1 μ s a 1 ns, y *fotodisrupción* y *ablación inducida por plasma* con exposiciones < 1 ns.

Es importante mencionar que según las condiciones de irradiación (Nd:YAG, $\tau_p = 9$ ns, $\lambda = 532$ nm) dentro de la CA de los ojos de cerdo *ex-vivo* durante los experimentos realizados en este trabajo, la irradiancia utilizada fue de $4.7- 6.2 \times 10^{12}$ W/cm^2 , ubicándose en

la zona de interacción del tipo ablación inducida por plasma.

1. **Interacción fotoquímica.** En el campo de la medicina la interacción fotoquímica juega un papel importante para los mecanismos de terapia fotodinámica. Durante la PDT se utilizan cromóforos (fotosensibilizantes) adaptados espectralmente que al ser irradiados con una fuente de irradiación monocromática desencadenan reacciones fotoquímicas selectivas, resultando en ciertas transformaciones biológicas. Se puede pensar que la función principal de éstos fotosensibilizantes es de actuar como catalizadores, los cuales se activan a estados excitados por irradiación láser y que durante las etapas de decaimiento interactúan con la molécula objetivo, resultando en la generación de radicales ionizados o interactuando con el oxígeno molecular O_2 . Esto conduce a la oxidación celular y necrosis, también llamado oxidación fotosensibilizante.

2. **Interacción térmica.** Mientras que los efectos fotoquímicos están gobernados por un camino específico de reacción, los efectos térmicos no tienden a ser específicos. Dependiendo de la duración y del valor pico de temperatura alcanzada en el tejido se desencadenan diferentes efectos como la coagulación, la vaporización, la carbonización y por último, el derretimiento.

El proceso de coagulación inicia cuando la energía de irradiación es absorbida por el tejido para tiempos largos de exposición, causando un aumento en la temperatura de hasta 60 °C conduciendo a la desnaturalización de proteínas y colágeno, provocando necrosis. Si el tejido está compuesto de agua y considerando el aumento paulatino de la temperatura, entonces se llevará a la vaporización del agua contenida en estas capas del tejido, derivando en microexplosiones localizadas y generando daño termomecánico por ondas de presión causadas por la expansión del volumen vaporizado. Cuando se alcanzan temperaturas superiores a los 100 °C, el tejido empieza a carbonizarse, produciendo un oscurecimiento del tejido. Una vez que se llega a temperaturas más allá de 300 °C, ocurre la última etapa, el derretimiento del tejido.

Los estadios importantes que involucra el modelo de interacción térmica con el tejido bajo irradiación láser son: (i) generación de calor, (ii) transporte de calor y (iii)

efectos térmicos. La generación de calor depende de las propiedades ópticas del tejido y los parámetros de irradiación láser como lo son el coeficiente de absorción, la irradiancia y el tiempo de exposición, donde el primero contiene la dependencia con la longitud de onda del láser. Por otro lado, el transporte de calor está caracterizado por las propiedades térmicas del tejido como su conductividad térmica y su capacidad calorífica. Por último, los efectos térmicos dependen del tipo de tejido (blando, duro, transparente, opaco) y de la temperatura alcanzada dentro del mismo.

3. **Fotoablación.** La fotoablación es el proceso en el cual se disocian enlaces entre átomos, provocando un daño confinado por ablación definido por la distribución espacial del haz láser. El mecanismo de ablación se da mediante la absorción de un fotón lo suficientemente energético para poder exceder la energía de enlace entre dos átomos A y B. Debido a que diversos compuestos orgánicos están constituidos por un conjunto grande de moléculas con más de 10^3 átomos, principalmente de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, entonces es necesario conocer las energías de disociación de enlaces químicos que puedan existir entre ellos y así elegir el tipo de láser tal que la energía del fotón supere esta energía de disociación. Por ejemplo, energías típicas de disociación para ciertos tipos de enlaces se enlistan en la tabla 3 junto con la energía del fotón para distintos láseres.

Tabla 3: Energías de disociación de enlaces químicos y energía del fotón para distintos sistemas láser.

Tipo de enlace	Energía de disociación (eV)	
C=C	6.4	
O-H	4.8	
N-H	4.1	
C-C	3.6	
C=S	2.7	
Tipo de láser	Longitud de onda (nm)	Energía del fotón (eV)
ArF	193	6.4
KrF	248	5.0
Nd:YLF (4ω)	263	4.7
XeCl	308	3.5
He-Ne	633	2.0
Nd:YAG	1064	1.2
Nd:YAG	532	2.4

De la Tabla 3 se puede ver que los láseres de excímero en el rango espectral UV (ArF, KrF, Nd:YLF, XeCl, entre otros) son los que producen la energía por fotón

suficiente para poder disociar los enlaces tipo: C=C, O-H, N-H, C-C y C-S, mientras que el láser Nd:YAG doblado en frecuencia con efecto de 2 fotones disocia casi los mismos enlaces.

4. **Ablación inducida por plasma.** Cuando se alcanzan densidades de potencia láser superiores a $10^{11}\text{W}/\text{cm}^2$ en sólidos y fluidos, o $10^{14}\text{W}/\text{cm}^2$ en aire, ocurre el fenómeno de rompimiento dieléctrico, caracterizado por la generación de plasma en la zona de interacción. Pulsos láser con duración entre 100 fs y 500 ps se traducen en intensidades altas del campo eléctrico \vec{E} que producen efectos ópticos no lineales en medios transparentes, como ionización multifotón. Estos efectos ópticos no lineales hacen posible la ablación en tejidos transparentes, donde el coeficiente de absorción lineal es muy pequeño. Además, para pulsos con duración de fs a ps, se eliminan daños térmicos colaterales, ya que la duración del pulso es menor al tiempo de relajación electrónica del material.
5. **Fotodisrupción.** Mientras que los efectos físicos asociados a la ablación por plasma se deben a la generación de ondas de choque y al plasma, para el mismo caso de fotodisrupción se añade el fenómeno de cavitación. En la fotodisrupción, en el caso de tejido, éste sufre una división/separación en su estructura por fuerzas mecánicas; mientras que en la ablación inducida por plasma es espacialmente confinada a la región de rompimiento dieléctrico. Los efectos de cavitación en la fotodisrupción al propagarse dentro del tejido adyacente limitan la localizabilidad de la zona de interacción.

En general, la fotodisrupción es considerada como un efecto mecánico multi-causa que inicia desde el rompimiento dieléctrico. La formación del plasma inicia durante el inicio del pulso láser y hasta por unos pocos nanosegundos. Una vez que se superó la densidad crítica de plasma y aproximadamente 3-5 ns después del inicio del pulso, se genera una onda de choque por fuerzas repulsivas de Coulomb contenidas dentro del plasma, para luego propagarse dentro del tejido adyacente dejando el volumen focal. Finalmente, el fenómeno de cavitación (generación de burbujas de cavitación) ocurre alrededor de 50 - 150 ns después del término del pulso láser.

Las burbujas de cavitación desarrollan algunas oscilaciones de expansión y de colapso contenidas dentro de un periodo de algunos cientos de microsegundos. Ya

que la presión interior de la burbuja aumenta durante el colapso, en cada colapso de la burbuja de cavitación se emite una nueva onda de choque. Además, durante cada colapso de la burbuja se induce la formación de un chorro de vapor.

En la tabla 4 se resumen los mecanismos de interacción láser-tejido, indicando las principales aplicaciones en el ámbito de la medicina.

Tabla 4: Mecanismos de interacción láser-tejido y sus aplicaciones en la medicina (Markolf H. Niemz, 2007).

Mecanismo de interacción	Láseres típicos	Duración del pulso típico	Densidad de potencia típicas	Idea principal	Aplicaciones
Fotoquímica	Diodo láser y láser de colorante rojo	1s ... CW	0.01 ... 50 W/cm ²	Uso de un fotosensibilizante que actúa como catalizador	Bioestimulación y terapia fotodinámica
Térmica	CO ₂ , Nd:YAG, Er:YAG, Ho:YAG y diodo láser	1 μs ... 1 min	10 ... 10 ⁶ W/cm ²	Alcanzar una cierta temperatura la cual traerá un efecto térmico deseado	Coagulación, vaporización, derretimiento, descomposición térmica, tratamiento del desprendimiento de retina y termoterapia intersticial láser
Fotoablación	Láseres excimer: ArF, KrF, XeCl y XeF	10 ... 100 ns	10 ⁷ ... 10 ¹⁰ W/cm ²	Rompimiento directo de enlaces moleculares por fotones UV de alta energía	Cirugía corneal refractiva
Ablación inducida por plasma	Nd:YAG, Nd:YLF y Ti:Zafiro	100 fs ... 500 ps	10 ¹¹ ... 10 ¹³ W/cm ²	Ablación por formación de plasma	Cirugía corneal refractiva y terapia de caries
Fotodisrupción	Nd:YAG, Nd:YLF y Ti:Zafiro	100 fs ... 100 ns	10 ¹¹ ... 10 ¹⁶ W/cm ²	Fragmentación y corte de tejido por fuerzas mecánicas	Fragmentación de cristalino y litotricia

2.4. Cavitación inducida por láser

El fenómeno de cavitación se define como el proceso de cambio de fase (nucleación) a través del cual se generan burbujas de vapor inicialmente en un medio líquido homogéneo. Existen dos caminos para realizar un cambio de fase líquido a vapor y desencadenar la nucleación, disminuyendo la presión; que conlleva a superar la fuerza de atracción intermolecular, o aumentando la temperatura; promoviendo la transferencia de energía del haz láser a la red molecular hasta vencer la tensión superficial (Ver Fig. 7). Algunos autores definen la cavitación al cambio de fase por disminución de la presión a temperatura constante, mientras que la termocavitación al aumento de la temperatura. En general, ambos procesos conllevan a la nucleación, solo los mecanismos de inicialización son la principal diferencia.

Existen diversos mecanismos que sirven para la generación de cavitación: (i) *hidrodinámicos*, (ii) *acústicos*, (iii) *de partícula* y (iv) *óptica*, siendo esta última la producida con haces láser de alta intensidad/potencia enfocados en el líquido. La cavitación óptica, el rompimiento dieléctrico inducido o el aumento directo en la temperatura por una fuerte absorción lineal del medio, son los mecanismos de iniciación para la nucleación. La termocavitación inducida por láseres en modo CW (Ramirez-San-Juan et al., 2010) fue primero reportada por Rastopov y Sukhodolsky en 1992 (Padilla-Martinez et al., 2014), demostrando su simplicidad experimental y bajo costo en comparación con la cavitación implementada con láseres pulsados. El mecanismo físico de termocavitación en CW es la creación de una región de súpercalentamiento ($\sim 300^\circ\text{C}$) en el punto focal, seguido de una transición de fase líquido-vapor. El coeficiente de absorción lineal a la longitud de onda del láser y la potencia del láser juegan un rol importante para alcanzar el límite del calentamiento del agua (supercalentamiento del vapor) determinado por la línea espinodal del agua.

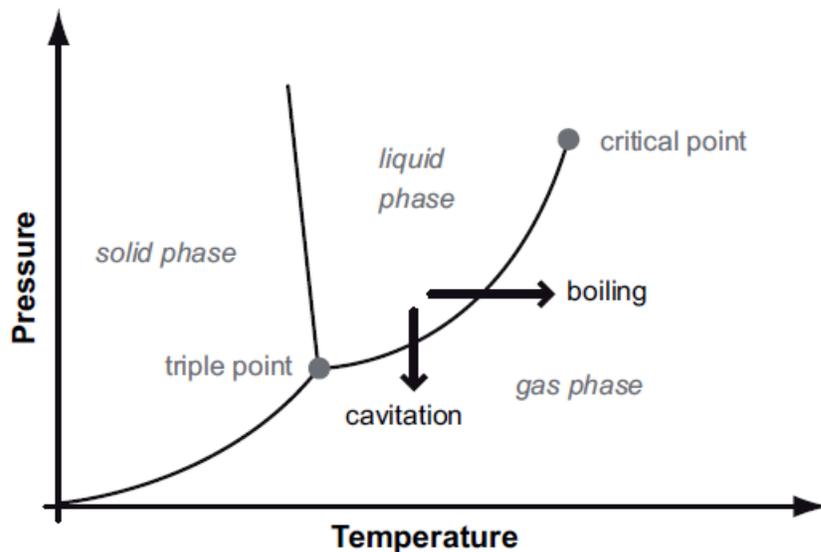


Figura 7: Diagrama de fase del agua. La termocavitación es el cambio de fase de líquido a gas incrementando la temperatura, mientras que la cavitación es el cambio de fase por disminución de la presión.

Cuando se enfoca en un volumen pequeño un haz láser en modo pulsado, la intensidad del campo eléctrico incidente llega a ser mayor que la fuerza de enlace de los electrones a su núcleo, desencadenando la ionización de los átomos por procesos no lineales como: ionización multifotón y cascada, y generando una densidad de plasma; el cual es independiente de la absorción lineal del medio como se mencionó en la Sec. 2.3. Durante

la ionización hay un incremento en la densidad del plasma y éste llega a ser opaco al haz láser conduciendo a una mayor absorción de la energía y a un aumento abrupto en la temperatura local (10^4 °K, (Kennedy, 1997)). La alta temperatura (alcanzando el supercalentamiento) dentro del volumen de la zona focal, debida a la densidad de plasma generado (típicamente de $10^{18} - 10^{20} e/cm^{-3}$), produce una onda de choque, luminiscencia y una burbuja de cavitación (Ver Fig. 8). En este contexto, surgen tres campos de estudio una vez que se supera la densidad crítica del plasma y se desencadena el fenómeno de cavitación: (i) umbral de intensidad para el rompimiento dieléctrico, (ii) características y evolución del plasma resultante y (iii) fenómenos de cavitación y ondas de choque.

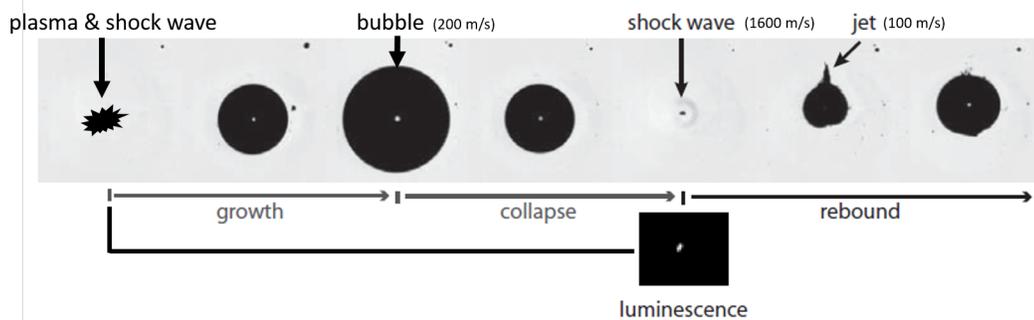


Figura 8: Esquema de la serie de eventos que se desencadenan por el rompimiento dieléctrico una vez que se supera más allá del umbral de formación del plasma ($10^{18} - 10^{20} cm^{-3}$). Figura tomada de (Tinguely, 2013).

2.4.1. Rompimiento dieléctrico óptico en líquidos

El rompimiento dieléctrico es la ionización parcial o completa de un sólido, líquido o gas a través de absorción térmica o energía electromagnética. La ionización resulta en un 'gas' de partículas cargadas (plasma), el cual constituye el cuarto estado de la materia. El término de rompimiento dieléctrico óptico se refiere a la producción de una densidad crítica de plasma tal que se inicia la absorción de la luz del haz láser por el plasma. El plasma inducido por láseres pulsados de corta duración, dentro del régimen de microsegundos a femtosegundos, donde el tiempo de interacción del haz láser pulsado con el material no permite el rompimiento dieléctrico por absorción lineal o calentamiento directo, es generado por las altas irradiancias características de los pulsos cortos, es decir, el plasma se produce a través de la ionización multifotón y/o cascada.

2.4.1.1. Ionización multifotón

Si consideramos un medio transparente al que se le hace incidir un haz láser monocromático de frecuencia w_1 , la energía de un fotón $\hbar w_1$ absorbida por un electrón no será la suficiente para promoverlo de su estado base E_v al de conducción E_c . Sin embargo, si se utiliza una fuente láser en modo pulsado, donde en tiempos muy cortos se emiten una gran cantidad de fotones, el electrón absorberá múltiples fotones $N\hbar w_1$ que conducirán a promover al electrón de su estado base E_v a estados virtuales de energía superior a E_v y eventualmente poder alcanzar el estado excitado E_c . Si existe una gran cantidad de fotones, es posible que la energía absorbida de los fotones por el electrón sobrepase el potencial de ionización E_i y el electrón quede libre del átomo que lo unía (Ver Fig. 9).

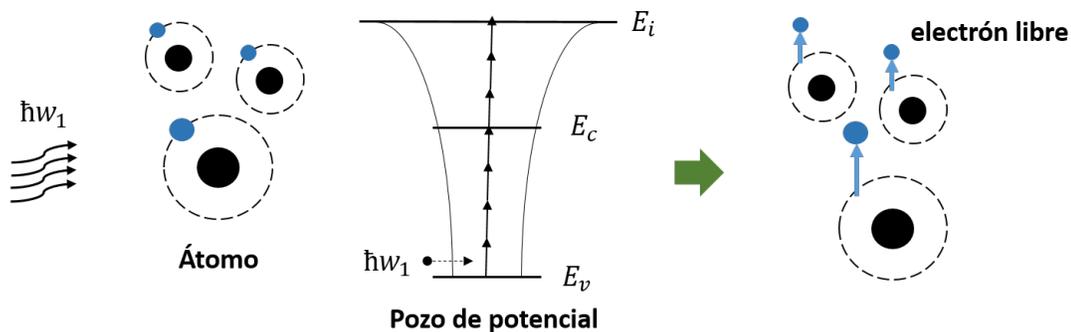


Figura 9: Ionización multifotón: El electrón en la banda de valencia E_v es ionizado por absorción multifotón.

En el proceso de ionización multifotón no se requieren electrones semilla ni colisiones entre electrones y átomos, ya que los electrones en la banda de valencia son ionizados únicamente por absorción de múltiples fotones en tiempos menores al tiempo libre medio entre colisiones, por lo que bajo la utilización de láseres con duración del pulso del orden de femtosegundos, se observará la ionización del medio debida solamente a efectos de ionización multifotón.

2.4.1.2. Ionización en cascada

La ionización en cascada requiere de electrones semilla generados ya sea por la ionización multifotón o por la presencia de impurezas en el medio. Si el medio está libre de

impurezas, la ionización multifotón será el mecanismo responsable de producir los electrones semilla.

Para pulsos láser de corta y larga duración (de algunos picosegundos a nanosegundos) enfocados sobre un medio libre de impurezas se desencadenan los siguientes procesos: (1) durante los primeros femtosegundos del pulso se generan los electrones semilla por ionización multifotón, (2) los electrones semilla sujetos al campo eléctrico intenso \vec{E} del haz láser son acelerados, (3) los electrones semilla acelerados colisionan con átomos vecinos de tal forma que dada la energía cinética del electrón acelerado se produce otro electrón libre por impacto y (4) los electrones liberados que aún están sujetos al campo eléctrico del haz láser son también acelerados y generan nuevos electrones ionizados por impacto, por lo que se produce un crecimiento rápido de electrones libres, también llamado ionización en cascada (Ver Fig. 10).

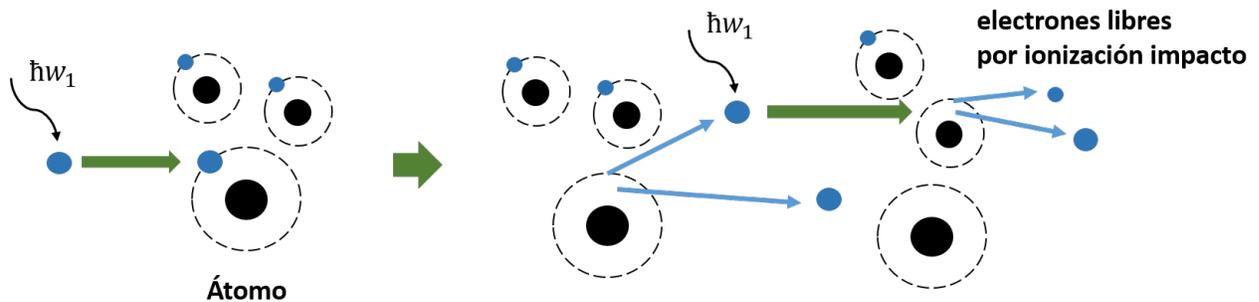


Figura 10: Ionización cascada: Los electrones semilla absorben energía y colisionan con átomos vecinos, para luego producir un efecto de ionización en cascada.

Cuando se trata de un medio con impurezas, los electrones semilla debidos a la impurezas y los generados por ionización multifotón coexisten, por lo que se alcanza una mayor densidad de electrones debido a la contribución de la ionización en cascada por los electrones semilla de las impurezas más los generados por la ionización multifotón (Ver Fig. 11).

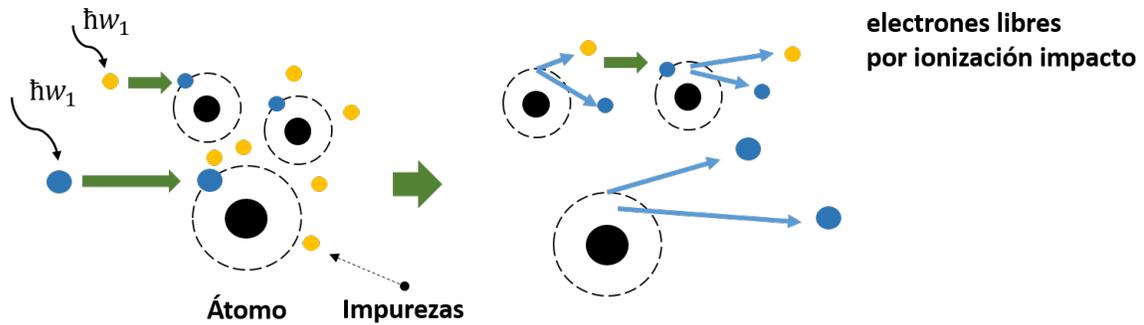


Figura 11: Ionización cascada con impurezas: Los electrones semilla y las impurezas absorben energía y colisionan con átomos vecinos.

2.4.2. Burbujas de cavitación y partición de la energía

La dinámica de la burbuja de cavitación es un proceso oscilatorio de crecimiento, colapso y múltiples repeticiones de este ciclo, hasta eventualmente disiparse la energía contenida en la burbuja. Durante el inicio de un evento de cavitación y en el colapso, se generan otros fenómenos como ondas de choque y luminescencia, así como la expulsión de un chorro de vapor después de su primer colapso.

En lo que se refiere a sólo la dinámica de las burbujas de cavitación, Lord Rayleigh fue el primero que en 1917 modeló el colapso de las burbujas de cavitación con el movimiento de una cavidad esférica vacía en un volumen infinito de agua. La ecuación de la dinámica de la burbuja de cavitación, conocida como la ecuación de Rayleigh, asume que el movimiento es simétricamente esférico, que la burbuja está vacía e inmersa en un volumen infinito de agua, que el agua es incompresible e irrotacional, y que la gravedad, la tensión superficial, la viscosidad y la transferencia de calor son despreciables.

En 1954, la ecuación de Rayleigh es adaptada por Plesset como un modelo más general sobre la evolución esférica de la burbuja en un líquido viscoso e incompresible. Las principales suposiciones son: (a) la gravedad es despreciada, (b) el contenido de aire dentro de la burbuja es constante y no hay transferencia de calor hacia los alrededores (paredes adiabática), (c) la burbuja está constituida de vapor, cuya presión parcial es la presión de vapor a la temperatura del líquido.

La ecuación resultante es conocida como la ecuación de Rayleigh-Plesset, la cual establece la relación del radio de la burbuja con la presión dentro y fuera de la burbuja como

función del tiempo:

$$\rho \left[R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \right] = p_v - p_\infty + p_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3\gamma} - \frac{2S}{R} - 4\mu \frac{\dot{R}}{R}, \quad (2)$$

donde R es el radio de la cavidad esférica como función del tiempo, ρ la densidad del agua, p_v presión de vapor dentro de la burbuja, p_∞ es la presión en el agua, p_{g0} la presión parcial inicial del gas no condensando dentro de la burbuja, R_0 el radio inicial de la burbuja, γ es el índice adiabático del gas no condensable dentro de la burbuja, S la tensión superficial del agua y μ la viscosidad cinemática del agua.

Después del rompimiento dieléctrico, la burbuja de cavitación empieza su crecimiento debido a la expansión volumétrica del gas de vapor que ejerce una presión mayor que la del exterior (medio líquido). Durante el crecimiento de la burbuja la temperatura interna va disminuyendo al ir aumentando el volumen de la cavidad y la presión del vapor alcanza un equilibrio con la presión externa ejercida, definiendo el radio máximo R_{max} que la burbuja alcanzará. Una vez que alcanza su radio máximo, comienza la etapa de colapso, en la que inicia la disminución volumétrica de la cavidad y aumenta la presión dentro de la misma, lo que produce un recalentamiento del vapor. El punto mínimo de compresión volumétrica alcanza de nuevo altas temperaturas lanzando una segunda burbuja, de menor energía, que nuevamente presenta una expansión y colapso, repitiéndose el ciclo anterior hasta eventualmente disiparse la energía contenida dentro de la burbuja.

De la relación de Rayleigh-Plesset (Ec. 2) es posible conocer el primer tiempo de colapso de la burbuja de cavitación a través de la siguiente ecuación (Vogel, 1996):

$$\tau_c = 0.915 R_{max} \left(\frac{\rho}{p_\infty} \right)^{1/2}. \quad (3)$$

donde τ_c es el primer tiempo de colapso de la burbuja y R_{max} el radio máximo que alcanza la burbuja. De la ecuación 3 se puede ver que si se conoce de antemano el radio máximo y el instante en que sucede el primer tiempo de colapso de la burbuja, además, de la densidad del medio, es posible determinar la presión externa ejercida sobre la burbuja de cavitación. También se verifica que el tiempo de colapso es inversamente proporcional a

la presión externa ejercida, ya que al haber una mayor fuerza que se opone a la expansión de la burbuja, el tiempo para que se alcance el equilibrio de la presión del vapor con la presión externa se reduce, provocando que el radio máximo alcanzado sea menor y reduciendo el tiempo de colapso.

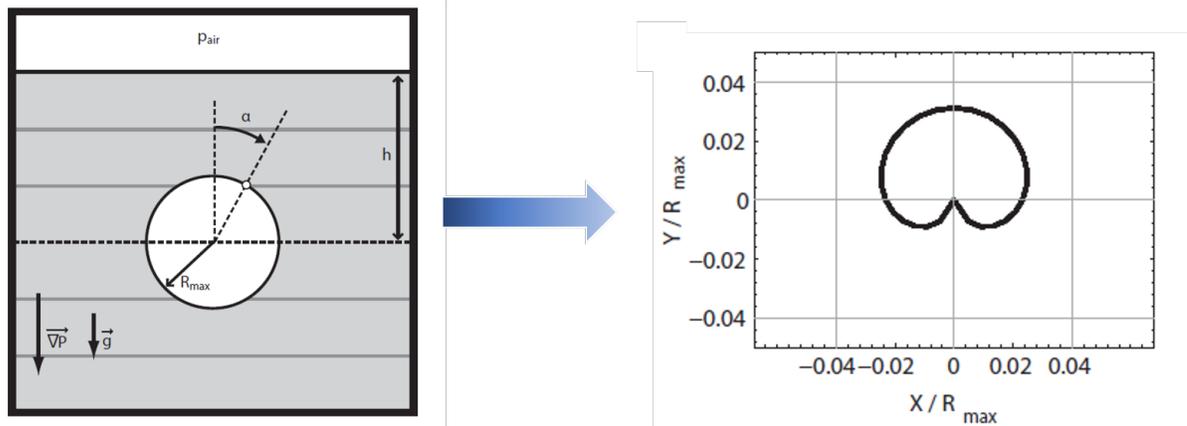


Figura 12: Esquema de una burbuja de cavitación en su primer tiempo de colapso y su rompimiento de simetría debido a la presión hidrostática (Tinguely, 2013).

Por otro lado, durante el colapso de la burbuja de cavitación puede ocurrir un rompimiento en la simetría esférica, el cual puede deberse a la cercanía a una superficie sólida o a los efectos de presión hidrostática local sobre la superficie de la burbuja de cavitación (Brennen, 2016). En la izquierda de la figura 12, se observa la burbuja de cavitación en el instante del primer tiempo de colapso τ_c , donde a lo largo de la superficie de la burbuja se ejerce una presión debida a la presión hidrostática del agua más la presión de la columna de aire dada por:

$$p_{\infty}(\alpha) = p_{\infty,c} - \rho g R_{max} \cos(\alpha), \quad (4)$$

De la Ec. 4 se puede ver que la presión que se ejerce sobre la superficie de la burbuja es máxima en la dirección contraria de la fuerza de gravedad y mínima cuando es perpendicular a esta (Ver Fig. 12).

La presión al centro de la burbuja es la debida a la columna de aire más la presión hidrostática a la profundidad h a la que se encuentra la burbuja en este punto, escribiéndose

de la siguiente forma:

$$p_{\infty,c} = p_{air} + \rho gh, \quad (5)$$

Por último, la presión al fondo de la burbuja es el acumulado de la presión que se ejerce al centro de la burbuja más la presión hidrostática del centro al fondo de la burbuja definida por la distancia R_{max} :

$$p_{bottom} = p_{\infty,c} + \rho g R_{max}. \quad (6)$$

De las ecuaciones 4 y 6 se puede observar que la presión hidrostática que se ejerce sobre la superficie de la burbuja de cavitación es menor que la presión que empuja del fondo hacia la superficie, por lo que al no haber una igualdad de fuerzas, principalmente la debido a la fuerza que se ejerce en el fondo de la burbuja, se rompe la simetría esférica de la misma. De las simulaciones realizadas por (Tinguly, 2013) se puede ver cómo al aumentar en un factor de 2X en la fuerza de gravedad, es más notorio la deformación al fondo de la burbuja en el primer tiempo de colapso (Ver Fig. 12:derecha).

El rompimiento de la simetría en la burbuja de cavitación ha cobrado importancia debido a que se genera un chorro de vapor que viaja a velocidades de aproximadamente 100 m/s (Tinguly, 2013), siendo también una de las causas en el deterioro de las propelas de los barcos.

2.4.2.1. Partición de la energía

Cuando se trata de la utilización y depósito de energía de un haz láser pulsado enfocado en un medio líquido, una porción de la energía E_p del pulso es transferida a los siguientes procesos: rompimiento dieléctrico, cambio de fase y energía cinética, siendo los dos últimos los que consumen mayor energía del pulso para desencadenar la creación de: ondas de choque y burbujas de cavitación. Por ejemplo, la energía contenida dentro de la primer burbuja en el momento de su primer tiempo de colapso, esta dada por (Vogel, 1996):

$$E_B = \frac{4}{3}\pi\rho R_{max}^5 \left(\frac{0.915}{\tau_c}\right)^2, \quad (7)$$

donde E_B es la energía contenida en la burbuja. De la Ec. 3 y 7 se puede obtener otra expresión del primer tiempo colapso en función de la energía de la burbuja, la presión externa ejercida y la densidad del medio:

$$\tau_c = \left(\frac{3E_B}{4\pi}\right)^{1/3} \frac{0.915\sqrt{\rho}}{p_\infty^{5/6}}. \quad (8)$$

Mientras la energía mecánica por ondas de choque depende directamente de la energía del pulso que se utiliza para ionizar el medio y alcanzar cierta densidad de plasma, la energía de evaporación es la energía del pulso que se transfiere al plasma o a la red molecular para evaporar el medio circundante. La energía del pulso que luego es transferida a la burbuja de cavitación, es la que resulte después de haber ionizado los átomos y evaporado el medio.

Para pulsos de corta duración (femtosegundos a picosegundos con energías del orden de algunos μJ) la energía del pulso es convertida en proporciones similares a energía de la burbuja y ondas choque ($\approx 8.9 - 9.4\%$ cada uno), pero para pulsos de larga duración (nanosegundos con energías del orden de algunos mJ), la conversión a ondas de choque ($\approx 42\%$) aumenta a casi el doble de la energía transferida a la burbuja ($\approx 25\%$) (Hammer et al., 1998). Por otro lado, la conversión a energía de evaporación es menor para pulsos de larga duración y aumenta al disminuir la duración del pulso (Ver tabla 5).

Tabla 5: Conversión de la energía del pulso a energía mecánica y de vapor (Vogel, 1996).

	30 ps (50 μJ)	30 ps (1 mJ)	6 ns (1 mJ)	6 ns (10 mJ)
Conversión de energía del pulso E_p a energía mecánica ($E_s + E_B$) [%]	18.2	42.5	50.6	72.4
Conversión de energía del pulso E_p a energía de evaporación (E_v) [%]	13.4	19.2	6.3	5.5

El hecho de por qué para pulsos de corta duración (ps) aumente la conversión a energía de evaporación, es debida a que en éste regimen de pulsos sólo se esta promoviendo

el fenómeno de ionización multifotón que contribuye a la generación de una cantidad menor de densidad del plasma durante la transición del pulso comparada con pulsos del orden de nanosegundos, donde se generan electrones libres por ionización multifotón y cascada. La densidad de electrones libres que se van generando durante la transición del pulso absorben energía del pulso y disipan una fracción de la energía en calor ya sea por colisión entre electrones, con la red molecular, entre otros, promoviendo así un aumento local de la temperatura. Por lo tanto, una menor densidad del plasma resultante requerirá absorber una mayor cantidad de energía del pulso para aumentar la temperatura local del medio y alcanzar la termocavitación. Además, si la densidad del plasma que se genera es geoméricamente irregular (Ver Fig. 13:c-f), la evaporación del medio se realizará de una manera menos eficaz, requiriendo más energía del pulso para evaporar el medio. Por otro lado, para pulsos de larga duración (ns), se tiene una mayor densidad de plasma debida a los procesos de ionización multifotón y cascada que contribuye a una mayor absorción de la energía del pulso para luego ser transferida para evaporar el medio, además existen otros factores que ayudan a evaporar el medio como el fenómeno de autoenfocamiento y geometría del plasma homogéneo (Ver Fig. 13:a-b), por lo que al final se requiere de una menor energía del pulso para evaporar el medio y entonces mayor energía disponible para ser transferida a energía mecánica.

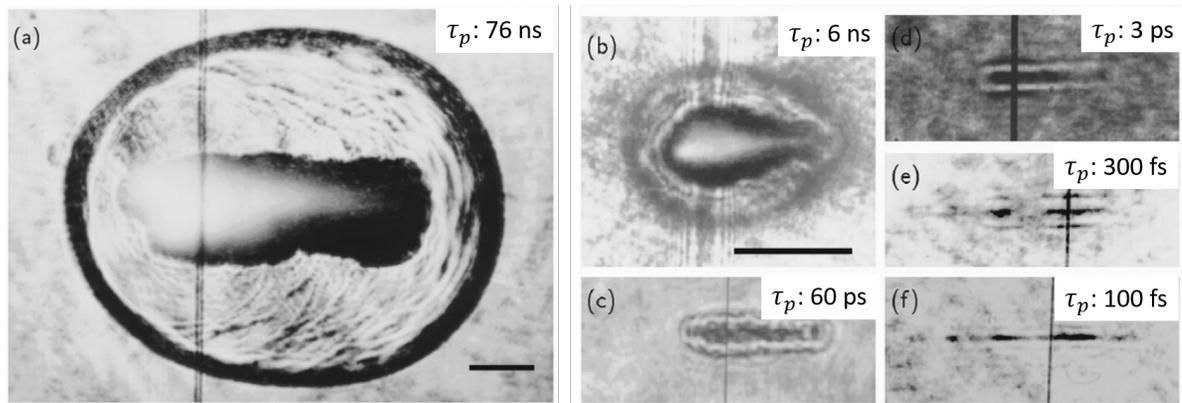


Figura 13: Rompimiento dieléctrico inducido por láser en agua a distintas duraciones del pulso. Las zonas oscuras muestran en el centro la formación del plasma y en la periferia se observan las ondas de choque y las burbujas de cavitación; la dirección del haz láser en todas las imágenes va en sentido de izquierda a derecha y la zona de enfoque del haz se genera después de la línea vertical (Hammer et al., 1998).

Capítulo 3. Metodología

En este capítulo se describirán brevemente las técnicas principales que permiten un estudio resuelto en el tiempo y espacio para la dinámica de las burbujas de cavitación, indicando sus principales ventajas y desventajas para los propósitos del trabajo de ésta tesis, además de resaltar la importancia de utilizar la técnica de la Modulación de la Transmitancia Espacial para obtener con precisión el instante en que ocurre el 1er. tiempo de colapso de la burbuja de cavitación. Posteriormente, se describirán las condiciones bajo las cuales se indujo cavitación en cubetas cuarzo o plástico con HA y en ojos de cerdo *ex-vivo*, así también se describirán las condiciones de adquisición de las señales típicas STM. Al final del capítulo se especifica la metodología que se siguió para el análisis de fotodaño por el haz de bombeo en córneas de cerdo *ex-vivo*, vía pruebas histológicas, así como del protocolo para la manipulación y preservación de los ojos de cerdo que se utilizaron durante la realización del presente trabajo de tesis.

3.1. Descripción de las técnicas para la caracterización de la cavitación láser: importancia de la técnica STM

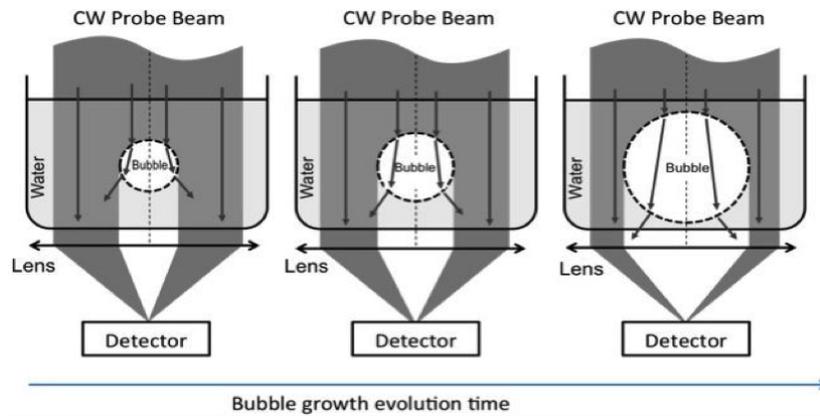
Una vez que se inicia el mecanismo de rompimiento dieléctrico inducido por láser, se desencadenan una serie de fenómenos los cuales pueden ser catalogados en tres áreas para su estudio teórico y/o experimental: (i) el umbral de irradiancia para lograr el rompimiento dieléctrico, (ii) las características y evolución temporal del plasma resultante y (iii) los fenómenos de creación de la burbuja de cavitación y la emisión de la onda de choque.

En lo que corresponde al presente trabajo de tesis, gran parte del desarrollo experimental que se realizó está enfocado sólo en el estudio del fenómeno de cavitación en ojos de cerdo *ex-vivo*, ya que da continuidad a una serie de trabajos anteriormente realizados, donde la primera etapa consistió en un análisis teórico-experimental del umbral de formación de plasma (Evans and Camacho-López, 2010) y la generación de burbujas de cavitación y ondas de choque, sobre una muestra de gel agar (Evans et al., 2008), posteriormente se pasó a un estudio numérico-experimental de la dinámica del fenómeno de cavitación en líquidos presurizados (Devia-Cruz et al., 2012, 2013), y finalmente se realizó un estudio

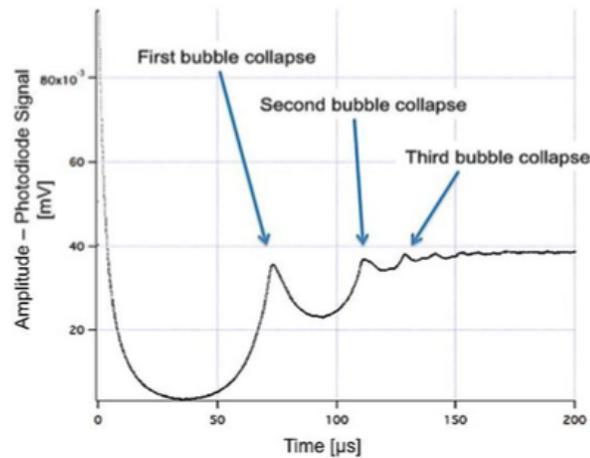
experimental sobre el fenómeno de cavitación en una cavidad ocular artificial presurizada de uso oftálmico (Martínez, 2015).

Como se mencionó anteriormente en la sección 2.4, mediante la relación de Rayleigh-Plesset derivando en la ecuación 3, es posible determinar la presión p_0 a la que se encuentra sometida un líquido, si se conocen de antemano el primer tiempo de colapso τ_c de la burbuja de cavitación, el radio máximo que alcanza R_{max} y la densidad del medio ρ . Por otro lado, el fenómeno de formación y evolución de las ondas de choque y burbujas de cavitación ocurre desde unas decenas de nanosegundos una vez que se dispara el pulso de bombeo y se extiende hasta unos cientos de microsegundos (considerando múltiples colapsos de la burbuja de cavitación), y una vez que la energía depositada fue la necesaria para ser transferida al medio y desencadenar los procesos de ruptura dieléctrica (Evans and Camacho-López, 2010; Devia-Cruz et al., 2013). En este sentido, existen diversas técnicas que han sido ampliamente utilizadas para el estudio espacial y temporal de las burbujas de cavitación, entre las que destacan: *i*) Hidrófono óptico (Ramirez-San-Juan et al., 2010), *ii*) Laser Shadowgraphy (Padilla-Martinez et al., 2014; Schaffer et al., 2002), *iii*) Fotografía de alta velocidad y *iv*) Modulación de la transmitancia espacial (*STM*, por sus siglas en inglés) (Devia-Cruz et al., 2013). Para el caso del hidrófono óptico, éste sólo permite detectar zonas de alta presión frente a la pared de la burbuja, lo cual no siempre ocurre en correspondencia a su radio máximo y en consecuencia no da un seguimiento preciso de los tiempos de colapso; además, desde un punto de vista clínico, ésta sería una técnica invasiva pues requerirá de introducir el sensor de fibra óptica a la cámara anterior del globo ocular. La técnica de Shadowgraphy proporciona información de la dinámica temporal y espacial de las ondas de choque y las burbujas de cavitación, por ejemplo, se puede conocer la velocidad a la que se propagan las ondas de choque y la burbuja de cavitación; se ha reportado que éstas viajan a una velocidad de alrededor de 1600 y 200 m/s, respectivamente, y que ésta velocidad se mantiene sobre un valor promedio cuando el medio líquido (agua destilada) es sometido a diferentes presiones: 0 - 750 mmHg (Devia-Cruz et al., 2012). Sin embargo, la principal limitación es que se usa un haz pulsado como flash de iluminación, por lo que se requiere de un gran número de pulsos (bombeo y de prueba) para poder recrear el evento de cavitación de principio a fin. Por otro lado, cada pulso de bombeo genera una nueva burbuja, por lo tanto, la recreación del evento de cavitación está basado en múltiples burbujas las cuales están

sujetas a las fluctuaciones de energía pulso a pulso. Esto afecta la exactitud y precisión en el comportamiento de la burbuja obtenido mediante ésta recreación (Ver Ec. 3).



(a) .



(b) .

Figura 14: (a) Modulación Espacial de la Transmitancia (STM) debido al crecimiento de la burbuja de cavitación y (b) Señal eléctrica típica de la técnica STM, donde se registra el crecimiento/colpaso de la burbuja de cavitación generada con un solo disparo del haz de bombeo (Devia-Cruz et al., 2012).

Con la fotografía de alta velocidad, actualmente se reportan del orden de 250 000 fps, se puede obtener información sobre la evolución espacial y temporal tanto de las ondas de choque como de las burbujas de cavitación, pero no es posible determinar con precisión el tiempo de colapso de la burbuja, ya que esta ocurre en un intervalo de unos cuantos microsegundos que no puede ser resuelta durante la captura entre cada cuadro. Para resolver esta problemática, (Devia-Cruz et al., 2012) propuso la técnica STM basada en el cambio de la transmisión óptica de un haz de prueba en un sistema bombeo-prueba que consiste de dos haces. El haz de bombeo es pulsado (Nd:YAG, $\lambda = 532 \text{ nm}$, Minilite II) y el de prueba es continuo (He-Ne, $\lambda = 633 \text{ nm}$). El haz de bombeo proporciona un pulso que

es enfocado dentro del medio para inducir el fenómeno de cavitación; el haz de prueba se propaga de forma colineal al bombeo y pasa a través de la burbuja de cavitación, la cual actúa como una lente negativa u obstáculo, causando que una cantidad de la luz proveniente del haz de prueba se refracte y/o retrorefleje. La luz transmitida se colecta con una lente y con ayuda de un fotodetector, se despliega ésta señal en un osciloscopio (Ver Fig. 14:a). Así, a medida que aumenta el tamaño de la burbuja (obstáculo) disminuye la cantidad de luz que llega al fotodetector hasta alcanzar un valor mínimo que corresponde el radio máximo de la burbuja, posteriormente la burbuja comenzará a colapsar disminuyendo su tamaño y aumentando la cantidad de luz que llega al fotodetector, éste proceso se repite varias veces hasta eventualmente disiparse la energía contenida en la burbuja. El tiempo de respuesta (t_r) del fotodetector (DET10A, Thorlabs) del orden de 1 ns y la frecuencia de muestreo del osciloscopio (DPO4000, Tektronix) de 1 GHz, permiten registrar trazas de alta resolución temporal sobre la dinámica de la burbuja de cavitación, logrando así disminuir la incertidumbre sobre el tiempo de colapso (Ver Fig. 14:b). Además, con esta configuración se puede realizar un estudio resuelto en el tiempo para una burbuja de cavitación generada con un solo pulso del haz de bombeo.

3.2. Inducción de la cavitación láser en cubetas con HA

Previo a los experimentos de cavitación láser en HA de ojos de cerdo *ex-vivo*, se realizó la caracterización del haz de bombeo (Nd:YAG, $\lambda(2\omega) = 532$ nm) para conocer el parámetro de calidad del haz Gaussiano M^2 y el área de la sección transversal en la cintura del haz para dos lentes de longitudes focales de: 25.4 y 12 mm. Ambos parámetros fueron obtenidos mediante un sistema de Plano Equivalente al Blanco (PEB), el cual permite analizar en un plano imagen equivalente los perfiles de intensidad del plano de enfoque sobre el blanco (Ver Fig.15). Para evitar imágenes saturadas sobre el CCD, se colocaron filtros de densidad neutra (D.N.) en la cámara y se caracterizó el haz a la mínima energía por pulso de 400 μ J utilizando el sistema atenuador: placa $\lambda/2$ y cubo polarizador.

Una vez que se conoce el tamaño de la cintura del haz y la energía por pulso E_p del haz de bombeo, es posible determinar la fluencia (J/cm^2) con la que se formarán las burbujas de cavitación.

Es importante mencionar que primero se realizaron experimentos de cavitación láser con HA extraído de ojos de cerdo *ex-vivo*, porque no se tenían resultados previos con la técnica STM en éste medio, por lo que para simplificar las complicaciones debidas a la morfología y fisiología de la córnea e iris, principalmente, se optó por analizar la dinámica temporal de las burbujas de cavitación en HA dentro de cubetas de cuarzo y plástico.

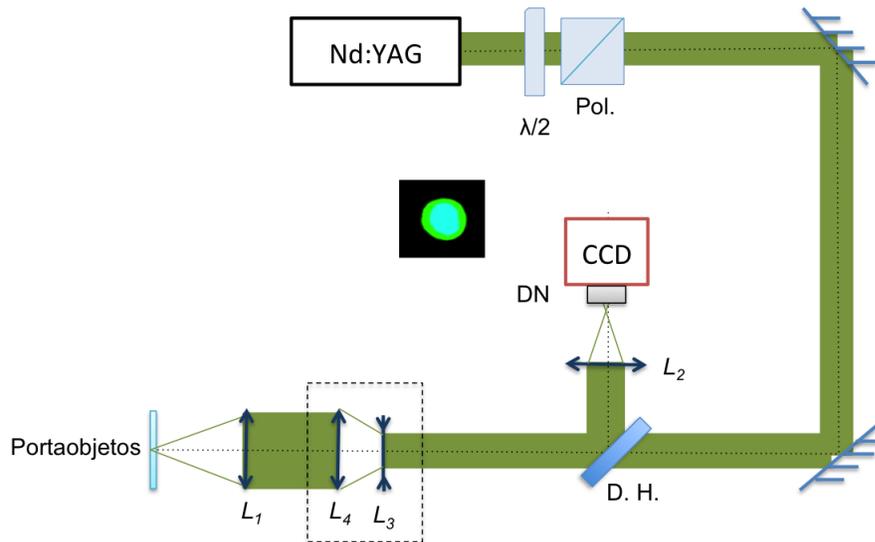


Figura 15: Arreglo experimental para la caracterización del haz de bombeo en un sistema de PEB.

El esquema de la técnica STM acoplada a la cubeta con HA bajo un sistema de presurización, se muestra en la Figura 16. El arreglo experimental para la inducción del fenómeno de cavitación consta de 2 etapas: 1) monitoreo de la energía del haz de bombeo mediante la calibración de la señal eléctrica que registra el fotodiodo-2 ($\tau_r \approx 6.2 \mu s$, DET10A modificado, Thorlabs) y la despliega en el osciloscopio (DPO4000, Tektronix), y 2) la etapa de generación de cavitación láser utilizando: (i) un sistema atenuador, (ii) un expansor del tipo Galileano; conformado por una lente negativa L_3 ($f = 30 \text{ mm}$) y una lente positiva L_4 ($f = 75 \text{ mm}$), para lograr un factor de amplificación $G = 2.5X$ sobre un diámetro aproximado del haz de bombeo de 4 mm ($FWHM$) a la entrada; esto con el fin de reducir el área del haz enfocado y en consecuencia aumentar la fluencia del haz de bombeo sin incrementar la energía por pulso, y finalmente, (iii) una lente positiva L_1 de distancia focal igual a 12 ó 25.4 mm.

La técnica STM se implementó alineando el haz de prueba de forma perpendicular al haz de bombeo, además se utilizaron filtros de DN y un filtro pasa altas (F_{PA}) con una longitud de onda de corte $\lambda_c : 600 \text{ nm}$, para evitar la saturación del fotodiodo y eliminar la señal

como el HA y en el rango de la presión externa aplicada equivalente a la PIO. Por otro lado, la señal típica de STM en el osciloscopio, para distintas energías de bombeo permite identificar el umbral de energía para el cual se obtiene con precisión el primer tiempo de colapso.

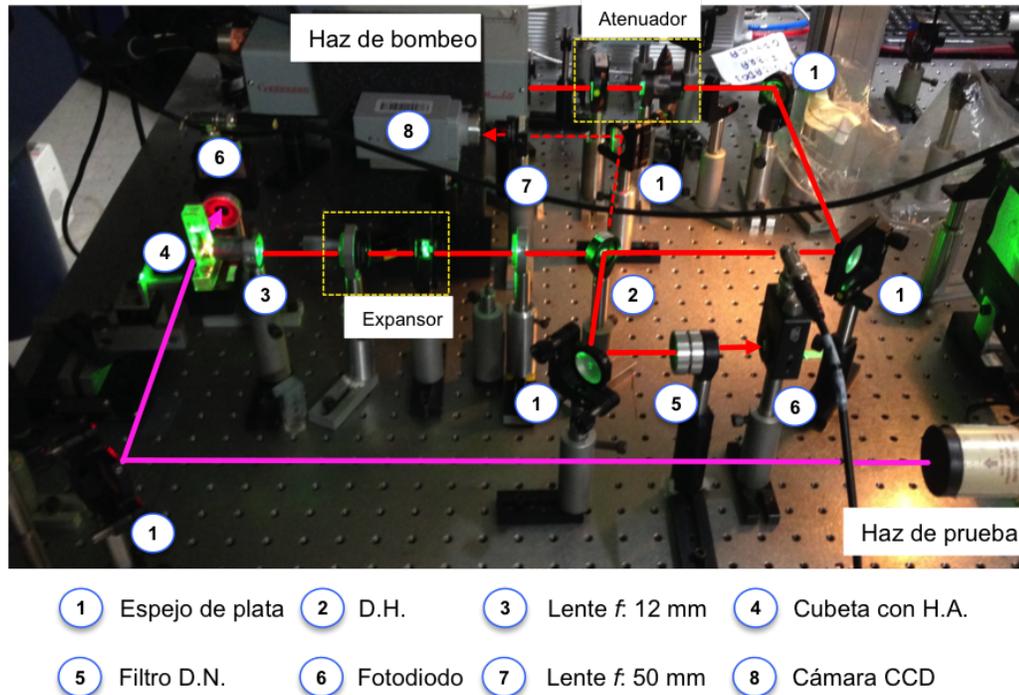


Figura 17: Arreglo experimental de la técnica STM para el estudio de cavitación en cubetas con HA.

Con la cubeta de plástico y HA se realizaron mediciones con E_p de: 1.25, 2.16, 3.25, 4.08 y 5.48 mJ, a una tasa de repetición de 1 Hz, utilizando la lente L_1 ($f = 12$ mm), tomando un promedio de 32 disparos del pulso de bombeo a una presión externa constante P de 7 mmHg. Posteriormente, se realizaron mediciones con la misma muestra y bajo las mismas condiciones de tasa de repetición y de promediado de la señal, pero ahora se utilizó E_p : 3.25, 4.08 y 5.48 mJ, para un rango de P de: 7 - 42 mmHg, en incrementos de 5 mmHg; recordando que la PIO de interés está entre 10 y 60 mmHg. La misma muestra de HA, tres días después de su colección, se le aplicó una energía E_p de 11.88 mJ, a una tasa de repetición de 10 Hz, utilizando la lente de 12 mm de distancia focal, tomando un promedio de 32 muestras por señal STM y variando P de 10 a 46 mmHg con incrementos de 2 mmHg (Ver Fig. 17).

Una segunda muestra de HA se colocó en una cubeta de cuarzo y se utilizó durante el mismo día de su colección, la energía mínima para inducir cavitación fue de 2.91 y 6.52

mJ durante el mismo día de su colección, a una tasa de repetición de 10 Hz, utilizando la lente de 12 mm de distancia focal y tomando un promedio de 32 disparos del pulso de bombeo y variando la presión externa de 10 a 40 mmHg con incrementos de 2 mmHg.

3.3. Inducción de la cavitación láser en ojos de cerdo *ex-vivo*

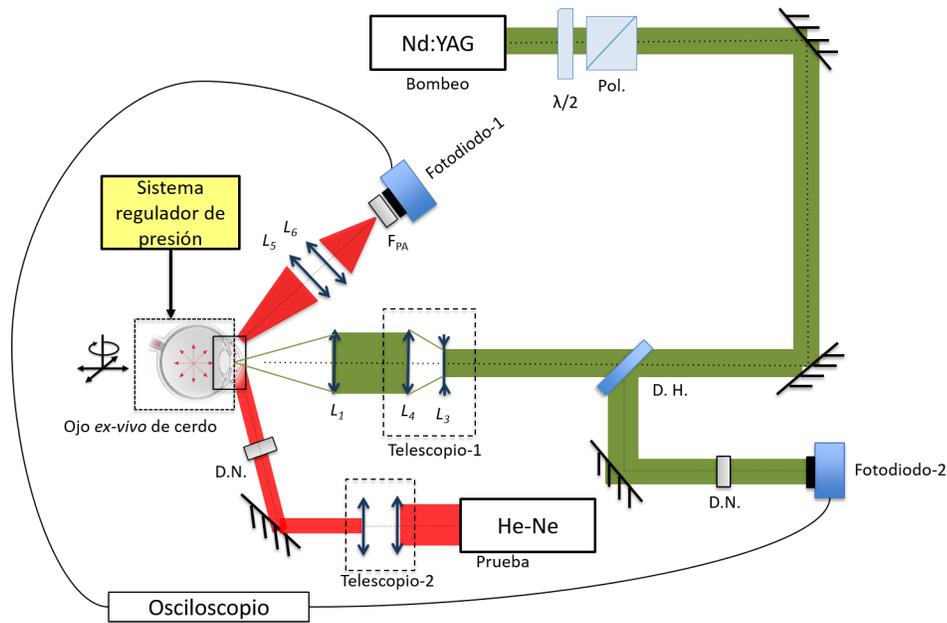


Figura 18: Arreglo óptico de la técnica STM en un ojo de cerdo *ex-vivo* presurizado.

El arreglo experimental utilizado para la implementación de la técnica STM en ojos de cerdo *ex-vivo* consta de la misma etapa que se utilizó para la generación de cavitación con HA en las cubetas de cuarzo o plástico (Ver. Fig. 16). Sin embargo, el haz de prueba se configura como se muestra en la figura 18. Esta nueva configuración consta de 3 nuevas secciones: (i) compresión del haz, (ii) ángulo de incidencia con respecto a la superficie corneal y (iii) colección del haz en el fotodiodo-1. Para la sección de compresión del haz, se utilizó un telescopio Kepleriano con un factor G de 0.4X, para obtener a la salida un diámetro aproximado del haz de 1.6 mm ($FWHM$). El ángulo de incidencia y la colección del haz de prueba dependen de la manera en la que se está irradiando el ojo con el haz de bombeo; para este trabajo esto se esquematiza en la Fig. 19. Como se muestra en la Fig. 19, el haz de bombeo se propaga a incidencia normal en la zona central de la córnea, mientras que el haz de prueba incide de manera oblicua con respecto a la superficie corneal y cerca de la zona donde incide el haz de bombeo. El iris se utiliza como superficie reflectora y se colecta el haz esparcido mediante un sistema de lentes

(L_5 y L_6 con longitudes focales de: 10 y 2.54 cm, respectivamente) que lo enfocan sobre el fotodiodo-1. La utilización de un espejo en el trayecto del haz de prueba permite ajustar la localización del haz de prueba en la zona donde se están generando las burbujas de cavitación dentro de la CA.

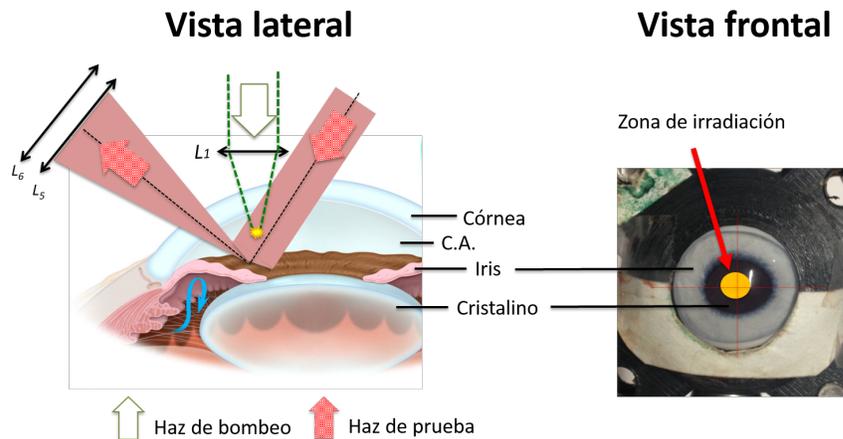


Figura 19: Adaptación de la técnica STM dentro de la CA en un ojo de cerdo *ex-vivo*. La zona de irradiación indicada en la vista frontal (círculo amarillo), corresponde tanto al haz de bombeo como al de prueba.

Por otro lado, cada ojo de cerdo fue colocado sobre un soporte de plástico donde queda expuesta sólo el área de la córnea y la zona del nervio óptico (Ver Fig. 20:A-B). En la Fig. 20:B, se observa la adaptación de la técnica STM en un ojo de cerdo; se tiene control sobre dos ejes $x - y$ y el ángulo de rotación θ . Para lograr un mayor control y precisión tanto en la zona como en la profundidad de irradiación, se utilizaron dos monturas de traslación y una de rotación. La montura que controla el movimiento en el eje x que da la profundidad de penetración del haz de bombeo, ofrece un paso mínimo de $10 \mu\text{m}$, mientras que la montura que controla el movimiento en el eje y , da un paso mínimo de $25 \mu\text{m}$.

Como se observa en la parte B de la figura 20, se utilizó una jeringa para atravesar el nervio óptico y llegar a la cámara posterior (C.P.) donde se encuentra el humor vitreo (HV). Una vez dentro de la C.P., éste se presuriza con aire gradualmente hasta alcanzar 10 mmHg . Según lo obtenido por (He et al., 2012) en experimentos con ojos de cerdo *ex-vivo*, al realizar una canulación al interior de la C.P. para inducir condiciones de glaucoma, los efectos de acomodación del iris, cristalino y córnea se traducen en que la presión ejercida dentro de la C.P. sea la misma que la que se mide dentro de la CA. Sin embargo, las dimensiones de las dos cámaras se modifican, ya que mientras en la C.P. existe un

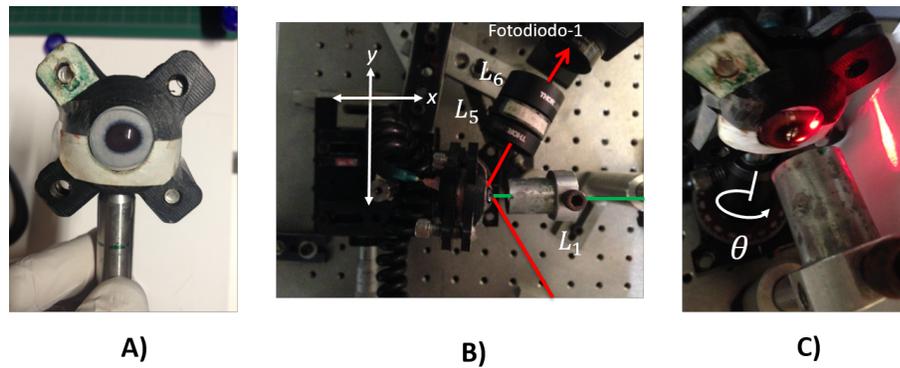


Figura 20: Condiciones de irradiación y presurización en un ojo de cerdo *ex-vivo* para inducir cavitación láser y monitorearlo mediante la técnica STM. (A) Pieza sujetadora para ojos de cerdo, (B) Adaptación de la técnica STM en ojos de cerdo y (C) Ejemplo de haz esparcido cuando el haz de prueba se refleja en el iris y atraviesa la córnea.

desplazamiento de alrededor de $170 \mu\text{m}$, en la CA hay una disminución de alrededor de $80 \mu\text{m}$ (PIO: 10- 26 mmHg).

Antes de iniciar con los experimentos de cavitación, es necesario identificar la ubicación de la cintura del haz de bombeo dentro de la CA, para esto se utilizó el sistema de PEB, así se ubica la superficie del epitelio corneal y a partir de esta superficie se puede ubicar la localización de la cintura del haz a lo largo del eje de propagación. Se corroboró que es necesario ubicar la cintura del haz de bombeo a $\sim 1 \text{ mm}$ por debajo de la superficie corneal para generar las burbujas de cavitación. 1 mm corresponde a lo que la literatura indica como la profundidad necesaria para atravesar el espesor corneal y estar dentro de la CA en ojos de cerdo de la especie *sus scrofa domestica* (Irene Sanchez et al., 2011).

Para ubicar la superficie corneal de los ojos de cerdo con respecto a la cintura del haz de bombeo, se puede analizar una imagen del perfil de intensidad del haz enfocado en la superficie de la córnea mediante el PEB (Ver Fig. 21). Al ubicar la superficie corneal a la distancia focal de la lente el haz reflejado se contrapropaga siguiendo exactamente el mismo camino óptico de incidencia y al pasar por la lente será colimado y será enfocado por la segunda lente en el plano de la cámara CCD (Ver Fig. 21:B). Si la superficie corneal se coloca lejos de la distancia focal, es decir, fuera de la distancia de Rayleigh, donde la fase de los frentes de onda dejan de ser planos, entonces el haz en retroreflexión ahora converge o diverge y al pasar por la lente el haz no será colimado resultando en una imagen desenfocada del haz en la cámara CCD (Ver Fig. 21:C-D).

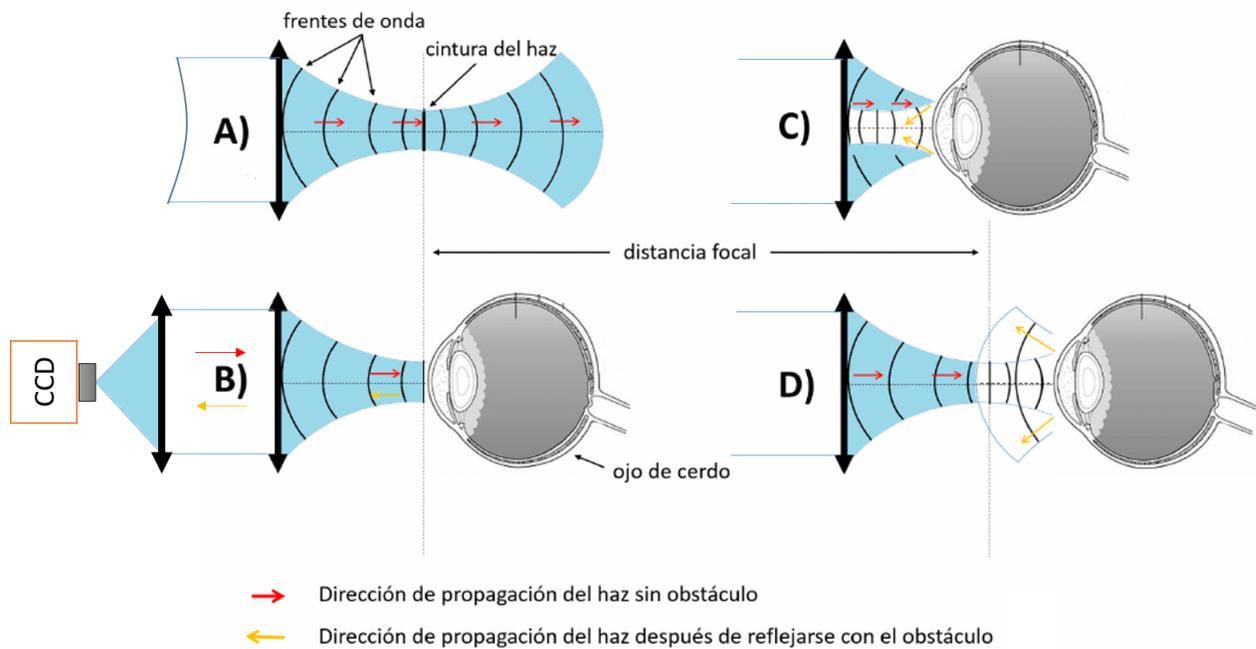


Figura 21: Propagación de un haz gaussiano enfocado en espacio libre y frente a un obstáculo: ojo de cerdo.

3.3.1. Procedimiento

Con la técnica STM adaptada en la CA de los ojos de cerdo *ex-vivo*, se pretende comprender la dinámica de las burbujas de cavitación en función de la energía del pulso de bombeo y la presión externa ejercida dentro del rango de la PIO. Con el fin de cumplir con estos objetivos, se establecieron dos procedimientos: (I) Obtención de la curva P vs τ_c y (II) Variabilidad de $\tau_c(E_p, P)$. Se utilizó el arreglo experimental mostrado en la Ver Fig. 22, comparando los resultados obtenidos para varios ojos de cerdo al variar la presión ejercida y la energía por pulso, principalmente.

3.3.1.1. Obtención de la curva presión vs tiempo de colapso

Para poder demostrar que es posible implementar un sensor de presión del tipo tonométrico por cavitación láser en un globo ocular, se recurre al modelo de *Rayleigh-Plesset* que relaciona el radio máximo de la burbuja de cavitación R_{max} , la densidad del medio ρ y la presión ejercida por el medio P , con el primer tiempo de colapso τ_c de la burbuja de cavitación. En nuestro caso, si es posible adaptar la técnica STM en la CA de un globo ocular para tener un estudio resuelto en el tiempo de las burbujas de cavitación, se puede

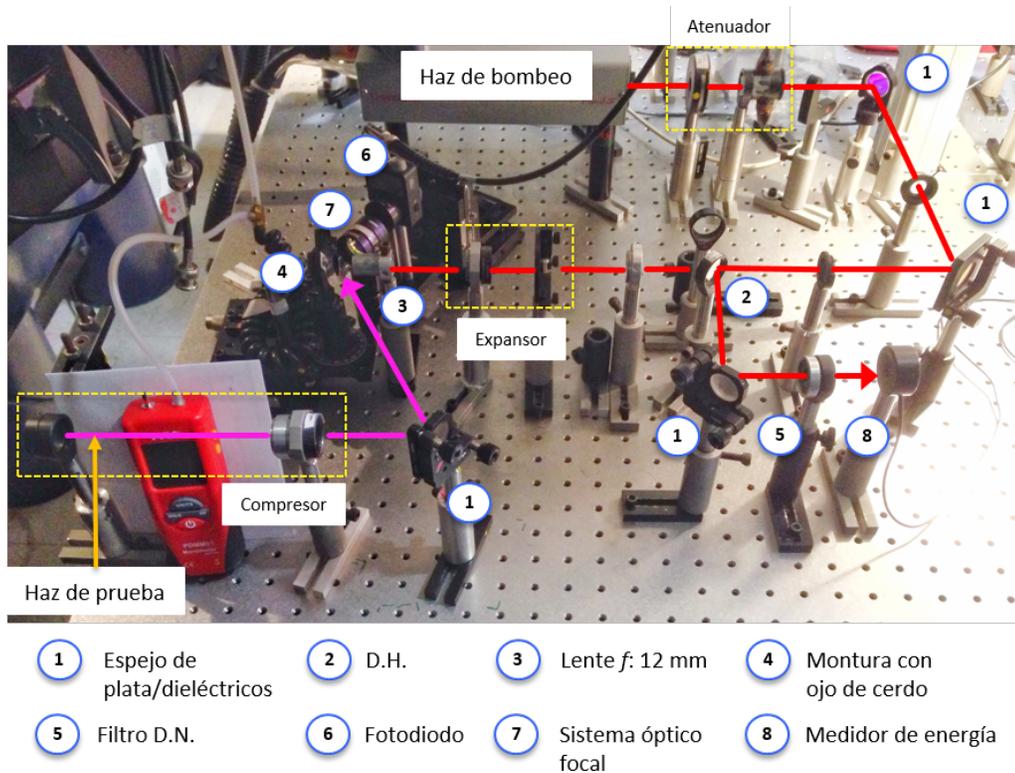


Figura 22: Arreglo experimental de la técnica STM para cavitación en ojos de cerdo *ex-vivo*.

entonces obtener una relación directa entre τ_c y P .

Cada uno de los ojos utilizados se irradiaron en la zona central de la córnea (Ver Fig. 19) con el fin de generar burbujas en la zona más amplia de la CA y así reducir la interacción de las ondas de choque y la burbuja con las fronteras (iris y córnea). La profundidad de enfoque del haz de bombeo con respecto a la superficie corneal fue de $\approx 1\text{ mm}$, los pulsos de bombeo se depositaron a una tasa de repetición de 1 Hz, promediando 16 muestras por señal STM registrada por el fotodiodo-1, se usó una energía por pulso E_p de: 13 y 16.4 mJ, y se varió la presión externa ejercida P de 10 a 60 mmHg, en pasos de 4 mmHg.

3.3.1.2. Variabilidad del tiempo de colapso en función de la presión y energía de bombeo

Un aspecto importante es determinar la dispersión de τ_c en función de P y E_p para distintos ojos de cerdo, y así establecer la reproducibilidad de la técnica.

La meta es el poder implementar la técnica STM como sensor de presión; suponiendo que se deban aplicar no más de cinco pulsos del haz de bombeo para poder determinar

la PIO del paciente. Los resultados obtenidos sirvieron para conocer los valores de E_P que ofrecen mayor estabilidad y menor dispersión de τ_c . Mientras que para la curva de P vs τ_c , se pudieron validar y comparar los resultados obtenidos en la Sec. 3.2 para cubetas de cuarzo o plástico con HA.

Para la dispersión de τ_c en función de E_P , se utilizaron tres ojos de cerdo aplicando las mismas condiciones de frecuencia de repetición (1 Hz), adquisición de la señal STM (sin promediar), presión externa (12 mmHg) y ubicación de la cintura del haz de bombeo (≈ 1 mm). El sistema atenuador de energía se configuró para que el haz de bombeo emita a: 12, 13 y 13.9 mJ, y se utilizó un medidor de energía piroeléctrico (PM320E, Thorlabs) colocado en uno de los brazos del D.H., para monitorear en tiempo real la energía por pulso depositada.

Por último, para la validación de τ_c en función de P , se utilizaron tres ojos de cerdo aplicando las mismas condiciones de frecuencia de repetición (1 Hz), adquisición de la señal STM (sin promediar), ubicación de la burbuja de cavitación (≈ 1 mm) y energía del pulso de bombeo (13 mJ), para una presión externa entre 13 y 40 mmHg, con incrementos de 3 mmHg.

3.4. Colección y manipulación de ojos de cerdo *ex-vivo*

Todos los ojos de cerdo (*Sus scrofa domestica*) utilizados para la realización de este trabajo fueron obtenidos por donación del Rastro Municipal de Ensenada, B.C., México, sin conocer la procedencia, edad o peso del cerdo. Cada uno de los ojos enucleados por el rastro municipal, fueron recogidos hasta 1 hora después de haber sido sacrificado el cerdo y depositados en un recipiente térmico con hielo para su transportación (alrededor de 1 hora). Cada ojo fue disecado para separar y remover tejido ocular no deseado (conjuntiva, músculo y tejido extraocular) con tijeras y bisturí. Posteriormente se enjuagaron con agua corriente y aquellos que no se utilizaron en las primeras horas, se almacenaron y colocaron por separado en tubos de plástico de 50 mL o en un vaso de precipitado (100 mL), con una solución amortiguadora PBS preparada (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, H₂O, KH₂PO₄ al: 1X, pH= 7.35, 10 a 15 mL por ojo), para su almacenamiento en refrigeración a una temperatura de 2 °C (Ver Fig. 23).

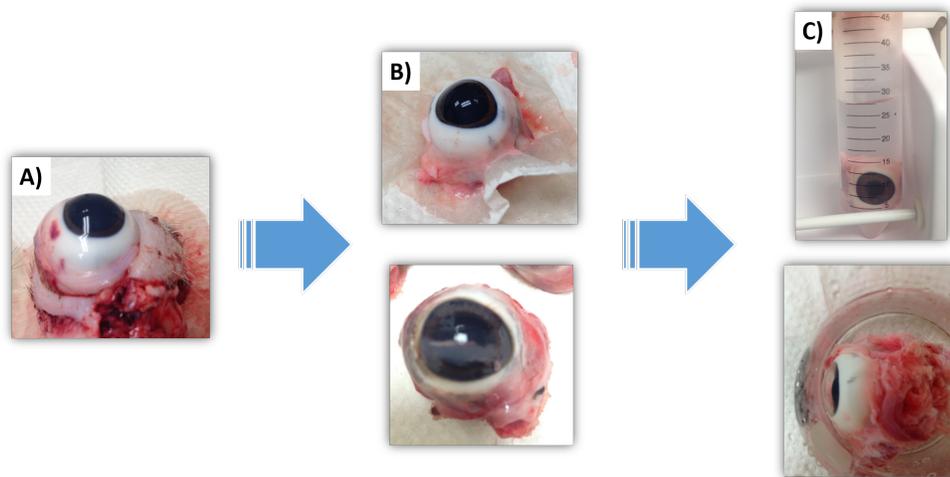


Figura 23: Procedimiento para la manipulación de los ojos de cerdo *ex-vivo*. (A) Ojo de cerdo enucleado recién colectado del Rastro Municipal de Ensenada, (B) ojos de cerdo disecados y (C) almacenamiento de los ojos de cerdo.

Durante la colección de los ojos de cerdo se observó la presencia de una franja de daño a lo largo de la córnea (Ver Fig. 23:B-*inferior*). El daño observado se debe al tratamiento térmico que sufren los cerdos, por lo que se procedió a solicitar los ojos de cerdo sin someterlos a este procedimiento para evitar el daño causado a la córnea.

3.4.1. Extracción del HA

Para los experimentos de cavitación láser en cubetas con HA, se procedió de la siguiente manera: *i)* se utilizó el HA de tres ojos de cerdo por cubeta; los ojos se colectaron después de ser sumergidos en la tina con agua hirviendo, *ii)* de cada ojo se le extrajo hasta 400 μL de HA con la ayuda de una jeringa de 10 mL ingresada de manera paralela al iris, pero lejos del mismo para evitar irrigación del pigmento y que éste se mezcle con el HA, y *iii)* el HA extraído se vertió en cubetas de plástico o cuarzo hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 1200 μL por cubeta (Ver Fig. 24).

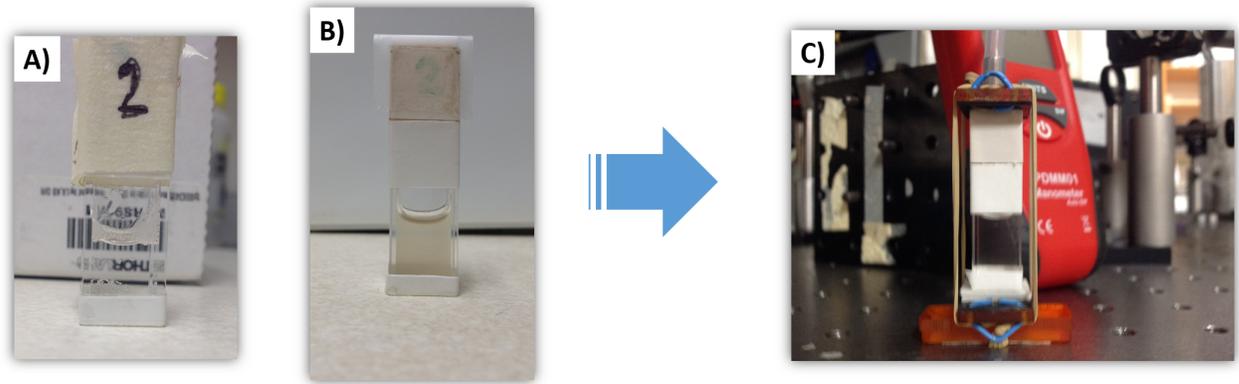


Figura 24: HA de ojos cerdo en cubetas de cuarzo o plástico. La mezcla del HA de cada uno de los ojos de cerdo colectados, corresponde a antes (A) y después (B) de ser sumergidos los cerdos en la tina con agua hirviendo. En (C) se muestra el mecanismo para presurizar cada cubeta con HA.

3.4.2. Manipulación de ojos de cerdo *ex-vivo*

Para los experimentos de cavitación láser con el globo ocular completo, se procedió de la siguiente manera: una vez que los ojos son disecados, se seleccionó uno para colocarlo sobre una gaza y aplicarle de 3-4 gotas de pil-ofteno (pilocarpina al 2%) sobre la córnea húmeda, mientras que los demás ojos se almacenaron a una temperatura de 2°C. El tiempo de espera para alcanzar una pupila miótica es de alrededor de 1 hora (Ver Fig. 25), posteriormente se colocó el ojo sobre el soporte donde se presurizó y se realizaron las pruebas de cavitación. Los ojos almacenados en refrigeración pasan por el mismo procedimiento antes mencionado, sólo que al sacarlos del refrigerador se mantienen a temperatura ambiente alrededor de 30 min. para templarlos. Cabe mencionar que todos los resultados aquí mostrados son de ojos manipulados no más de 6 hrs después de haber sido colectados, con el fin de tratar de simular las condiciones más reales de un ojo vivo.

Es importante hacer notar que si no se aplican las gotas de pilocarpina para relajar el iris, se tendrá una menor superficie de reflexión para el haz de prueba (Ver Fig. 25: al tiempo $t = 0$) y, en consecuencia, un menor grado de libertad en el ángulo de incidencia del haz de prueba que además requiere de la superposición de la zona de generación de cavitación dentro de la CA (Ver Fig. 19).

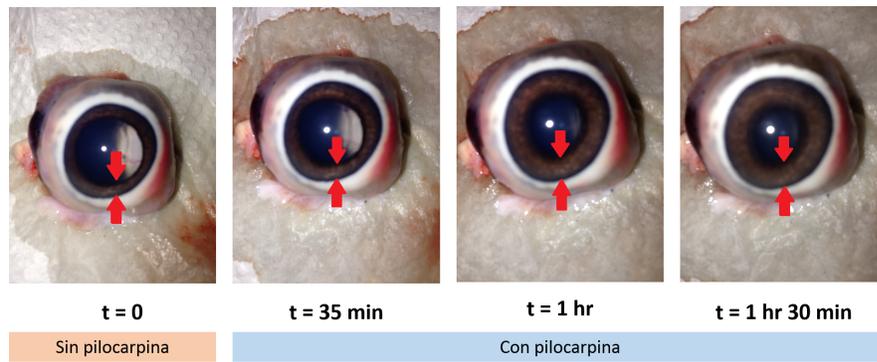


Figura 25: Acción de la pilocarpina para estimular la relajación del iris.

3.5. Fotodaño en córneas de ojos de cerdo *ex-vivo*

El análisis del fotodaño tiene como propósito identificar la cantidad de pulsos del haz de bombeo necesarios para provocar daño fisiológico en tres zonas específicas de la córnea: epitelio, estroma y membrana de Descemet, bajo la configuración para la detección de señales STM dentro de la CA de los ojos de cerdo *ex-vivo*. El daño puede ser debido a las ondas de choque; las burbujas de cavitación; los chorros de vapor; la absorción lineal del medio, etc.

Las pruebas se hicieron con diez ojos de cerdo enucleados, los cuales se colectaron el mismo día del sacrificio y se transportaron en un recipiente térmico con hielo. Cada ojo se disecó para remover tejido no deseado y se puso en solución PBS para su almacenamiento, tal y como se describió previamente en la Sec. 3.4. Se establecieron cuatro condiciones de irradiación variando sólo la cantidad de pulsos: 1, 20, 200 y 2000, manteniendo la misma profundidad de irradiación de ≈ 1 mm, misma energía por pulso $E_p = 13$ mJ y presurizándolos a 15 mmHg. Se estableció una tasa de repetición de 1 Hz para las irradiaciones de una y veinte pulsos, y 10 Hz para los de doscientos y dos mil pulsos.

Después de la irradiación en la zona central de la córnea y bajo las condiciones anteriormente mencionadas, se procedió a disecar la córnea con bisturí y tijeras, colocar la córnea sobre una gaza estéril dentro de una caja de petrí y verter una solución PBS para su transporte. Cada córnea se pasó luego a un tubo de centrifuga (15 mL) y se sumergió en solución fijadora Davidson (Sigma, 20 mL) durante 24 horas a temperatura ambiente. 24 horas después se sacaron las córneas y se sumergieron en etanol (2 mL,

70 %) para luego realizar el análisis histológico mediante el apoyo brindado por el Laboratorio de Patología y Análisis Clínicos de Ensenada, B.C., México.

Las diez córneas se recubrieron con parafina por 24 horas y posteriormente se realizaron dos cortes transversales de aproximadamente 1 mm de espesor en la zona central de cada córnea (zona de irradiación). Los 2 cortes de cada córnea se sumergieron en parafina para formar bloques y hacer cortes con el microtomo (American Optical y Reichert). Por cada córnea se obtuvieron 8-10 cortes ($4 \mu\text{m}$ de espesor), que se mantuvieron en portaobjetos. Por último, se tiñó con hematoxilina-eosina de Harris, lo cual permitió teñir de azul los núcleos celulares y de rosa las estructuras basadas en colágeno presentes en el estroma (Ver. Fig. 26).

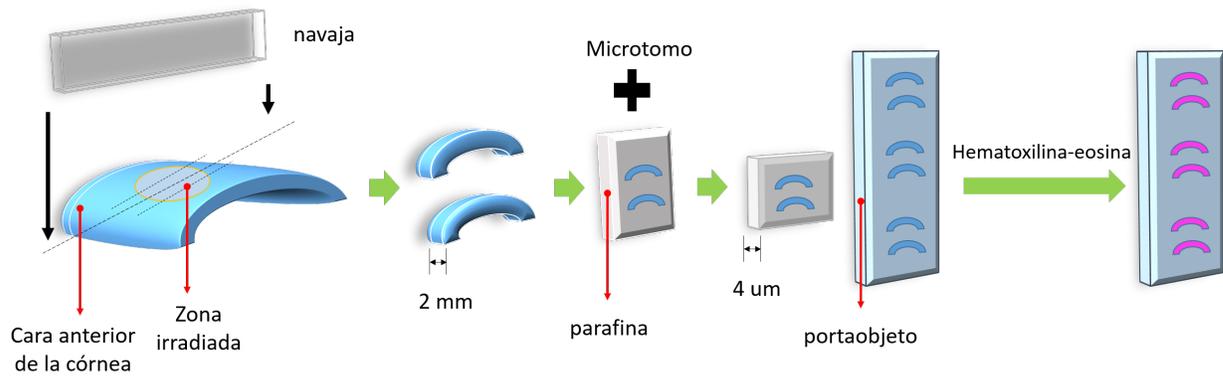


Figura 26: Procedimiento para análisis histológico de córneas de cerdo irradiadas.

Capítulo 4. Análisis y discusión de resultados

En este capítulo se presentan y se discuten los resultados obtenidos de cavitación inducida por láser en HA. Se analiza: la propagación de los haces bombeo y prueba dentro del modelo de ojo de cerdo mediante una simulación; las propiedades ópticas del medio (HA); y de las curvas del tipo P vs τ_c y E_p vs τ_c obtenidas con HA dentro de cubetas de cuarzo o plástico. También, se presentan los resultados de la adaptación de la técnica STM dentro de la CA para varios ojos de cerdo *ex-vivo*, analizando las señales de STM y construyendo la curva P vs τ_c . Se analiza la dispersión de τ_c en función de P y E_p . Por último, se presentan los resultados de pruebas histológicas que se realizaron para estudiar el fotodaño que se genera en la córnea a E_p constante y variando la cantidad de pulsos depositados para la generación de cavitación en la CA.

4.1. Caracterización de los haces de bombeo y prueba

Para poder comparar el valor del área en el foco del haz de bombeo obtenido experimentalmente con lo que predice la teoría, es necesario primero conocer el parámetro de calidad M^2 para el láser utilizado en los experimentos, siendo que para un haz gaussiano ideal $M^2 = 1$. Láseres de alta calidad en su modo espacial tienen un valor de M^2 que puede estar entre 1 y 2, para calidades inferiores se conseguirán valores mayores a 2 y de hasta 2 dígitos para láseres de alta potencia de baja calidad en el modo espacial. Utilizando la ecuación de propagación para haces gaussianos y considerando $z \gg Z_R$, donde z es la distancia de propagación del haz gaussiano, medida respecto a la cintura del haz, y Z_R es la distancia de Rayleigh, se obtiene la ecuación para M^2 (Silfvast W.T., 1999):

$$M^2 = \frac{\theta' \pi W'_0}{\lambda} \quad (9)$$

donde θ' es la divergencia del haz gaussiano en ángulo medio y W'_0 es el radio de la cintura del haz; para nuestra situación ambos se midieron en un plano imagen definido por el sistema PEB (Ver Sec. 3.2), y λ es la longitud de onda del haz. En la tabla 6 se

muestran los valores obtenidos para M^2 sobre los ejes $x - y$ para los haces de bombeo y prueba aplicando la Ec. 9. Los valores obtenidos de θ' y W'_0 , a partir de las imágenes del perfil de intensidad registradas por la cámara CCD, contienen el ajuste a una función gaussiana (con ayuda del software ImageJ) para ser consistente con la derivación de la Ec. 9. Cabe mencionar que los parámetros de propagación obtenidos para el haz de prueba no fueron obtenidos mediante el sistema PEB, sino que se colocó una lente a la salida del láser de prueba y se analizaron los perfiles de intensidad en y lejos ($z \gg Z_R$) de la zona focal.

Tabla 6: Divergencia del haz y parámetro de calidad determinado experimentalmente para los haces de bombeo y prueba.

	θ'_x	θ'_y	M_x^2	M_y^2
Haz de bombeo	4.7 mrad	5.8 mrad	6.1	7.7
Haz de prueba	2.8 mrad	3 mrad	1.3	1.4

Una vez que se conoce M^2 , es posible determinar el radio W_0 del haz de bombeo en el plano de enfoque utilizando la siguiente expresión (Silfvast W.T., 1999):

$$W_0 = \frac{2\lambda f M^2}{\pi D} \quad (10)$$

donde f es la longitud focal de la lente L_1 (Ver Fig. 16) y D el diámetro del haz de bombeo que incide sobre la lente L_1 . Para el caso de la lente L_1 , se usaron dos lentes con distintas distancias focales, para la lente con $f = 12$ mm, se cubrió con el haz de bombeo ≈ 79 % de la apertura de la lente, y para la segunda lente de $f = 25.4$ mm fue de ≈ 39 %. Esto da como resultado que la apertura numérica (NA) en propagación libre del haz para la lente de 12 mm de distancia focal sea $NA = 0.4$, mientras que para la lente de 25.4 mm sea $NA = 0.2$.

Tabla 7: Comparación teórico/experimental del radio del haz de bombeo en la zona focal para dos lentes positivas.

	Experimental			Teórico
	W_{0x}	W_{0y}	Área [†]	W_0 [‡]
$L_1(f = 12 \text{ mm})$	4.4 μm	3.7 μm	$5.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$	3.2 μm
$L_1(f = 25.4 \text{ mm})$	5.5 μm	5.7 μm	$9.9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$	6.0 μm

[†]Incluye corrección por amplificación del sistema óptico con ayuda de matrices ABCD y con W_0 obtenido

La tabla 7 muestra el tamaño del haz medido experimentalmente y el calculado usando la expresión 10. Se puede observar que los valores experimentales obtenidos y los que la teoría predice concuerdan.

A continuación se describirá la propagación de los haces de bombeo y prueba a través de un modelo de ojo de cerdo mediante el software WinLens3D. Los resultados de las simulaciones que a continuación se presentan permitirán establecer las condiciones bajo las cuales habrán de incidir los haces de bombeo y prueba en la superficie corneal para optimizar la técnica STM dentro de la CA de los ojos de cerdo. La simulación permite además estimar la fluencia (J/cm^2) en la zona focal dentro de la CA y el tamaño del haz en la superficie de la retina.

4.1.1. Propagación del haz de prueba

Para la realización de las simulaciones de la propagación de los haces bombeo-prueba, se utilizó el software WinLens3D Basic (V. 1.2.6). Los parámetros de entrada utilizados para el modelo del globo ocular se muestran en la tabla 8, tomando como referencia los datos de: (Vojnikovi et al., 2013; Benes et al., 2013).

Tabla 8: Parámetros para el modelo del globo ocular. Los parámetros Sep. y Ap/2 están en milímetros.

No. de superficie	Elemento	Parámetro							
		Superficie [†]	R ^{††}	Sep.	n ^{††}	V ^{††}	Q ^{††}	$Ap/2$ ^{††}	
1	Córnea	A	7.7	0.88	1.376	56.28	-0.18	5.5	
2		A	6.8	0	1.334	52.71	-0.26	5.5	
3	HA	A	6.8	3	1.334	52.71	-0.26	5.5	
4		S	0	0	1.334	52.71	0	5.5	
5		S	0	0	1.334	52.71	0	5.5	
6		S	12.4	0	1.417	53.46	0	5.5	
7	Cristalino	S	12.4	4	1.417	53.46	0	5.5	
8		A	-8.1	0	1.337	53.33	0.96	5.5	
9	HV	A	-8.1	16.2	1.337	53.33	0.96	5.5	
10	Retina	S	-12	0	1	0	0	11	

experimentalmente cuando la intensidad decae como $1/e^2$.

[‡] W_0 y θ calculado cuando la intensidad decae como $1/e^2$.

[†] A y S indican una superficie esférica o esférica, respectivamente.

^{††} R, n, V, Q y $Ap/2$ corresponden a: radio de curvatura, índice de refracción, número de Abbe, coeficiente de asfericidad y apertura media, respectivamente.

Parte de la optimización de la técnica STM es el conocer la trayectoria que sigue el haz de prueba desde que incide en la córnea hasta cuando éste se refleja en el iris y sale del ojo. El propósito es que en su trayecto el haz de prueba pase por la zona de generación de las burbujas de cavitación y así poder obtener la traza STM y a partir de ésta conocer el 1er. tiempo de colapso y el radio máximo que alcanza la burbuja. Como se puede observar en la figura 27:B; en un esquema simplificado de la técnica STM, si el haz de prueba no cubre en su totalidad el instante cuando la burbuja alcanza su radio máximo R_{max} , los valores registrados de R_{max} y τ_c serán menores que los realmente alcanzados y entonces se tendrá un error en la estimación de la presión externa ejercida P si éste se deduce a partir de los dos valores anteriores.

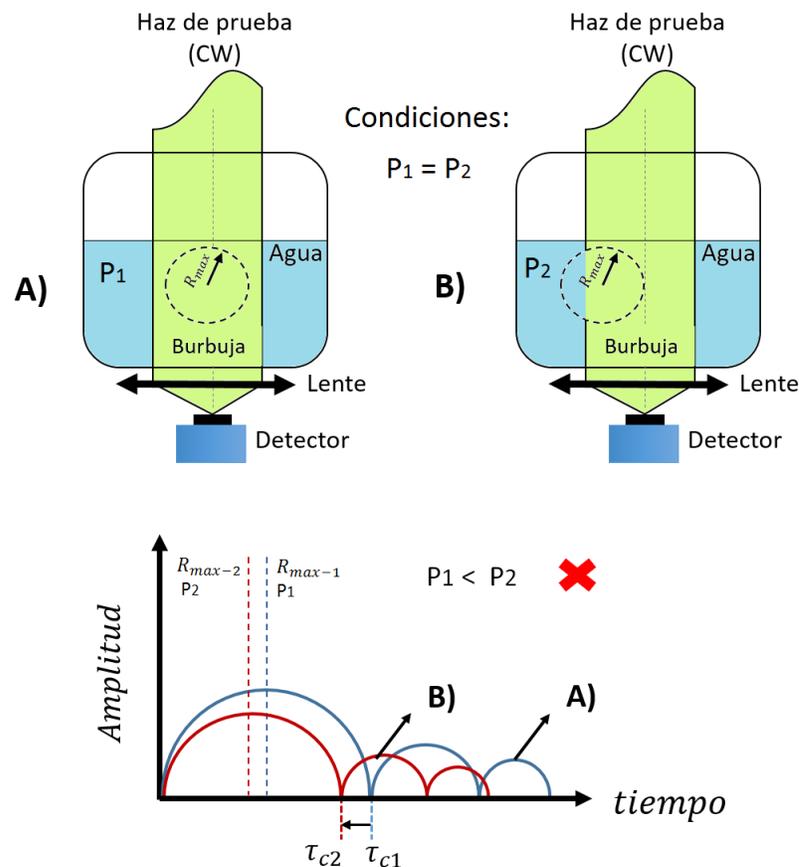


Figura 27: Esquema de la técnica STM con el haz de prueba cubriendo total (A) y parcialmente (B) la zona de generación de las burbujas de cavitación.

La Fig. 28 muestra el resultado de la propagación del haz de prueba a través de la CA en el modelo de ojo de cerdo y en la tabla 9 se muestran los parámetros utilizados. En este caso se considera que el haz de bombeo genera las burbujas de cavitación en la vecindad de la córnea (marcada en la posición con una estrella amarilla) y que el haz de prueba

tiene un radio W_0 de $800 \mu\text{m}$ a la entrada. Para lograr que el haz de prueba coincida en la zona de generación de las burbujas de cavitación, y que además éste se refleje en una parte de la superficie del iris para posteriormente coleccionar la señal, fue necesario hacerlo incidir a un ángulo θ de 52° , respecto a la normal de incidencia del haz de bombeo y realizar un desplazamiento δ del ojo de 1.1 mm , respecto al punto de entrada del haz de bombeo (Ver Fig. 28:A). En la figura 28:B se observa que al disminuir el ángulo de incidencia por al menos 3° , decrece el area de reflexión en el iris lo que llevaría a la pérdida o atenuación de la señal STM. Por otro lado, al aumentar el ángulo de incidencia a 60° (Ver Fig. 28:C), se observa que se tiene una buena cobertura sobre la zona de cavitación, pero los rayos reflejados por el iris, y posteriormente refractados por la córnea, tienen una trayectoria a la salida cercana al tejido limbo corneoescleral, lo cual imposibilitaría la colección de la señal en una situación real ya que ésta zona es ópticamente opaca en el visible.

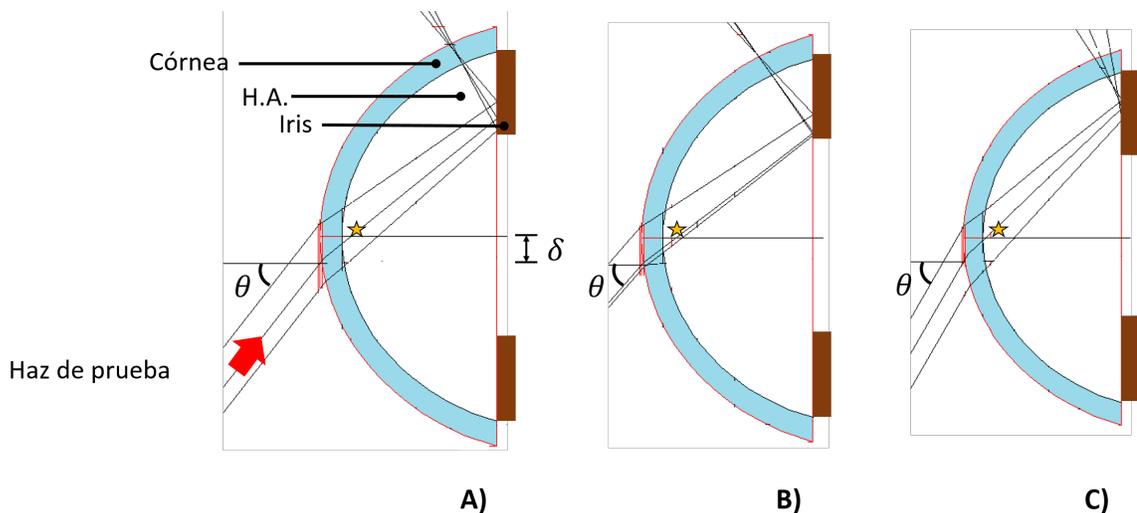


Figura 28: Simulación del haz de prueba propagándose en la CA de un ojo de cerdo a distintos ángulos de incidencia. La estrella indica la zona de generación de las burbujas de cavitación por el haz de bombeo.

Cabe mencionar que el tamaño del iris mostrado en la tabla 9, representa el valor medido experimentalmente de un ojo de cerdo, después de haberle aplicado 4 gotas de pilocarpina y esperado 2 horas para conseguir un ojo miótico.

De los resultados presentados en la Fig. 28, se puede decir que: aprovechando el mayor volumen que representa estar en la zona central de la CA para reducir los efectos de interferencia de las ondas de choque reflejadas por las superficies circundantes y, utilizando una configuración de bombeo-prueba de forma no colineal, la mejor opción en la adaptación de la técnica STM en el modelo de ojo de cerdo es la que se esquematiza

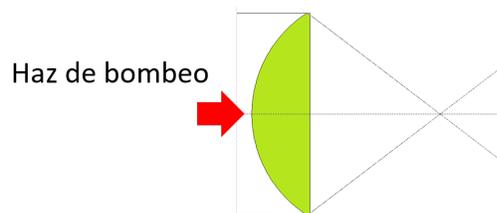
Tabla 9: Parámetros de propagación del haz de prueba en la CA de ojo de cerdo.

Parámetros de entrada			
	Fig. 28:A	Fig. 28:B	Fig. 28:C
W_0 [mm]	0.8	0.8	0.8
θ [grados]	52	49	60
Ancho del iris [mm]	1.5	1.5	1.5
δ [mm]	1.1	1.1	1.1

en la Fig. 28:A, ya que el haz de prueba cubre la zona de generación de las burbujas de cavitación, y se aprovecha sin pérdidas, el área del iris miótico para coleccionar la señal STM en el detector. Además, se pudo determinar la sensibilidad en el ángulo de incidencia del haz de prueba, ya que en un rango de no más de 10 grados se disminuye o se pierde la señal STM.

4.1.2. Propagación del haz de bombeo

En la sección 3.2 se mencionó sobre la caracterización del haz de bombeo para conocer la fluencia que se estaría depositando dentro de la CA de los ojos de cerdo, sin embargo, el cálculo del área en la cintura del haz de bombeo fue realizado en propagación libre y no considerando, al menos, los efectos de refracción debidos al modelo de ojo de cerdo. En este sentido, esta sección tiene por objetivo el poder determinar el factor de corrección en el área de la cintura del haz de bombeo al pasar de propagación libre al modelo de ojo de cerdo. Además, se calculará el valor de fluencia una vez que el haz se propaga hasta la superficie de la retina.

**Figura 29: Simulación del haz de bombeo enfocado con lente $L_1 = 12$ mm, propagándose en aire.**

La Fig. 29 ilustra la propagación libre del haz de bombeo considerando los parámetros experimentales previamente obtenidos (Ver tabla 6) y de nuevo enlistados en la tabla 10. El software WinLens3D Basic utiliza el modelo de propagación de haz gaussiano en su primera aproximación, dando como resultado que el radio del haz enfocado $W_0(f)$, cuan-

do la intensidad decae a $1/e^2$, es de $4.6 \mu\text{m}$, resultado del mismo orden al previamente obtenido experimentalmente y teóricamente (Ver tabla 7).

Tabla 10: Parámetros de propagación de haz gaussiano: Haz de bombeo enfocado en aire libre.

Parámetros de entrada	
M^2	6
λ [nm]	532
$Ap/2$ [mm]	4.3
Parámetro de salida	
$W_0(f)$ [μm]	4.6

Ahora, introduciendo los mismos parámetros del haz de bombeo que se usaron en el caso de propagación libre, pero ahora para la propagación en el modelo de ojo de cerdo (Ver Fig. 30), donde se toman en cuenta los índices de refracción de los diferentes estrados, se obtiene que el radio en la cintura del haz enfocado $W_0(f)$ dentro de la CA es de $8.4 \mu\text{m}$ (Ver tabla 11), lo que representa un factor de 1.8 veces más grande que en propagación libre. Traduciendo este factor de incremento en el radio de la cintura del haz en comparación con el obtenido en propagación libre, el área en la cintura del haz pasaría de tener $5.1 \times 10^{-7} \text{cm}^2$ (Ver tabla 7) a $1.7 \times 10^{-6} \text{cm}^2$.

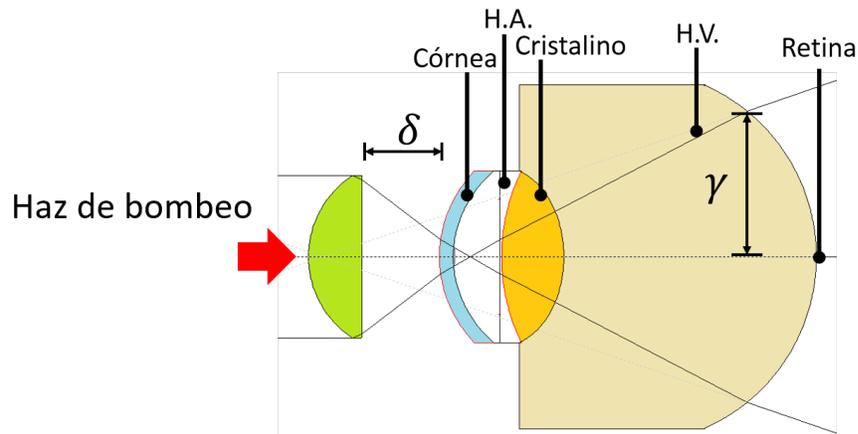


Figura 30: Simulación del haz de bombeo enfocado y propagándose dentro del modelo de ojo de cerdo.

Si se supone que se mantiene la forma circular del haz de bombeo a lo largo de la propagación del modelo de ojo de cerdo hasta la superficie de la retina, y tomando el radio del haz en la retina $\gamma \approx 6 \text{ mm}$, el área del haz de bombeo sería de $\approx 1.1 \text{ cm}^2$.

Tabla 11: Parámetros de propagación de haz gaussiano: Haz de bombeo enfocado en la CA de ojo de cerdo.

Parámetros de entrada	
M^2	6
λ [nm]	532
$A_p/2$ [mm]	4.3
δ [mm]	5
Parámetro de salida	
$W_0(f)$ [μm]	8.4
γ [mm]	≈ 6

4.2. Caracterización óptica del medio

Con el objetivo de conocer las pérdidas de energía del haz de bombeo debidas a la absorción lineal del medio (córnea), se realizó la caracterización de la córnea de los ojos de cerdo *ex-vivo* mediante el análisis del espectro de transmitancia en el rango de 400 - 1100 nm. El procedimiento que se siguió fue: (1) 2 hrs. después de su colección, diseccionar con bisturí y tijeras la periferia de la córnea, (2) se depositó la córnea sobre un portaobjetos y se cortó la córnea transversalmente para reducir la esfericidad, (3) se humedeció y colocó cada muestra de córnea entre dos portaobjetos (Ver Fig. 31).

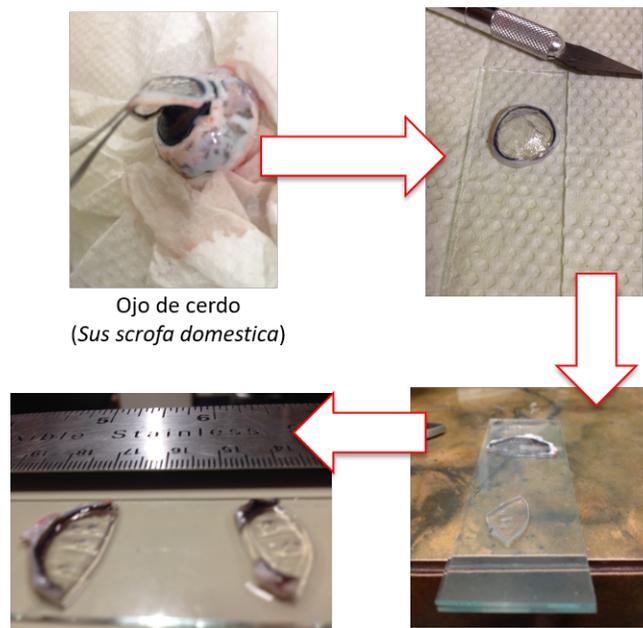


Figura 31: Procedimiento para la preparación de las muestras de córnea de cerdo, para caracterización óptica.

Se utilizó un espectrómetro EPP2000, Stellar Net y el espectro de transmitancia se pre-

senta en la figura 32. En el espectro no incluye las pérdidas por reflexión entre cada interface: aire-portaobjeto-córnea, y las debidas al esparcimiento. Se puede observar que la transmitancia en el rango VIS es de alrededor del 60 %, debido a que hay una degradación de la córnea post-mortem. En un ojo *in-vivo* la transmitancia es de 90 % para el mismo rango espectral (Boettner and Wolter, 1962).

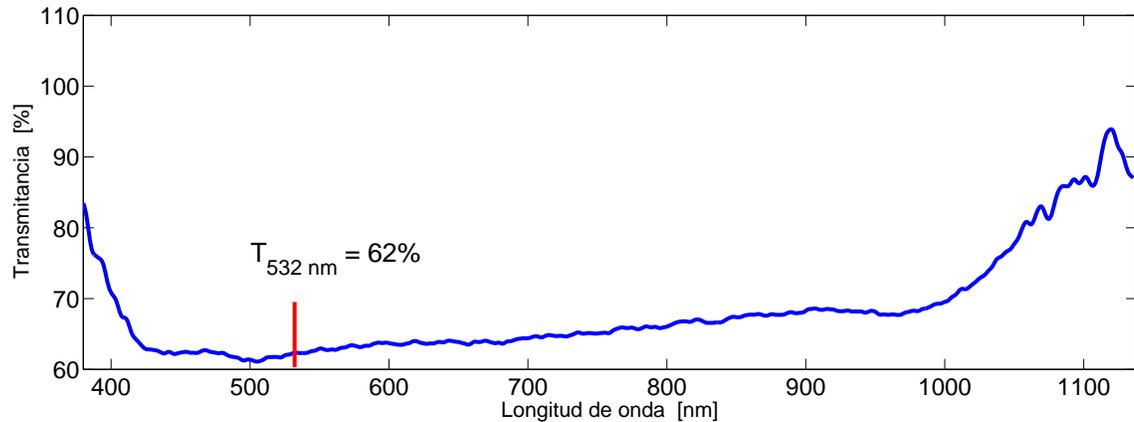


Figura 32: Espectro de transmitancia directa en córnea de cerdo 2 horas post-mortem.

Cuando se trata de describir los efectos del espesor o concentración en la absorción de la luz en el medio, se recurre a la *Ley de Lambert-Beer* (Markolf H. Niemz, 2007), la cual se expresa como:

$$I(z) = I_0 \exp(-\alpha z), \quad (11)$$

donde z denota el eje óptico, $I(z)$ es la intensidad a una distancia z dentro del medio, I_0 es la intensidad incidente y α es el coeficiente de absorción lineal del medio. Manipulando la Ec. (11) y conociendo de antemano la transmitancia del medio $T = I(z)/I_0$ y su espesor z , se puede conocer el coeficiente de absorción del medio:

$$\alpha = -\ln(T)/z, \quad (12)$$

y también, la longitud de penetración L , la cual se define como la distancia a la cual la intensidad $I(z)$ decae a $1/e$ (37 %) de la intensidad incidente I_0 :

$$L = 1/\alpha. \quad (13)$$

Las Figs. 33 y 34 son el resultado de aplicar las Ecs. 12 y 11, respectivamente; utilizando la transmitancia T obtenida experimentalmente y considerando un espesor corneal de $880 \mu\text{m}$. De la figura 33 se obtiene que el coeficiente absorción lineal α para la longitud de onda del haz de bombeo ($\lambda = 532 \text{ nm}$) es de 5.37 cm^{-1} , resultado del mismo orden obtenido en córneas de cerdo por (Rosales, 2008; Markolf H. Niemz, 2007) y también reportado por otros autores para córneas de mono *rhesus* (Maher, 1978).

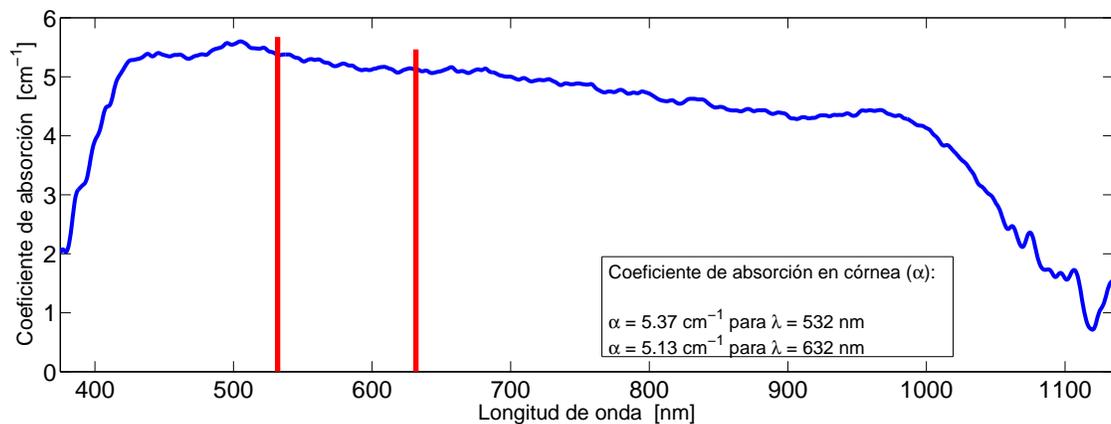


Figura 33: Curva del coeficiente de absorción del tejido corneal (ojo de cerdo).

El decaimiento en la intensidad que sufre el haz de bombeo debido al proceso de absorción lineal de la córnea, se muestra en la Fig. 34, la intensidad disminuye $\approx 38\%$ de su valor de incidencia, esto una vez que atraviesa el espesor corneal (la línea verde representa un espesor corneal de $880 \mu\text{m}$). En esta gráfica no se muestran las pérdidas por absorción en la zona del HA.

Otras fuentes de pérdida de la energía del haz de bombeo que deben considerarse para determinar la fluencia neta que contribuye para la formación de las burbujas de cavitación, son las debidas a la reflexión de la luz entre cada interface de los distintos estratos por los que atraviesa y las pérdidas causadas por la partición de la energía de bombeo en energía mecánica y de evaporación. Según resultados obtenidos por (Evans et al., 2008; Vogel, 1996), el porcentaje de la energía absorbida del haz de bombeo, que es convertida en energía mecánica (ondas de choque y burbujas de cavitación) y de evaporación, en un medio con agua destilada y utilizando un haz láser Nd:YAG (532 nm , 6 ns) con energías

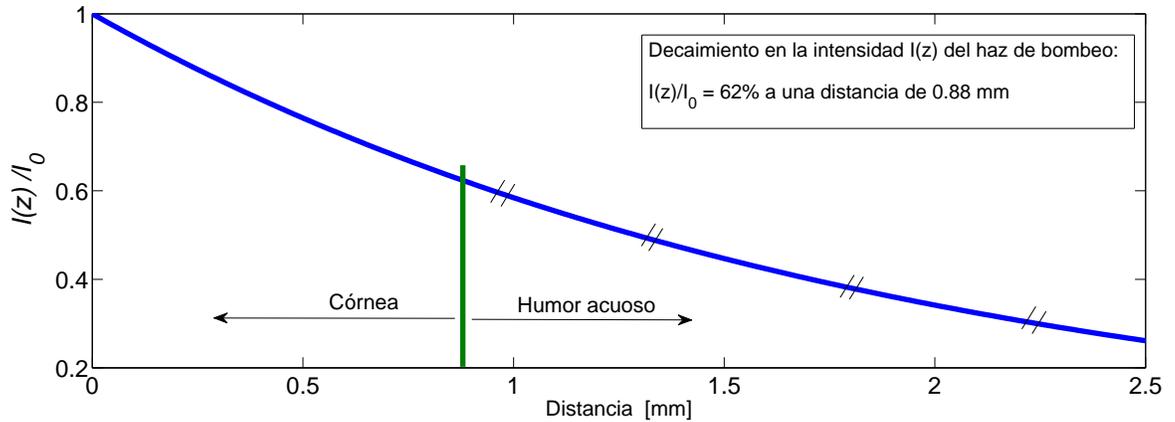


Figura 34: Decaimiento en la intensidad del haz de bombeo a través de la córnea.

por pulso $> 350\mu\text{J}$, es de $\approx 75\%$.

Las pérdidas de energía del haz de bombeo causadas por la reflexión en cada una de las interfaces: (1) aire-córnea, (2) córnea-HA, (3) HA-cristalino y (4) cristalino-H.V, se obtienen utilizando los coeficientes de Fresnel (reflexión y transmisión) suponiendo incidencia normal en cada una de las superficies:

$$R[\%] = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2}\right)^2 \times 100 \quad (14)$$

$$T[\%] = \left(\frac{4n_1n_2}{n_1 + n_2}\right)^2 \times 100 \quad (15)$$

donde R y T son el porcentaje de luz reflejada y transmitida por la interface, n_1 es el índice de refracción del medio 1 por donde viaja el haz antes de incidir en el medio 2 y n_2 el índice refracción del medio 2. Utilizando la Ec. 14 se obtiene el porcentaje de reflexión R para cada interface:

- $R_{\text{aire-cornea}} = 2.50\%$.
- $R_{\text{cornea-HA}} = 0.02\%$.
- $R_{\text{HA-cristalino}} = 0.09\%$.
- $R_{\text{cristalino-HV}} = 0.08\%$.

dando un total en pérdidas por reflexión y transmisión en el ojo (desde la superficie de la córnea hasta la retina, usando Ecs. 14 y 15) de $R_{ojo} = 2.68\%$. Si se añaden las pérdidas por 2 lentes posteriores al divisor de haz (Ver sección 3.3, Fig. 18), cuyo material es N-BK7 ($n = 1.51$), las pérdidas por los 2 elementos será de $R_{lens} = 12.38\%$. Por lo tanto, se tendría un total de pérdidas de $R_{tot} \approx 15\%$.

Se realizaron experimentos de irradiación del HA con el haz de bombeo en cubetas de cuarzo para investigar, vía el espectro de absorción, posibles efectos de modificación de sus propiedades ópticas tras ser irradiado durante lapsos prolongados de tiempo.

El experimento consistió en: extraer HA de 4 ojos de cerdo enucleados (alrededor de $400 \mu\text{L}$ en total) previamente solicitados en el Rastro Municipal y colectados antes de haber sido metidos en la tina con agua hirviendo; verter el HA en dos cubetas de cuarzo ($300 \mu\text{L}$ y $100 \mu\text{L}$ en cada cubeta) e irradiar una cubeta con una energía por pulso de 2.5 mJ a una tasa de repetición de 10 Hz , durante 2 lapsos de tiempo, mientras que la otra cubeta corresponderá a la muestra control. Para el análisis del espectro de absorción de las muestras, se utilizó un espectrómetro Epoch Microplate (UV-VIS), el cual permitió colocar en cada pozo $100 \mu\text{L}$ de HA por cubeta y realizar un promedio con los resultados obtenidos.

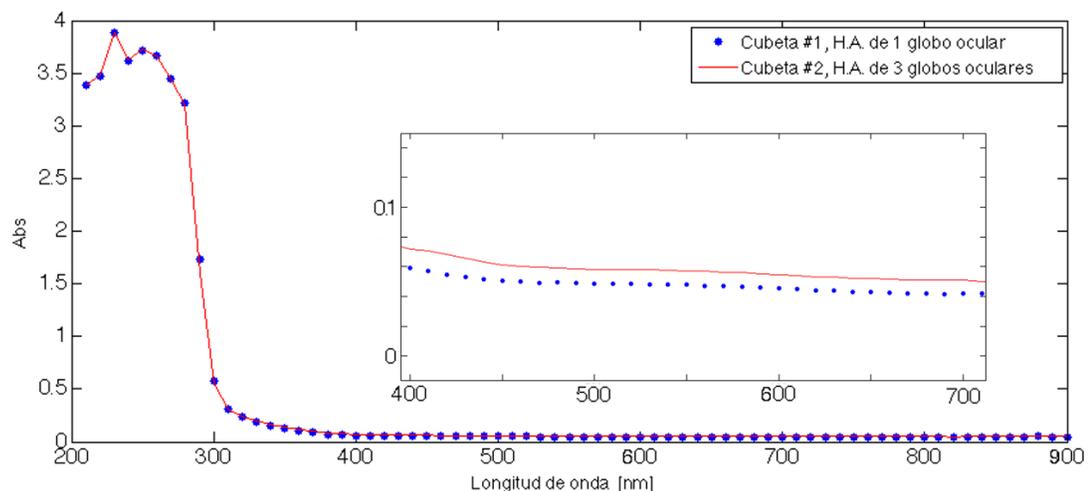


Figura 35: Espectros de absorción del HA 1 hora después de su colección.

Antes de conocer la respuesta en el espectro de absorción con 2 lapsos de tiempo de irradiación, se comprobó que el HA de 1 ojo de cerdo y la mezcla de 3 ojos no representan un cambio significativo en las propiedades ópticas del medio. La Fig. 35 muestra

los espectros de absorción del HA de 1 ojo de cerdo (círculos) y la mezcla de 3 ojos (línea continua). Por otro lado, ambos espectros de absorción presentan una banda con un máximo que está entre 200-300 nm y una caída abrupta en la absorción alrededor de 300 nm, lo cual indica la presencia de ácido ascórbico, principalmente, como lo ha reportado (Yang et al., 2006) para HA de diversos animales: porcino, salmón, rana, cocodrilo, entre otros (Ver Fig. 36).

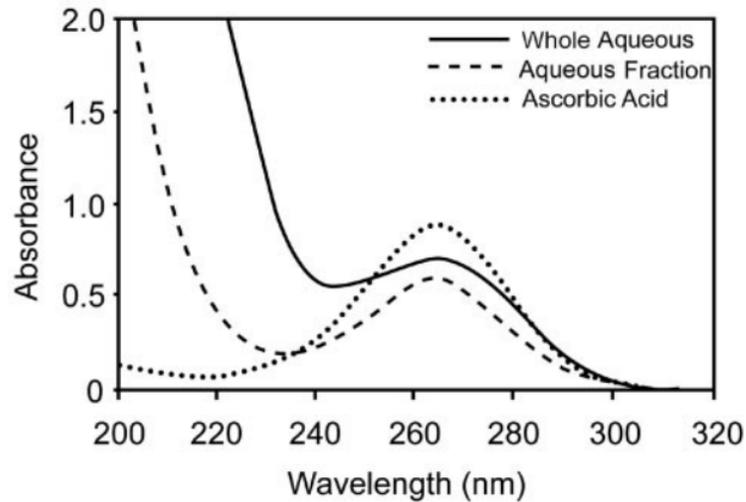


Figura 36: Espectro de absorción de muestra completa (línea continua) y fracción (línea discontinua) de HA porcino, y su comparación con una solución de ácido ascórbico 0.1 mg/mL (línea punteada) (Yang et al., 2006).

La misma muestra de HA anteriormente utilizada (mezcla de HA de 3 ojos), a la que llamaré mezcla1, se usó para ser irradiada, mientras que el HA de 1 ojo se utilizó como muestra control (Ver Fig. 37 : línea continua morada, corresponde al tiempo cero de la muestra control), recordando que las muestras control y mezcla1 fueron colectadas de ojos enucleados del mismo día. Durante los experimentos realizados, tanto la muestra control como mezcla1, fueron almacenados a temperatura ambiente.

La Fig. 37 se puede describir de la siguiente forma: 20 hrs. después de la colección de los ojos, se tomó el espectro de absorción de la muestra control (círculos) y la muestra mezcla1 fue irradiada 24 horas después de su colección durante 30 min, $E_p = 2.5$ mJ y a una tasa de repetición de 10 Hz (línea continua negra), a la que se llamará Irradiación1. Posteriormente, la muestra mezcla1 fue de nuevamente irradiada durante 1 hora, esto 43 hrs después de su colección, $E_p = 2.5$ mJ y a una tasa de repetición de 10 Hz, nombrándose Irradiación2 (línea continua con triángulos). Por último, 93 horas después

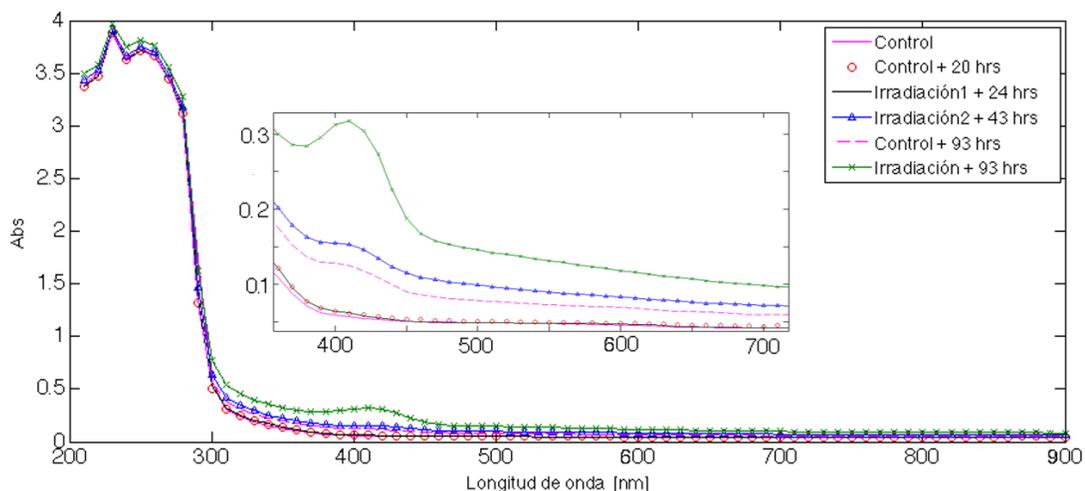


Figura 37: Espectro de absorción de una cubeta con HA tras varios periodos de irradiación con el haz de bombeo.

de la colección de los ojos de cerdo, se tomó el espectro de absorción de la muestra mezcla1 (línea continua con cruces) y control (línea cortada), donde la mezcla1 tiene el acumulado de las condiciones de Irradiación1 e Irradiación2.

La Fig. 37 muestra los resultados obtenidos al irradiar el HA durante 30 min y 1 hora a las mismas condiciones de energía por pulso y tasa de repetición, y de la cual se pueden observar dos casos:

(1) La banda de absorción del HA que se extiende entre 200-300 nm, no presenta ningún cambio significativo en su forma; tanto en la muestra control como la mezcla1, antes, durante y después de haber sido irradiado. Sólo se observa un ligero aumento de absorción en la mezcla1 93 hrs. después, mientras que la muestra control no lo presenta. Ésto quizás se deba a la degradación y/o procesos de oxido-reducción acelerado del ácido ascórbico al haber sido irradiado por el haz de bombeo.

(2) La mezcla1 adquiere una banda de absorción en ≈ 410 nm después haber sido irradiada con las condiciones de Irradiación1 e Irradiación2. Esta banda de absorción se presenta en la mezcla1 de 43 hrs., y empieza a presentarse en la muestra control de 93 hrs., con una absorción muy pequeña mientras que la mezcla1 de 93 hrs. presenta una absorción de casi el doble en comparación con la muestra control de 93 horas.

Se sabe que el HA contiene 2 antioxidantes principales: ácido ascórbico y glutatión (Goel et al., 2010), los cuales protegen a las células de agentes reactivos como radicales li-

bres y peróxidos. Además, el glutatión es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glicina (Gly), glutamato (γ -Glu) y cisteína (Cys), responsables para la formación de enlaces cruzados entre moléculas de glutatión (Beharry, 2012). Experimentos realizados por (Beharry, 2012) sobre foto-interruptores basados en estructuras del tipo diaminoazobenceno, demuestran la existencia de enlaces cruzados entre dos moléculas de glutatión, mediante un enlace de azobenceno que une dos moléculas de cisteína. Como parte de sus resultados, obtienen un pico característico en el espectro de absorción centrado en ≈ 410 nm, el cual se observa al ir variando el pH entre 2 y 7 (Ver Fig. 38). Por lo tanto, según los resultados obtenidos por el grupo de Andrew Beharry, se puede atribuir la banda de absorción que se observa centrada en ≈ 410 nm en la Fig. 37, a la creación de puentes del tipo azobenceno entre moléculas de glutatión reducidas.

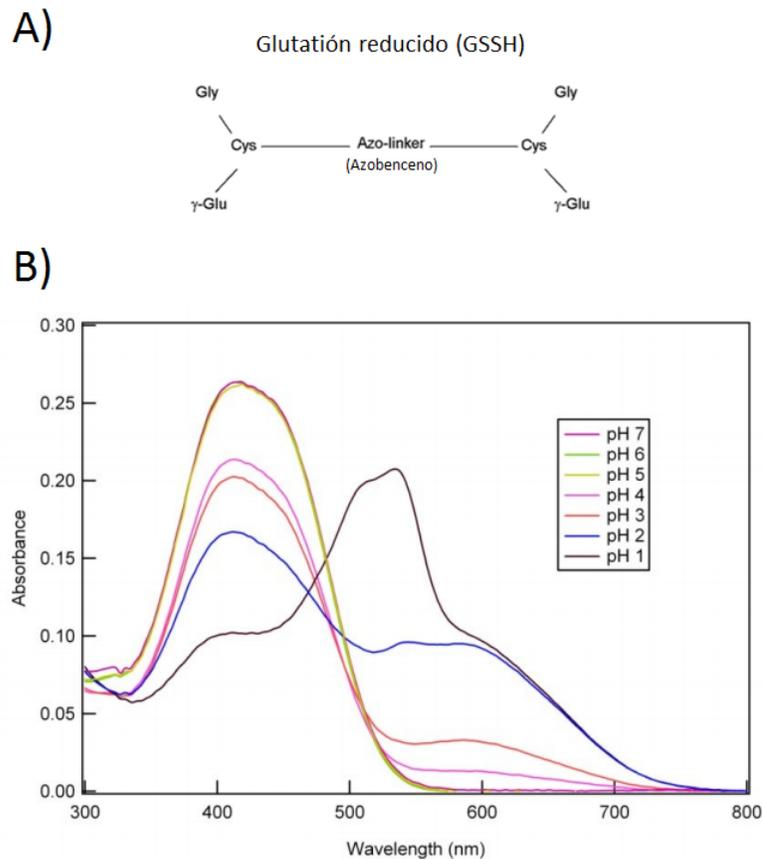


Figura 38: (A) Enlace cruzado del azobenceno entre moléculas de glutatión reducidas (GSSH, por sus siglas en inglés) y (B) Espectro de absorción UV-VIS del enlace tipo azobenceno en solución buffer a una serie de valores de pH (Beharry, 2012).

4.3. Técnica STM: aplicación en cubetas de cuarzo o plástico con HA

Los primeros resultados de la aplicación de la técnica STM en una cubeta de plástico con H.A y utilizando la lente L_1 ($f = 12$ mm), se muestra en la figura 39, donde se puede observar que tanto el radio máximo R_{max} como el 1^{er} tiempo de colapso τ_c de la primer burbuja de cavitación dependen de la energía depositada por el pulso de bombeo, es decir, si se incrementa la energía del pulso de bombeo, lo hará también el factor de conversión a energía contenida dentro de la burbuja (Ver Sec. 2.4.2.1). Parte de la energía del pulso de bombeo cedida para la generación de la burbuja de cavitación, será convertida en energía potencial, la cual posteriormente provocará la expansión de la burbuja hasta alcanzar su radio máximo; punto donde la presión externa (medio) es igualada por la presión interna (presión de vapor dentro de la burbuja) y la temperatura dentro de la burbuja ha disminuido. Posteriormente la burbuja entrará en una etapa de colapso, durante la cual nuevamente aumenta la temperatura y la presión del gas contenida dentro de la burbuja; sin embargo, ahora se dispone de menor energía potencial para generar una segunda burbuja de cavitación y una nueva onda de choque. Este proceso se repite hasta agotar la energía en la formación de subsecuentes burbujas de cavitación y ondas de choque.

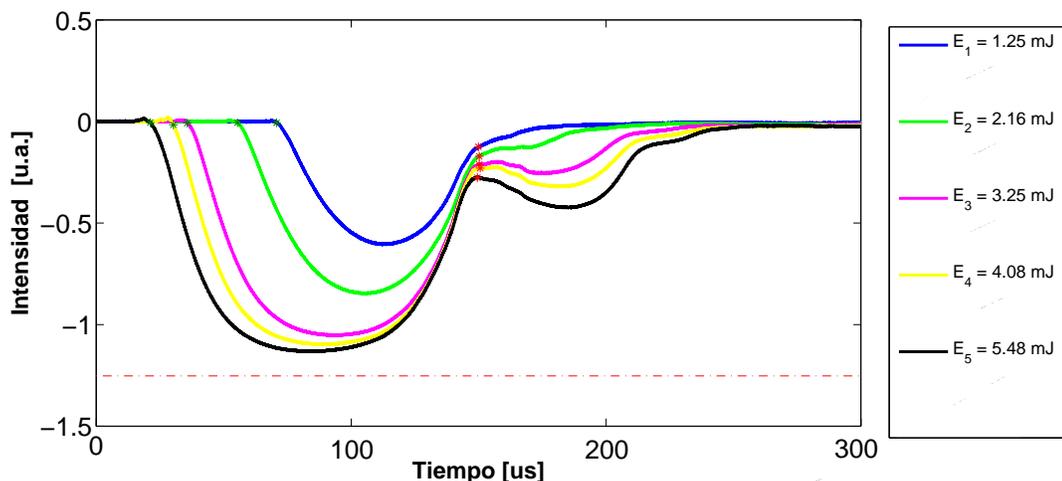


Figura 39: Señal típica de la técnica STM, aplicada en una cubeta de plástico con HA, para distintos valores de energía de bombeo. La presión externa es de 7 mmHg por encima de la presión atmosférica. La línea punteada indica la diferencia de amplitud máxima que se puede alcanzar, ya sea por la ausencia de la burbuja o cuando el diámetro de la burbuja el diámetro del haz de prueba.

De las señales STM mostradas en la Fig. 39 se observa que al incrementarse la energía de bombeo, el radio de la burbuja y el primer tiempo de colapso, también lo harán. Se

puede observar que a energías superiores a 3.25 mJ el primer tiempo de colapso queda bien definido dado el crecimiento de la 2^{da} burbuja que se genera. Sin embargo, el diámetro de la burbuja empieza a rebasar el diámetro del haz de prueba ($\varnothing = 2.7$ mm, FWHM), por lo que se observa cómo la traza empieza a aplanarse en la zona donde la burbuja alcanza su radio máximo, esto se acentúa a energías superiores a 5.48 mJ.

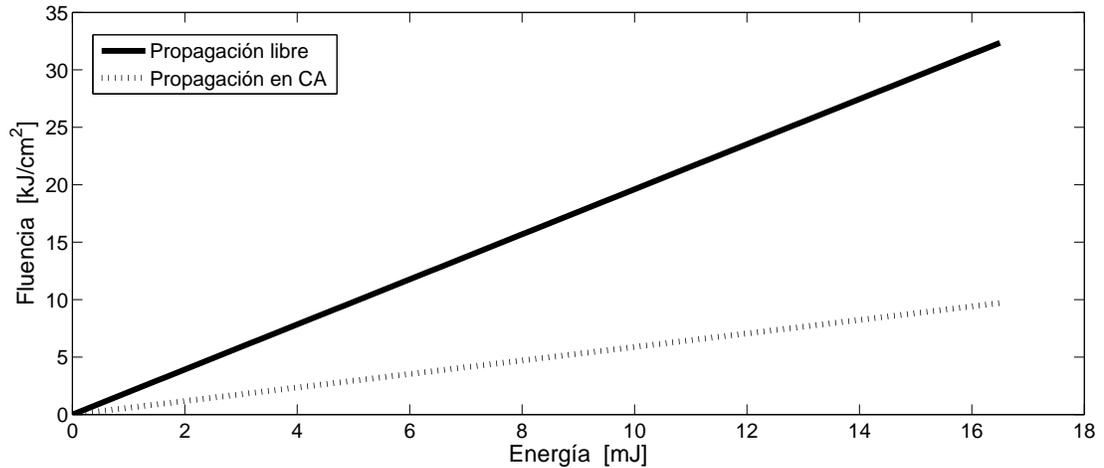


Figura 40: Relación de E_p del haz de bombeo, en el rango de 1 a 16.5 mJ, con su correspondiente valor de fluencia utilizando la lente $L_1(f = 12\text{mm})$. El área de la cintura del haz corresponde a la obtenida experimentalmente y mostrada en la tabla 7 en propagación libre (línea continua) y a la corregida por los efectos de refracción de la córnea (línea punteada).

La figura 41 demuestra que el 1^{er} tiempo de colapso depende directamente de la energía del pulso E_p , pero inversamente de la presión ejercida externamente. Los valores de E_p fueron de: 3.25, 4.08 y 5.48 mJ, su correspondencia en fluencia se pueden ver en la Fig. 40.

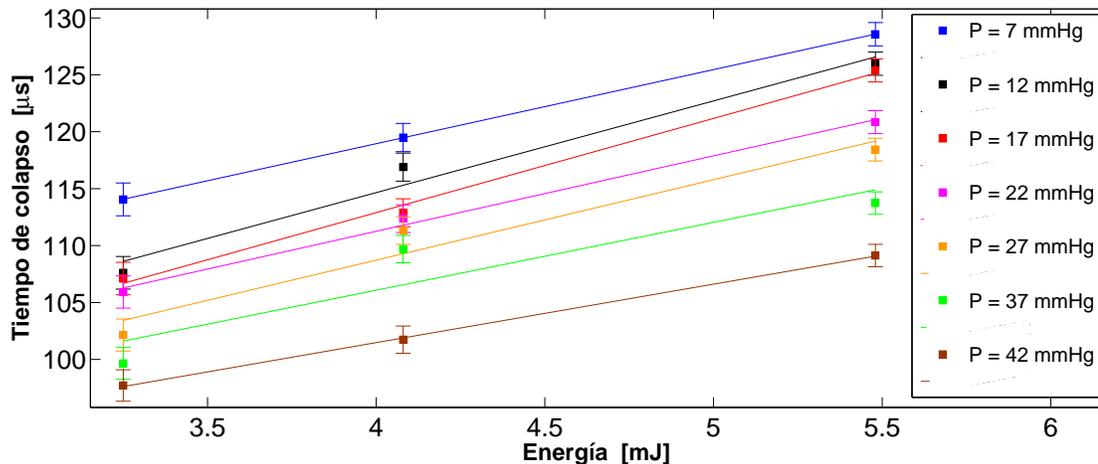


Figura 41: 1^{er} tiempo de colapso para tres valores de energía del pulso de bombeo y presión externa ejercida dentro del rango clínico de la PIO sobre la presión atmosférica en cubeta de plástico.

Es importante recordar que la motivación de este trabajo es poder utilizar el fenómeno de cavitación en conjunto con la técnica STM para implementarlo como un instrumento tonométrico para el diagnóstico del glaucoma, por lo que en ésta etapa corresponde determinar las curvas de calibración de P vs τ_c en el rango de la PIO: 10 a 60 mmHg; utilizando como medio sólo al HA. Posteriormente, se considera la CA de un ojo de cerdo *ex-vivo*. En este sentido, otra representación de la Fig. 41 es la que se muestra en la figura 42, donde se puede observar como el 1^{er} tiempo de colapso depende inversamente de la presión externa aplicada mediante el sistema de presurización vía el nervio óptico.

Los tiempos de colapso de la figura 42 fueron obtenidos al aplicar una presión externa en el rango de 10 a 46 mmHg, en incrementos de 2 mmHg, y usando una fluencia de 23 kJ/cm^2 . Los tiempos de colapso muestran un cambio promedio de 2 a 3 μs por cada 2 mmHg. Existen tres datos en 10, 26 y 44 mmHg que se desvían de la mayoría, esto puede deberse a las fluctuaciones pulso a pulso en la energía del pulso de bombeo.

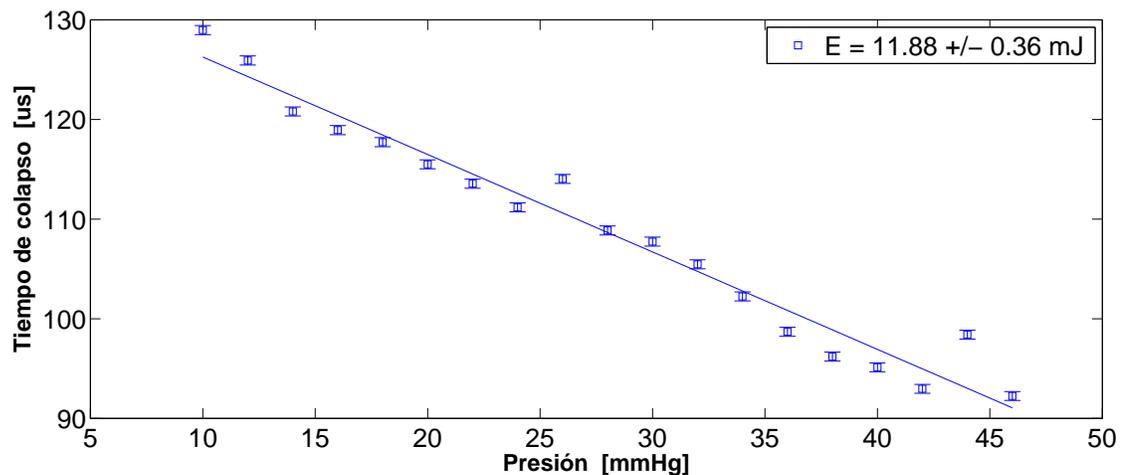


Figura 42: 1^{er} tiempo de colapso a distinta presión externa ejercida sobre la presión atmosférica en cubeta de plástico con HA. La pendiente m en base al ajuste lineal es de $\approx 0.97 \text{ us/mmHg}$.

Al paso de varias horas de irradiación del haz de bombeo sobre la cubeta de plástico, se observó daño por ablación en la superficie donde se incidía en la cubeta, provocando pérdidas de energía y teniendo como consecuencia la afectación en la dinámica de la burbuja de cavitación la cual depende de la energía del pulso de bombeo. Para resolver esta problemática, se sustituyó la cubeta plástico por una de cuarzo, la cual tiene una absorción despreciable para $\lambda = 532 \text{ nm}$, lo que se traduce en un umbral de ablación alto en la superficie de la cubeta de tal forma que se elimina el daño a las energías o fluencias requeridas para generar las burbujas de cavitación. Cabe mencionar que el

resultado presentado en la Fig. 42, fue obtenido en una cubeta de plástico libre de daño por ablación.

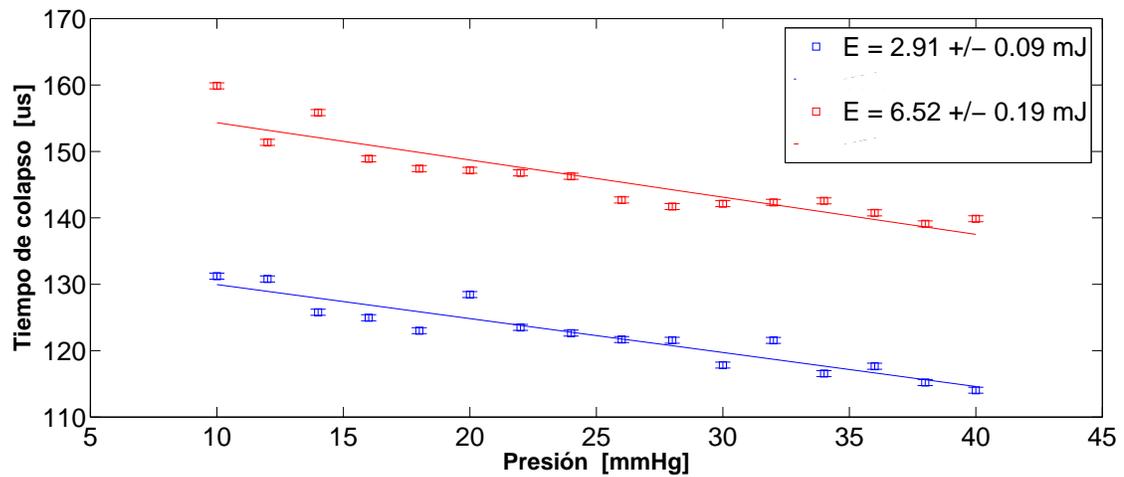


Figura 43: 1^{er} tiempo de colapso a distintas presiones externas sobre la presión atmosférica en cubeta de cuarzo con HA. La pendiente m en base al ajuste lineal es de $m(2.91 \text{ mJ}) \approx 0.5 \text{ us/mmHg}$ y $m(6.52 \text{ mJ}) \approx 0.6 \text{ us/mmHg}$.

La Fig. 43 muestra los resultados obtenidos mediante la técnica STM para una cubeta de cuarzo con HA y fluencias de 5.7 y 12.8 kJ/cm^2 , que corresponden a 2.91 y 6.52 mJ , respectivamente. Al utilizar una energía de 6.52 mJ se puede observar que se registró un tiempo de aproximadamente $160 \text{ } \mu\text{s}$ para el 1^{er} colapso a una presión externa de 10 mmHg , mientras que con la cubeta de plástico (Ver Fig. 42) bajo la misma presión externa aplicada, pero casi el doble del valor de energía, se registró un tiempo de alrededor de $129 \text{ } \mu\text{s}$. Sin hacer un análisis exhaustivo, se puede que los tiempos de colapso sean menores para la cubeta de plástico con respecto a la de cuarzo, esto debido al hecho de que el plástico al tener un mayor coeficiente de absorción en la región del visible, en comparación con el del cuarzo, transmita menor energía y por lo tanto se tiene menor energía disponible en la región focal del haz de bombeo en comparación con el caso de una cubeta de cuarzo, para la cual la energía del haz de bombeo es transmitida casi por completo. Por otro lado, es importante recordar que el medio que se está utilizando está compuesto de: iones, enzimas, proteínas, aminoácidos, etc., disueltos en agua, al detenerse los procesos biológicos que mantienen su equilibrio, inicia su desintegración y/o la formación de moléculas más complejas. En este sentido, por ejemplo, la energía requerida para poder realizar cavitación en un muestra con 1 ó 2 días *post-mortem* no será la misma, porque las propiedades ópticas del medio cambian significativamente (Ver

Fig. 37). En el resultado obtenido para los tiempos de colapso usando la cubeta de plástico (Ver Fig. 42), se utilizó HA de ojos de cerdo de 4 días *post-mortem*, mientras que la cubeta de cuarzo (Ver Fig. 43) se utilizó HA del mismo día de recolección de los ojos de cerdo.

Con el objetivo de optimizar la detección del 1er. tiempo de colapso y tener una mayor distancia de trabajo entre la córnea y la lente que permita mayor libertad al incidir con los haces de bombeo y prueba, se cambió la lente L_1 de $f = 12$ mm por una de 25.4 mm, para determinar la fluencia “umbral” que permite la detección precisa del 1er. tiempo de colapso al formarse la segunda burbuja. La Fig. 44 muestra 3 señales STM tras haber realizado 3 disparos del haz de bombeo a una misma energía $E_p = 9.33$ mJ, la cual corresponde a una fluencia de 9.4 kJ/cm². De la figura se puede observar cómo la amplitud de la traza para la primer burbuja alcanza un valor de 0.2 y el primer tiempo de colapso se puede identificar con ayuda de la traza de la segunda burbuja. Cuando se usa la lente de $f = 12$ mm, la energía umbral para detectar el 1er. tiempo de colapso fue de ≈ 3.25 mJ (Ver Fig. 39), 3 veces menor que la requerida con la lente de 25.4 mm; además, se observa que la amplitud de la señal con la lente de 12 mm es 5 veces mayor.

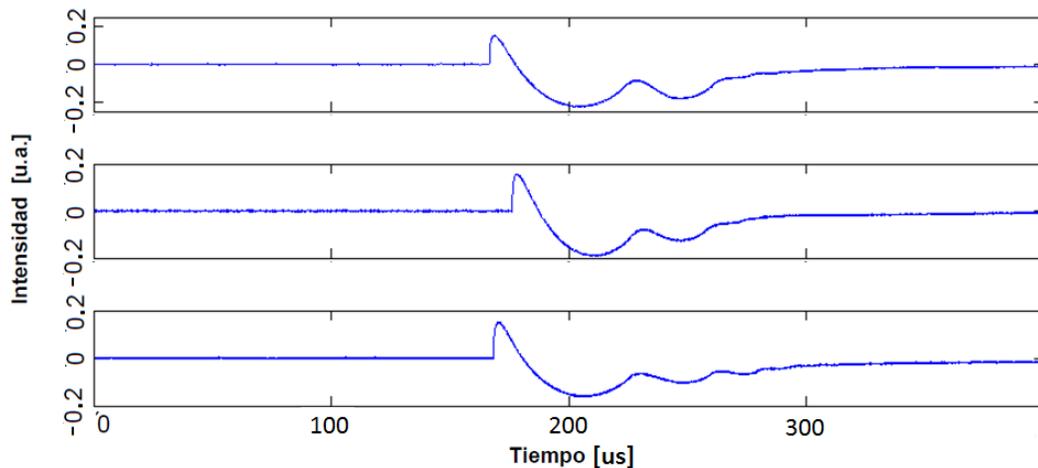


Figura 44: Señales típicas STM obtenidas en una cubeta de cuarzo con HA, sin presurizar, con una energía $E_p = 9.33$ mJ y utilizando una lente $L_1 = 25.4$ mm.

Debido a que el uso de la lente $f = 25.4$ mm requiere de mayor energía para alcanzar el umbral de cavitación en cubeta de cuarzo con HA y a pesar de la ventaja de tener una mayor distancia de trabajo que con la lente de $f = 12$ mm, se vuelve inviable para la generación de cavitación dentro de la CA de los ojos de cerdo, ya que se utilizaría mayor

energía que la usada con la de lente de $f = 12$ mm, y en consecuencia aumentaría la probabilidad de daño láser en los tejidos oculares. Por lo tanto, la generación de cavitación en ojos de cerdo *ex-vivo* se realizó utilizando la lente $f = 12$ mm.

Como complemento a los resultados aquí expuestos sobre cavitación inducida en HA con un láser pulsado de nanosegundos (Nd:YAG, 5 ns, 532 nm), se realizaron experimentos de cavitación láser con un haz de bombeo en el régimen de femtosegundos (Ti:Zafiro, 120 fs, 795 nm), con el fin de poder comparar el comportamiento de las burbujas de cavitación en función de la energía del pulso de bombeo y de la presión ejercida (dentro del rango de la PIO), con las obtenidas con el láser pulsado de nanosegundos.

Cabe mencionar que gracias al apoyo y colaboración que se tiene con el grupo de Óptica de la Universidad de Salamanca (USAL), España, en específico con el Dr. Javier Rodríguez Vázquez de Aldana, se pudieron realizar los experimentos de cavitación inducida con el sistema láser de femtosegundos (Ti:Zafiro) de la USAL.

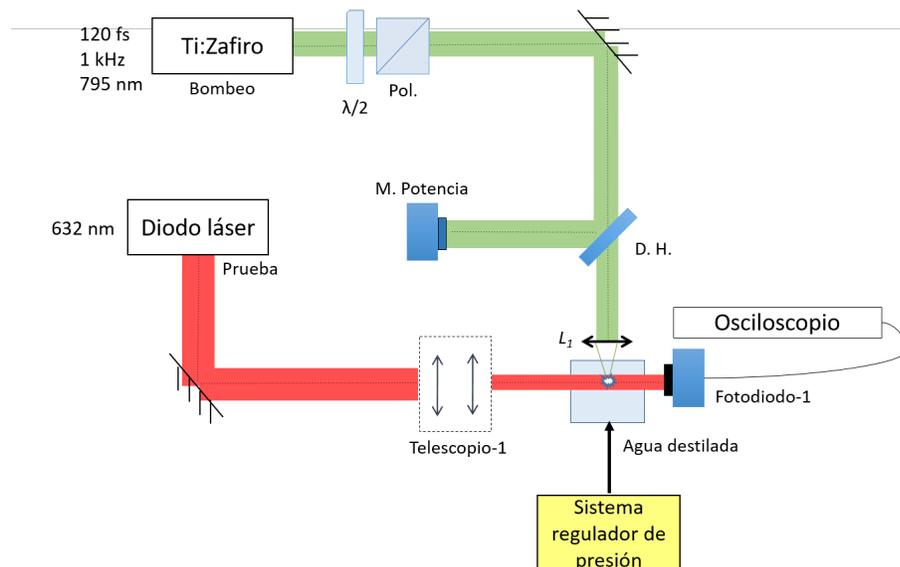


Figura 45: Arreglo óptico de la técnica STM en cubeta de cuarzo con agua destilada bajo un sistema de presurización.

El arreglo óptico utilizado de la técnica STM para la generación de cavitación se muestra en la Fig. 45, el cual está compuesto de: (i) haz de bombeo (Ti:Zafiro, 120 fs, 795 nm), (ii) sistema atenuador, (iii) brazo con un medidor de potencia para monitorear la energía depositada del haz de bombeo y (iv) una lente positiva $L_1 = 15$ mm para la generación de cavitación. Por otro lado, para registrar la dinámica de las burbujas de cavitación se utilizó un diodo láser (632 nm) como haz de prueba, en conjunto con un telescopio com-

presor tipo Kepleriano para obtener a la salida un diámetro del haz de $\approx 800 \mu\text{m}$, además se usó un fotodiodo de respuesta rápida (DET10A modificado, Thorlabs) y un osciloscopio (TDS3052B, Tektronix). Se utilizó una cubeta de cuarzo con agua destilada como medio para la generación de las burbujas de cavitación y el mismo sistema de presurización descrito en la sección 3.2.

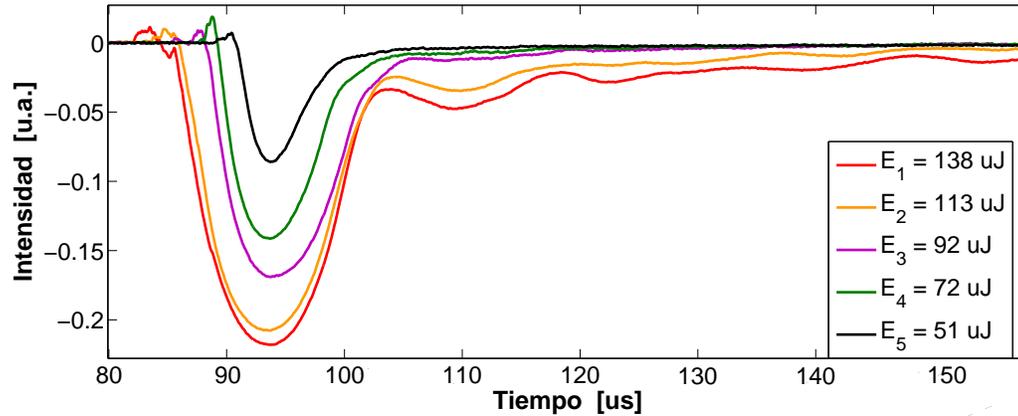


Figura 46: Señales típicas STM utilizando pulsos de 120 fs, 1 kHz a 795 nm.

Las señales típicas STM sin presurizar y con energías por pulso de hasta $138 \mu\text{J}$ se muestran en la figura 46, donde para energías menores a $113 \mu\text{J}$ no es claro donde ocurre el 1er. tiempo de colapso. Por otro lado, todas las señales presentan un aumento en la intensidad al inicio de la generación de cavitación, el cual se debe al utilizar un filtro paso alto con una longitud de onda de corte $\lambda_c = 600 \text{ nm}$ y entonces registrar la señal del pulso del haz de bombeo a 795 nm, principalmente.

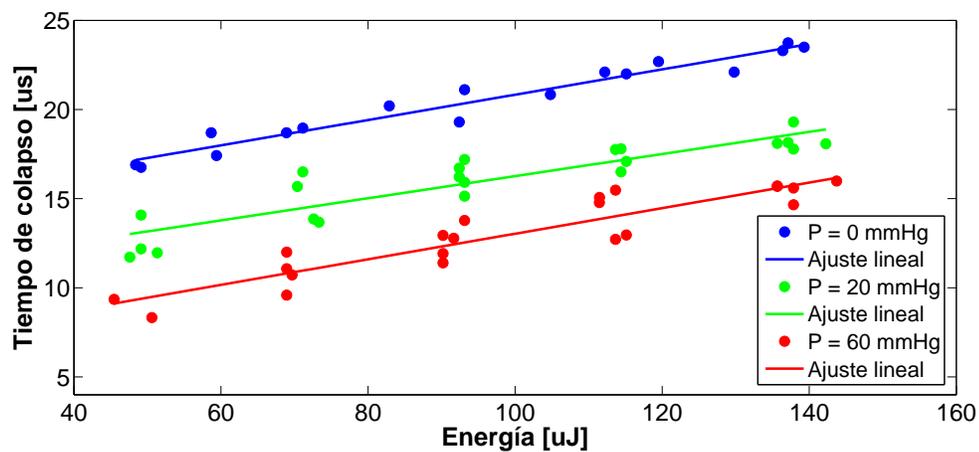


Figura 47: 1er. tiempo de colapso en función de la energía del haz de bombeo a 3 presiones externas en un medio de agua destilada.

La figura 47 muestra la dependencia del primer tiempo de colapso de las burbujas de cavi-

tación en función de la energía de bombeo y la presión externa ejercida. Las condiciones bajo las cuales se obtuvieron los datos fueron: tomando un promedio de 64 muestras por señal STM, aplicando 5 valores de energía del pulso de bombeo (a 1KHz de tasa de repetición): 50, 70, 90, 110, y 140 μJ , y cada uno bajo 3 condiciones de presión externa: 0, 20 y 60 mmHg.

De la Fig. 47 se puede ver que el 1er. tiempo de colapso obtenido con energías de alrededor de 140 μJ y presión externa de 0 mmHg, es de $\approx 23 \mu\text{s}$, mientras que (Devia-Cruz et al., 2012) obtuvo valores de $\approx 70 \mu\text{s}$ en agua destilada utilizando un láser de nanosegundos (Nd:YAG, 532 nm, $E = 1472 \mu\text{J}$), bajo las mismas condiciones de presión externa. Ésta disminución en el 1er. tiempo de colapso al pasar de pulso de bombeo de nanosegundos a uno de femtosegundos, se debe a que la energía acoplada a la burbuja de cavitación disminuye al disminuir la duración del pulso y por lo tanto la burbuja alcanza un menor tamaño para pulsos ultracortos (Hammer et al., 1998):

- Una gran fracción de la energía del pulso es requerida para evaporar el volumen focal y entonces es menor la energía disponible para excitar procesos mecánicos.
- De la energía remanente un gran porcentaje es transmitida (Ver tabla 12), es decir, no se absorbe en el plasma como es el caso en generación de cavitación con pulsos de nanosegundos.

Tabla 12: Energía transmitida durante la generación de cavitación en agua destilada para distintas duraciones de pulso (Hammer et al., 1998).

Duración del pulso	Longitud de onda (nm)	Energía ($E_{in}/\mu\text{J}$)	Transmisión (%)
76 ns	750	33 000.0	4 ± 1
6 ns	1064	730.8	7 ± 1
60 ps	532	24.6	52 ± 3
3 ps	580	3.1	77 ± 2
300 fs	580	1.7	59 ± 10
100 fs	580	1	49 ± 2

La Fig. 48 es otra representación de la Fig. 47, la cual se obtuvo aplicando una presión externa de 0 a 60 mmHg; en pasos de 5 mmHg, 140.8 μJ de energía por pulso y promediando 64 muestras por señal STM.

Se demuestra claramente el efecto de la presión externa sobre la presión del vapor creado dentro de la burbuja, ya que al ir aumentando la presión externa existe una mayor fuerza

que se opone al crecimiento de la burbuja y entonces, el radio máximo de la burbuja R_{max} disminuye, y por lo tanto se registra una disminución en el 1er tiempo de colapso a medida que se va aumentando la presión externa ejercida.

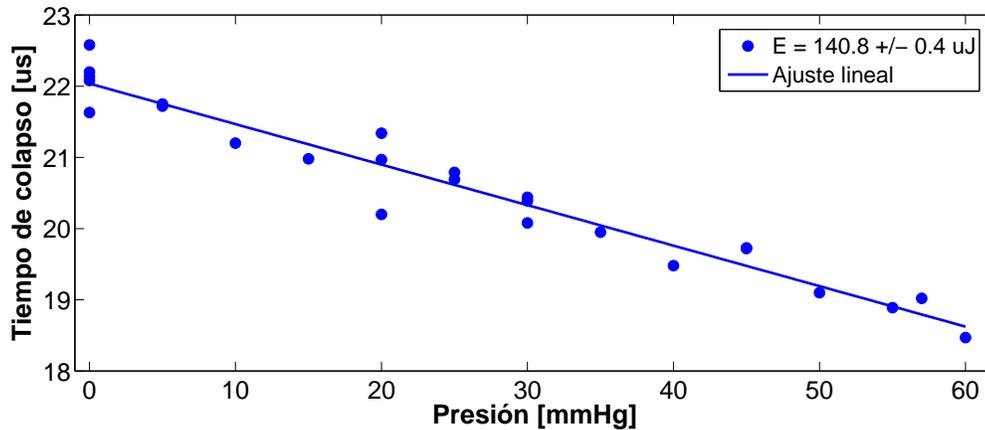


Figura 48: 1er. tiempo de colapso en función de la presión externa ejercida (sobre la presión atmosférica) en un medio de agua destilada. $m \approx 0.06$ us/mmHg.

4.4. Técnica STM: aplicación en ojos de cerdo *ex-vivo*

4.4.0.1. Presión vs tiempo de colapso, en ojo de cerdo *ex-vivo*

La figura 49 muestra los resultados obtenidos mediante la técnica STM adaptada dentro de la CA de un ojo de cerdo *ex-vivo*. Se muestra una de las trazas típicas STM que se obtienen al inducir las burbujas de cavitación dentro de la CA de los ojos de cerdo a una profundidad de ≈ 1 mm respecto a la superficie corneal.

En la parte inferior de la Figura 49 se pueden observar 3 situaciones: (1) la generación y colapso de la burbuja de cavitación, (2) un incremento abrupto en la intensidad de la traza, posterior al colapso de la segunda burbuja y (3) formación de un mínimo en la traza de intensidad que indica la formación de una burbuja de mayor tamaño al alcanzado por la primer burbuja. La diferencia entre las señales STM de la Fig. 39 y la Fig. 49(inferior) se debe principalmente a las fronteras que causan efectos de interferencia después del colapso de la primer burbuja.

Después del primer colapso ocurre la formación de múltiples microburbujas debido, entre otras cosas, al chorro de vapor que surge con el movimiento del colapso, o bien debido

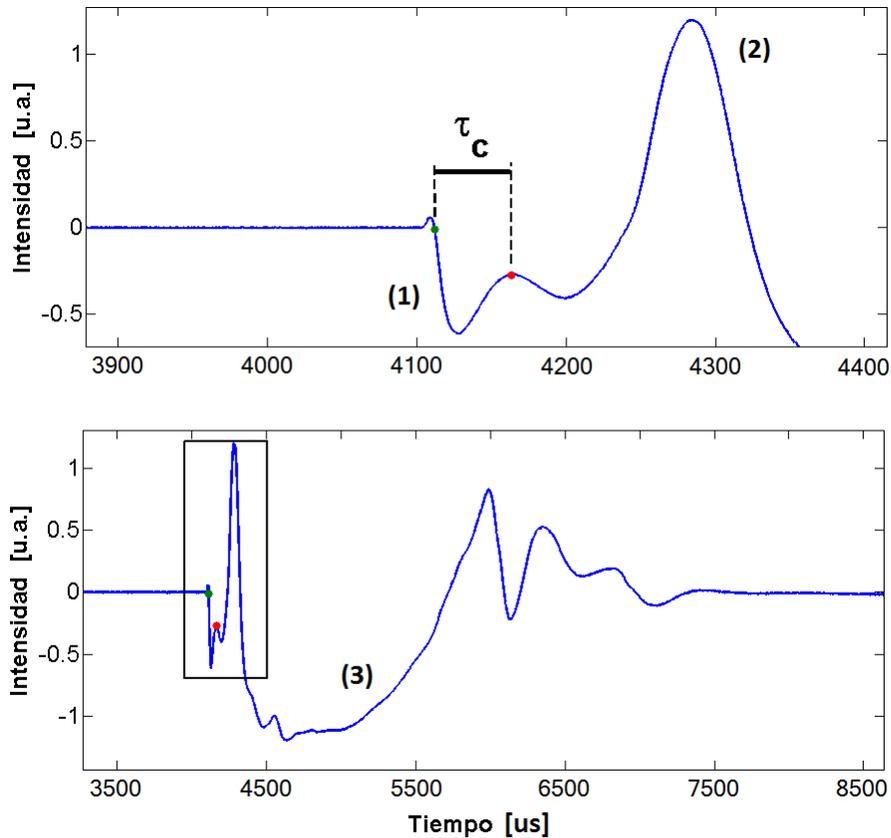


Figura 49: Señal típica STM adaptada a la CA de un ojo de cerdo *ex-vivo*.

al gradiente de presión que se genera por la proximidad de una superficie (córnea e/o iris) (Tinguely, 2013; Vogel, 1989). Por lo tanto, se puede pensar que después del primer colapso y durante un lapso muy corto de tiempo, se tiene una densidad alta de microburbujas en el volumen del haz de prueba. Estas burbujas contribuyen por efectos de refracción a redireccionar la luz esparcida del haz de prueba observándose un aumento abrupto y de corta duración en la amplitud de la traza después del primer colapso. Las microburbujas se empiezan a disgregar, por lo que ahora las microburbujas están muy separadas entre sí contribuyendo ahora de manera negativa; cada una se puede pensar como un centro esparcidor de la luz, y entonces se registra una disminución paulatina en la cantidad de luz que detecta el fotodiodeo.

En la figura 50 se muestran trazas STM en ojos de cerdo para tres energías del pulso de bombeo. Se observa que la burbuja mantiene su simetría durante el crecimiento y hasta su primer tiempo de colapso, tal y como lo predice la teoría (Ver Sec. 2.4.2). Además, se demuestra que al ir aumentando la energía de bombeo también se incrementan el diámetro y el primer tiempo de colapso de la burbuja de cavitación. Se puede ver también que

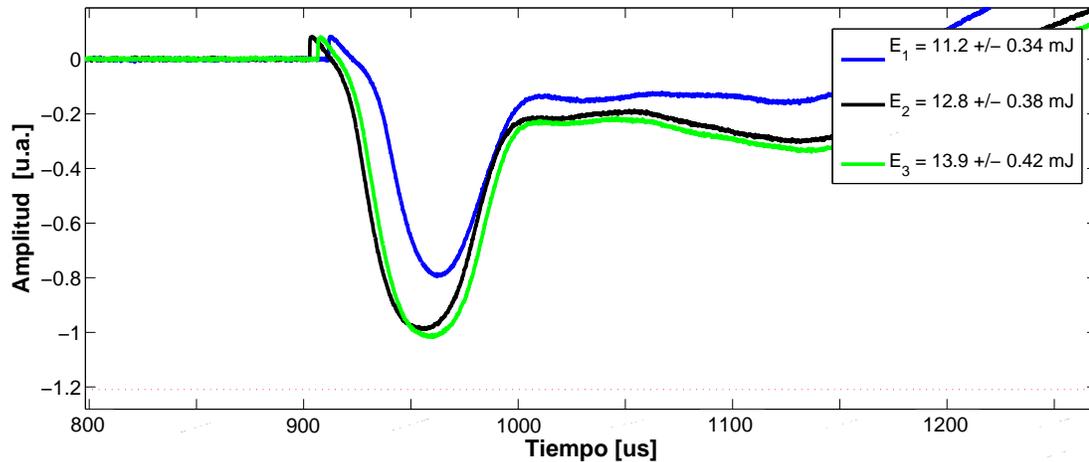


Figura 50: Señal STM aplicada en ojo de cerdo *ex-vivo* variando la energía del pulso de bombeo. La línea punteada indica la diferencia de amplitud máximo que se puede alcanzar.

se requieren de energías de bombeo mayores de 11 mJ para poder medir con precisión el primer tiempo de colapso. Notar que se requirió de menor energía ($\approx 3.25 \text{ mJ}$) para distinguir con claridad el primer tiempo de colapso en el caso de la cubeta de plástico con HA (Ver Fig. 39) en comparación con el caso de la CA de un ojo de cerdo. Éste hecho se debe a que para el caso de cavitación en el modelo de ojo de cerdo, se tienen que compensar las pérdidas de energía por absorción lineal, reflexión y esparcimiento en la córnea. Además, debe tomarse en cuenta que la geometría de la córnea y los cambios en el índice de refracción en los distintos estratos hasta la CA, inducen por refracción un aumento en el tamaño del haz enfocado, lo que se traduce en una disminución en la fluencia depositada, comparada con la que se obtiene en la cubeta de plástico con HA. En el modelo de ojo de cerdo se tienen más pérdidas de energía y por ello se requiere de mayor energía de bombeo para compensar dichas pérdidas.

El primer tiempo de colapso en función de la presión externa ejercida (dentro del rango de la PIO: 10-60 mmHg), se muestra en la Fig. 51 para dos fluencias 7.8 y 9.9 kJ/cm^2 . Se hace referencia a tres tipos de ojos utilizados en función del diámetro del globo ocular \varnothing_g en la dirección transversal: CH, M y G, definidos como: $\varnothing_g < 2.6 \text{ cm}$, $\varnothing_g = 2.6 \text{ cm}$ y $\varnothing_g > 2.6 \text{ cm}$, respectivamente.

De la Fig. 51(OjoM) se observa cómo τ_c disminuye al ir aumentando la presión, corroborando la tendencia esperada según los resultados de la Fig. 43 de cavitación con HA dentro de una cubeta de cuarzo. De la misma figura, si se aumenta la energía del haz de

bombeo de 13 a 16.4 mJ, se observa que τ_c se incrementa debido a que se está transfiriendo mayor energía del pulso de bombeo a la burbuja. De igual forma que en el OjoM, pero para el OjoCH, τ_c disminuye al ir aumentando la presión.

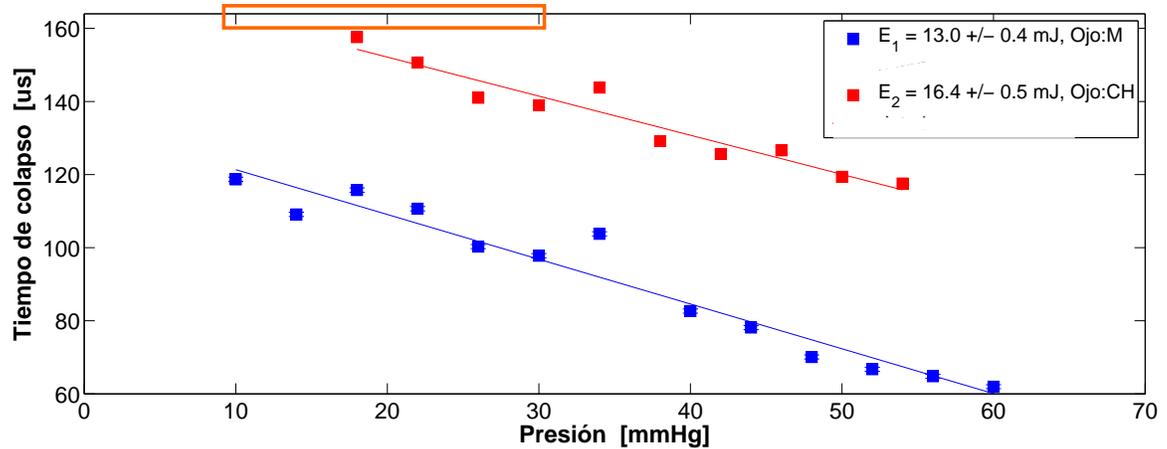


Figura 51: 1^{er} tiempo de colapso promediado utilizando 2 ojos de cerdo a distintas presiones externas (sobre la presión atmosférica). La pendiente m en base al ajuste lineal es de $m(13 \text{ mJ}) \approx 1.2 \text{ us/mmHg}$ y $m(16.4 \text{ mJ}) \approx 1.05 \text{ us/mmHg}$. El rectángulo superior naranja indica la zona por efectos de acomodación del ojo de cerdo en la CA.

Según los resultados mostrados por (He et al., 2012) sobre el efecto de acomodación que ocurre en ojos de cerdo *ex-vivo*, al presurizarlos vía el nervio óptico hacia la cámara del humor vítreo, y para una presión externa aplicada de entre 10 y 30 mmHg (Ver Fig. 51, rectángulo superior naranja), la profundidad de la CA sufre una disminución de $\approx 100 \mu\text{m}$, por lo que en base a los resultados mostrados en la Fig. 51, la técnica STM resultaría ser insensible a los efectos de acomodación reportados por (He et al., 2012), ya que se esperaría observar en esta región de presión una afectación en la tendencia de disminución en el tiempo de colapso o bien una mayor dispersión en los datos debido al acercamiento de las fronteras (iris y córnea).

Por otro lado, del ajuste lineal aplicado a los datos del OjoM, se obtiene una pendiente m de aproximadamente $1.2 \mu\text{s/mmHg}$, valor que comparado con los resultados preliminares de cavitación en ojos de cerdo por (Martínez, 2015), es al menos dos veces mayor; ya que el obtuvo una pendiente de $\approx 0.48 \mu\text{s/mmHg}$. Ésta diferencia se le puede atribuir principalmente a las condiciones de alineación para capturar las señales STM y no a los parámetros fisiológicos de cada ojo. Éste punto se puede comprobar al utilizar otro ojo de cerdo de tamaño CH (Ver Fig. 51, OjoCH), para el cual, utilizando la misma configuración de la técnica STM que en el OjoM, se obtuvo una pendiente de $m(16.4$

mJ) $\approx 1.05 \mu\text{s}/\text{mmHg}$, siendo ambas del mismo orden. Un punto importante a considerar con respecto a las pendientes obtenidas es que el optimizar la alineación de la configuración STM permite incrementar la pendiente m de la curva P vs τ_c , lo cual significa una mayor sensibilidad, es decir, se pueden diferenciar con mayor claridad τ_c para cambios de presión cada vez más pequeños ($\Delta P < 3 \text{ mmHg}$).

4.4.0.2. Variabilidad del tiempo de colapso en función de la presión y energía de bombeo

Todos los resultados mostrados previamente para τ_c en función de la presión externa ejercida y la energía del pulso de bombeo, fueron obtenidas mediante el promedio estadístico de 16, 32 ó 64 señales STM. A continuación, se muestran los resultados de τ_c para señales STM sin promediar, esto con el objetivo de conocer si la tendencia de la curva τ_c vs P mantiene el mismo comportamiento, además, de conocer la relación de dispersión al utilizar varios ojos de cerdo.

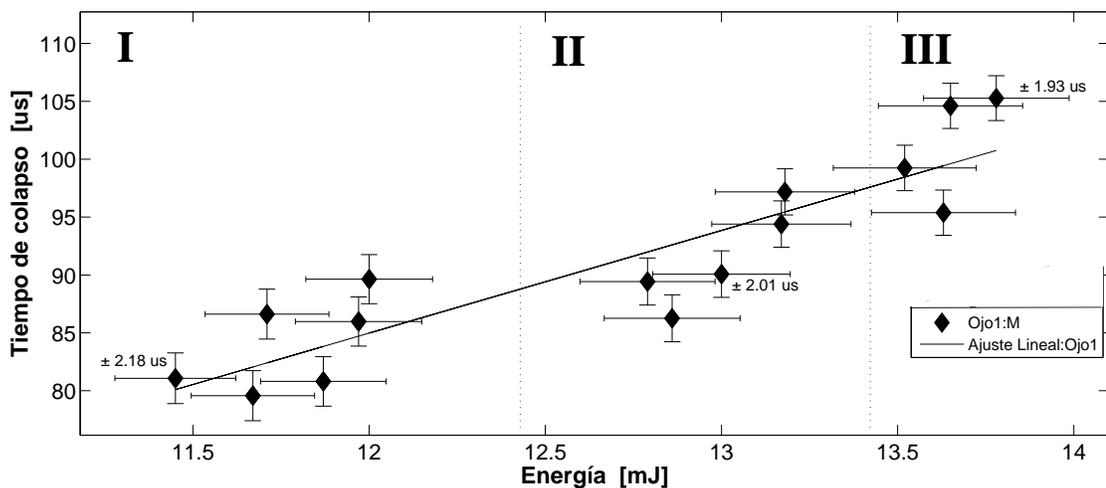


Figura 52: Incertidumbre en la medición del 1^{er} tiempo de colapso. Datos sin promediar en 1 ojo de cerdo a distintas energías de bombeo.

La Fig. 52 muestra la tendencia de τ_c para tres valores nominales de energía de bombeo, para un ojo de tamaño M. Se establecieron tres valores de energía nominal (12, 13 y 13.9 mJ) por pulso. Sin embargo, como se muestra en la gráfica, la energía fluctúa pulso a pulso, por lo que se establecen tres zonas de interés: I, II y III.

De la Figura 52 se puede destacar que: (1) τ_c incrementa al ir aumentando la energía por pulso, demostrando la tendencia observada anteriormente en la Fig. 41, (2) se observa

que la incertidumbre en la estimación de τ_c (aplicando la Ec. 8) disminuye (de ± 2.18 a $1.93 \mu\text{s}$) al incrementarse la energía por pulso; ésto debido a que el proceso de generación de cavitación se vuelve más determinista, y (3) la dispersión σ para cada zona de energía no es concluyente para el número de datos registrados (Ver tabla 13); se observa que la dispersión para este tipo de ojo no sigue una clara tendencia y quizás esto se deba a la utilización de un número insuficiente de datos (3-6) por zona y ojo, los cuales no podrán demostrar un comportamiento estadístico de τ_c .

Tabla 13: Dispersión en el 1er. tiempo de colapso en función de 3 valores de energía de bombeo para 3 ojos de cerdo *ex-vivo*.

No. de ojo	Zona I ($\sigma, \mu\text{s}$)	Zona II ($\sigma, \mu\text{s}$)	Zona III ($\sigma, \mu\text{s}$)
1	4.10	4.46	4.32
2	3.28	3.71	3.80
3	4.83	2.25	1.52

La Fig. 53 muestra la contribución en la dispersión de τ_c con tres ojos de cerdo de la mismas dimensiones. Como en el caso anterior, la contribución de los tres ojos sigue mostrando la tendencia esperada, es decir, τ_c aumenta conforme incrementamos la energía por pulso del haz de bombeo.

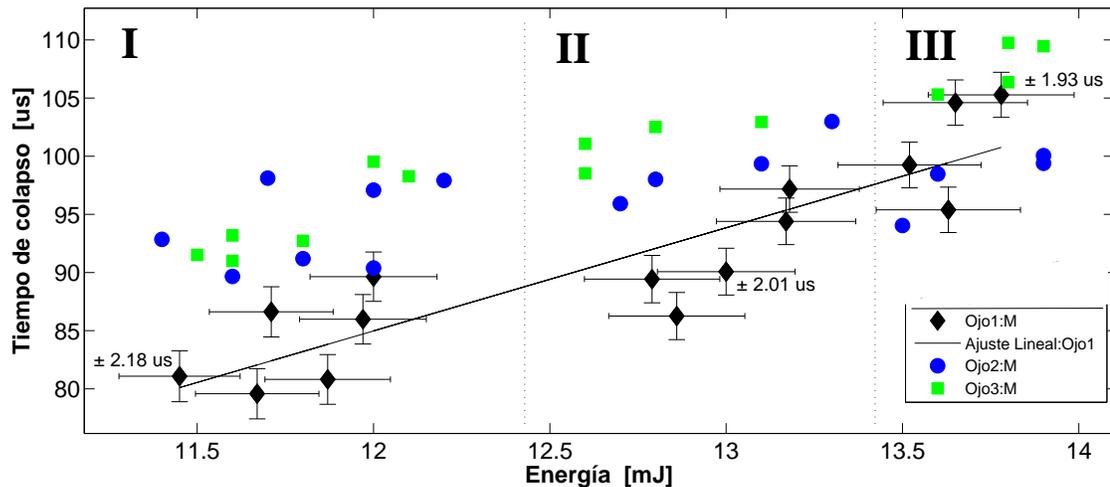


Figura 53: Dispersión del 1^{er} tiempo de colapso sin promediar de 3 ojos de cerdo a distintas energías de bombeo.

Al contar con una mayor cantidad de datos por zona de energía, se calculó la dispersión y el rango intercuartíl (R.I.Q) para la contribución de los 3 ojos de cerdo. Los resultados se muestran en la tabla 14 y se ve claramente como la dispersión y el R.I.Q disminuyen al aumentar la energía por pulso.

Tabla 14: Dispersión en el 1er. tiempo de colapso dentro de 3 zonas de energía de bombeo.

Zona	σ [μs]	R.I.Q. [μs]
I	6.22	9.4
II	6.51	11.89
III	4.99	7.7

Se puede decir que de la tabla 13, el ojo tres fue el único en mostrar una clara tendencia en la disminución de la dispersión de τ_c , por lo que para poder concluir sobre la dispersión de τ_c para c/ojo, se debe contar con un conjunto más grande de datos por ojo y zona de energía. Por otro lado, de la tabla 14, la dispersión y el R.I.Q. mostraron una disminución de $\approx 20\%$ al aumentar la energía del haz de bombeo de ≈ 11.7 a 13.7 mJ.

Por otro lado, es importante conocer si se mantiene la tendencia de τ_c dentro del rango de la PIO en los ojos de cerdo al aplicar sólo 1 pulso de bombeo, ya que ésto reduciría el daño que podría ocasionarse en la interacción del láser con los tejidos oculares.

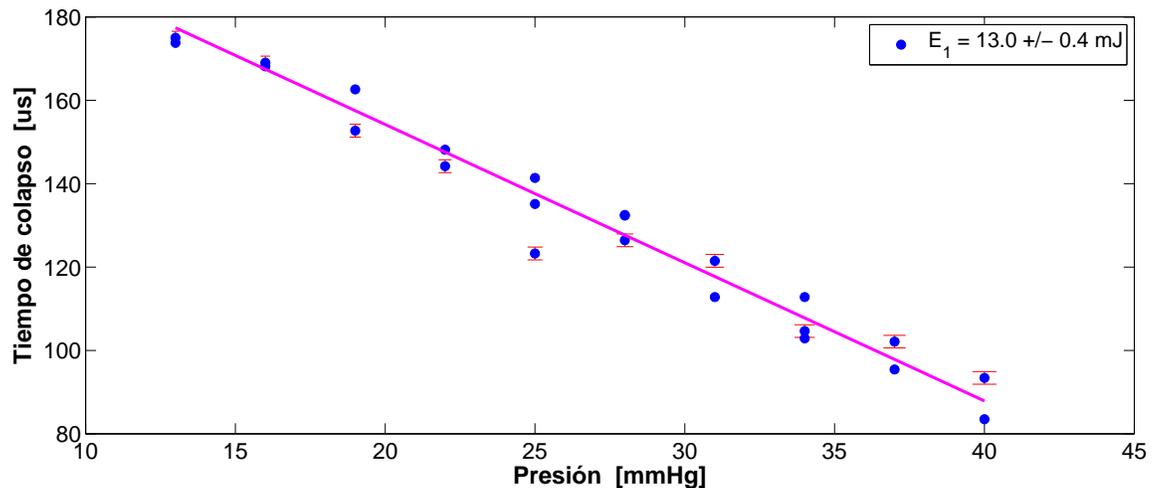


Figura 54: Error en la medición sin promediar del 1^{er} tiempo de colapso de la burbuja de cavitación con 1 ojo de cerdo para distintas presiones (sobre la presión atmosférica).

La Fig. 54 muestra el comportamiento de τ_c al presurizar un ojo de cerdo de tamaño M en un rango de 13 a 40 mmHg, en incrementos de 3 mmHg. Para cada valor de presión se tomaron tres trazas STM sin promediar y sólo en uno de los tres se incluye el error en la estimación de τ_c . Se puede ver que: (1) τ_c sigue la tendencia esperada: al aumentar la presión el tiempo de colapso disminuye, debido a un aumento en la fuerza que ejerce el líquido (HA) en contra del crecimiento de la burbuja, es decir, se alcanza más rápido el equilibrio entre la presión interna (presión del vapor dentro de la burbuja) y la presión

externa (presión del líquido), (2) la dispersión en τ_c para cada valor de presión no es significativa y (3) no se observa una clara sensibilidad a los efectos de acomodación.

Analizando la dispersión de τ_c en función de la presión externa aplicada, pero ahora utilizando 3 ojos de cerdo denominados: Ojo1, Ojo2 y Ojo3, cuyas dimensiones son: M, CH y M, respectivamente, se puede ver que el Ojo2 de tamaño chico presenta una mayor dispersión en los datos. De hecho, los puntos con mayor dispersión en base al ajuste lineal realizado al conjunto de datos de los 3 ojos (Ver Fig. 55, línea continua morada), están dentro de la región de los efectos de acomodación por presurización (He et al., 2012). Por lo tanto, se puede atribuir el aumento en la dispersión de τ_c para ojos chicos, a los efectos de acomodación, no así para ojos medianos, cuya tendencia y dispersión de datos se mantienen sin fluctuaciones considerables.

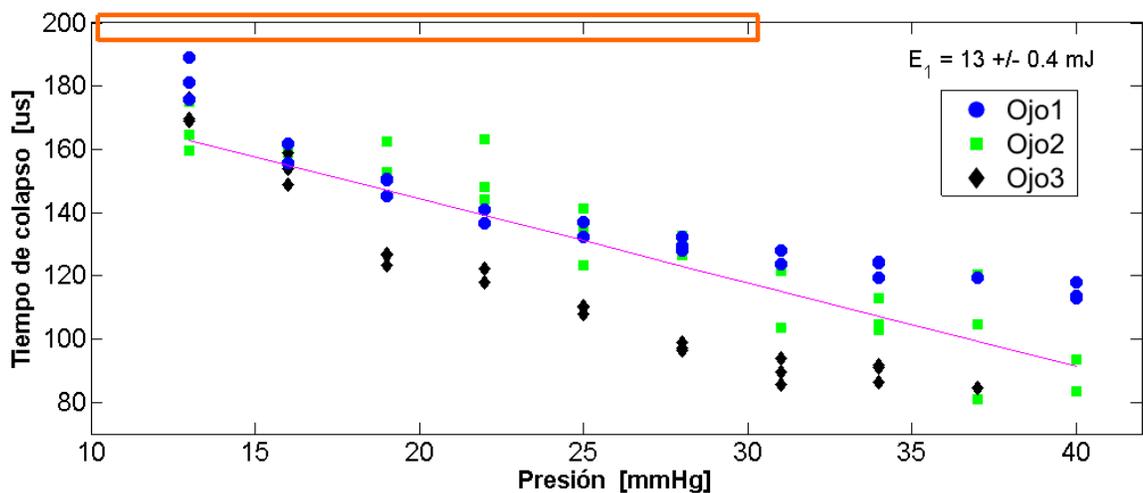


Figura 55: Dispersión del 1^{er} tiempo de colapso sin promediar de 3 ojos de cerdo a distintas presiones (sobre la presión atmosférica). El ajuste lineal corresponde al promedio de los 3 ojos.

4.5. Análisis del fotodaño en córneas de cerdo *ex-vivo*

Gracias al apoyo recibido por el Dr. M. Alberto Kazuhiko Nomura y el Dr. Rodolfo Díaz Argüero del Laboratorio de Patología y Análisis Clínicos de Ensenada, se realizó el análisis histológico mediante la tinción de hematoxilina-eosina de Harris de las córneas irradiadas.

El daño en córneas se evaluó utilizando sólo el haz de bombeo en la configuración para la generación de burbujas de cavitación dentro de la CA de los ojos de cerdo. Se estable-

ció una energía de $E_p = 13$ mJ para las pruebas de fotodaño, ya que sobre este valor se obtuvieron las curvas del tipo P vs τ_c (Ver Fig. 51).

El tejido corneal en ojos de cerdo está compuesto de 4 estructuras: (i) epitelio (superficie de la córnea que está en contacto con el medio exterior), (ii) estroma, (iii) membrana de Descemet y (iv) endotelio (superficie de la córnea que está en contacto con la CA). En la Fig. 56 se muestra una micrografía de una córnea de cerdo *ex-vivo*, en la cual se pueden observar que en el epitelio se distinguen núcleos ópticamente más densos (círculos azules); los cuales corresponden a las células escamosas, intermedias y basales, según la ubicación transversal en el epitelio. El estroma presenta una estructura fibrilar y embedida en él se encuentran los núcleos de queratocitos. Por último, se observa la membrana de Descemet con un espesor de ≈ 10 μm . Para todas las micrografías, el endotelio no se muestra ya que este quizás se desprendió durante el procedimiento histológico.

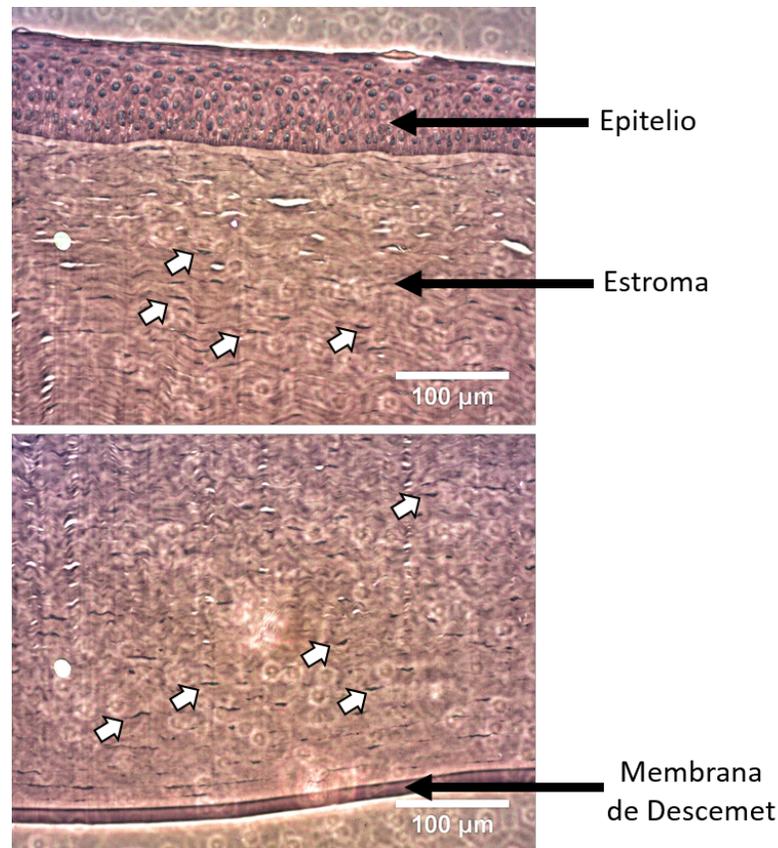


Figura 56: Micrografía de córnea de cerdo *ex-vivo* obtenida de un microscopio óptico de transmisión con contraste de fase. Se indican la presencia de queratocitos (*flechas blancas*) dentro de las fibras de colágeno en el estroma.

Los diez ojos colectados se dividieron en dos grupos con cinco ojos cada uno, donde cuatro de cada grupo fueron irradiados con la misma energía por pulso ($E_p = 13$ mJ),

tasa de repetición (1 ó 10 Hz), presión externa aplicada (13 mmHg) y profundidad de penetración del haz de bombeo (1 mm respecto a la superficie corneal), pero variando el número de pulsos depositados: 1, 20, 200 y 2000. De los dos grupos se conservó un ojo como muestra control sin irradiar para su comparación con los ojos irradiados. Para los pulsos depositados de 1 y 20 se aplicó una tasa de repetición de 1 Hz, mientras que los de 200 y 2000 fue de 10 Hz.

La Figura 57 muestra las micrografías del primer grupo de ojos irradiados por el haz de bombeo. Para ubicar la zona de irradiación se utilizó el daño intencionalmente generado en la superficie del epitelio corneal tras enfocar en dicha superficie el haz de bombeo. Las micrografías: C, E y G (Figs. 57 y 58), muestran un desprendimiento en el epitelio debido a este daño intencional.

Para irradiaciones con 1 pulso (C,D) se observa sólo el daño local en la superficie del estroma; con 20 y 200 pulsos ((E,F) y (G,H), respectivamente) se observa que el daño en el estroma parece desplazarse hacia la membrana de Descemet y con 2000 pulsos (I,J) el daño en estroma se mantiene cercano a la membrana de Descemet, pero se presenta un desprendimiento más marcado del epitelio a lo largo de la capa superficial.

La figura 58 es el resultado del segundo grupo de ojos irradiados bajo las mismas condiciones que el primer grupo. Se puede ver que el daño y su tendencia de desplazamiento en el estroma son similares al caso anterior al ir aumentando de 1 a 2000 pulsos. Además, se confirma el desprendimiento de la capa superficial del epitelio al utilizar 2000 pulsos.

De los resultados observados en las Figs. 57 y 58, se puede decir que no se observó daño (rompimiento o desprendimiento) en la membrana de Descemet por posibles efectos de ondas de choque, burbujas de cavitación o chorros de vapor generados en la CA y que se observó una tendencia de desplazamiento en las fibras de colágeno dañadas dentro del estroma al ir aumentando el número de pulsos utilizados.

Del daño en el estroma se puede especular que: (i) los keratocitos son centros absorbedores a la longitud de onda del haz de bombeo, por lo que se puede inducir un aumento abrupto de la temperatura local que genere una burbuja de cavitación y que la expansión de la misma rompa las fibras de colágeno; (ii) existe un efecto térmico acumulado en el volumen de interacción debido a la energía absorbida del pulso por las estructuras que

conforman la córnea y a la tasa de repetición de los pulsos depositados, donde ésta última hace referencia a la tasa de repetición umbral T_u que ocasiona daño térmico acumulado por interacción láser con tejido blando, definido como (Gemert, 2011):

$$T_u(\text{Hz}) = \frac{1}{10\tau_{th}} \quad (16)$$

donde τ_{th} es el tiempo de difusión térmica del tejido, el cual se expresa como: $\tau_{th} = L^2/4\delta$, con L y δ siendo la longitud de penetración y el coeficiente de difusividad térmica en agua ($\delta = 0.15 \text{ mm}^2/\text{s}$), respectivamente. De la Ec. 16 se establece que si la tasa de repetición aplicada es menor la tasa de repetición umbral T_u , no hay efectos térmicos acumulados en el volumen de interacción. Haciendo uso de la Ec. 16, considerando que la córnea es un tejido blando con más del 80 % compuesto de agua y utilizando el resultado obtenido de $L = 1.86 \text{ mm}$ de la Ec. 13, se obtiene que $T_u \approx 0.01 \text{ Hz}$, el cual es menor a las condiciones de irradiación aplicadas (1 Hz y 10 Hz), por lo tanto, durante las irradiaciones con 20, 200 y 2000 pulsos se tiene un efecto térmico acumulado.

El análisis del daño en el epitelio y el estroma, sugiere que al utilizar 1 pulso de bombeo, debido a la absorción de la energía del pulso por el tejido epitelial, existe transferencia de calor del epitelio hacia la capa más superficial del estroma provocando un aumento de la temperatura local, esto aunado a la presencia de queratocitos que son centros absorbedores de la energía del pulso en ésta zona, por lo tanto se tienen las condiciones para la generación de burbujas de cavitación por aumento abrupto de la temperatura.

Cuando se aumenta la irradiación a 20 pulsos, se tiene el mismo efecto de generación de calor, pero además durante el transcurso de la irradiación se tiene la relajación de las fibras de colágeno expandidas por la generación de cavitación y ocurre además una disminución en la densidad de queratocitos (fotoblanqueo) en ésta zona, por lo que después del 1er. pulso depositado, se generará calor en una capa cada vez más profunda, donde se encuentra una mayor densidad de queratocitos para que nuevamente se creen las condiciones para la generación de burbujas de cavitación. Eventualmente al aumentar la cantidad de pulsos a ≈ 2000 , la generación de calor se propaga hacia el endotelio y por lo tanto el daño avanza cada vez más al fondo del estroma. Por su parte el epitelio alcanza una temperatura crítica tras la absorción de múltiples pulsos lo que ocasiona la

ruptura superficial del tejido epitelial.

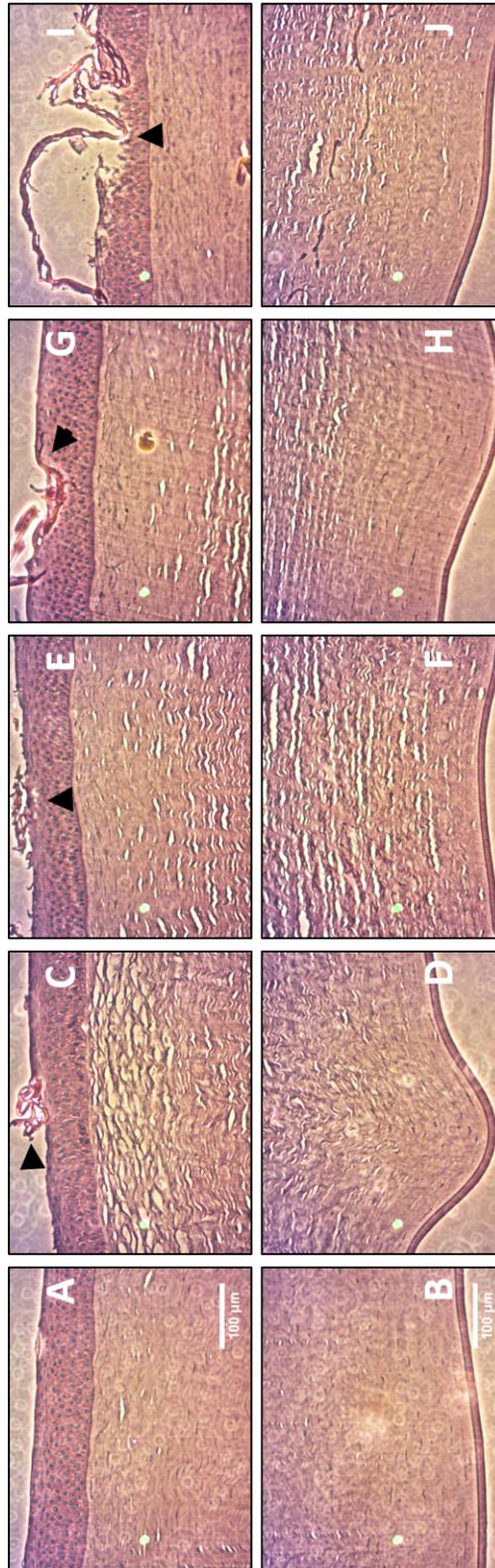


Figura 57: Micrografías con contraste de fase en transmisión mostrando el daño en córneas de cerdo *ex-vivo*. (A,B) corresponde a la muestra control y (C,D),(E,F),(G,H),(I,J) ojos irradiados con 1 (1Hz), 20 (1 Hz) \approx 200 (10Hz) y \approx 2000 (10 Hz) pulsos, respectivamente. (A,C,E,G,I) cubren la zona de epitelio y estroma, mientras que (B,D,F,H,J) la zona de estroma y membrana de Descemet. Se indica la zona de daño intencional por enfoque del haz de bombeo en la superficie de la córnea (*punta de flecha*).

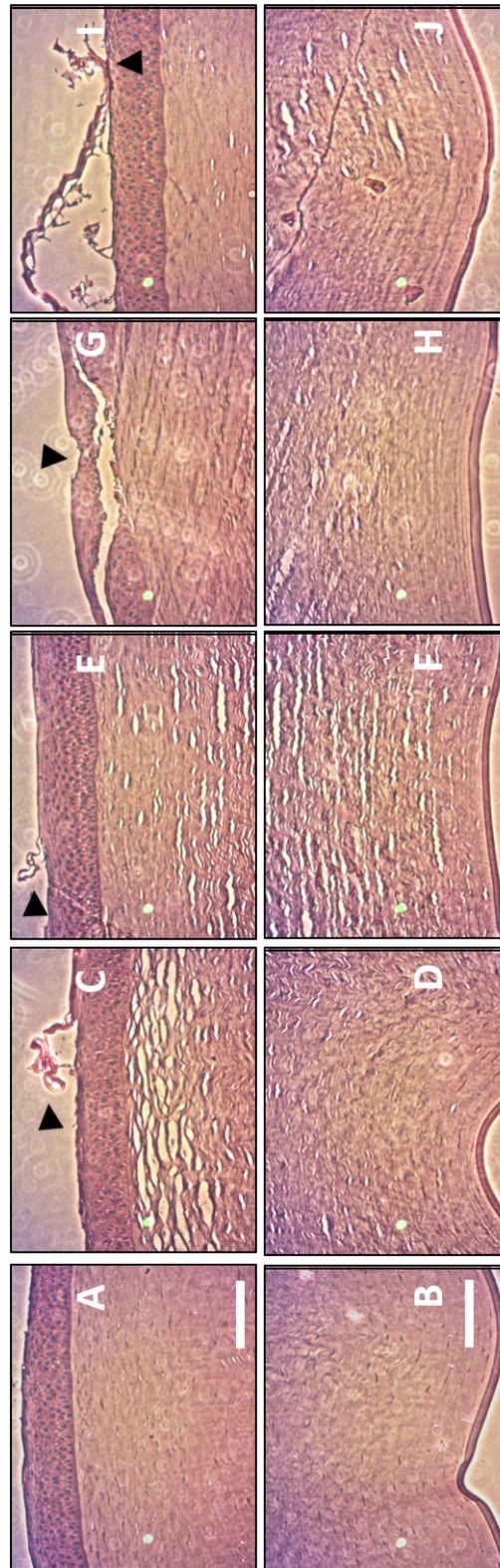


Figura 58: Micrografías de daño en córnea para el segundo conjunto de ojos. La nomenclatura, amplificación y condiciones de irradiación son las mismas que en la Fig. 57.

Por último, haciendo uso de los resultados aquí expuestos y suponiendo un caso de aplicación de la técnica STM a un paciente con el esquema de irradiación que se presenta en la Fig. 18, al aplicar un pulso de bombeo cuya energía es $E_p = 13$ mJ, (necesaria para la formación de burbujas de cavitación dentro de la CA) se tendría una fluencia sobre la retina de $\approx 8.4 \times 10^{-3}$ J/cm²; considerando las pérdidas de la energía de bombeo por: reflexión $R_{tot} = 15\%$, absorción lineal de la córnea $\alpha = 38\%$, conversión a burbujas/ondas de choque $\approx 18\%$ y considerando el área circular en la retina calculada en la Sec. 4.1.2. Se debe notar que las pérdidas por absorción en una córnea *in-vivo* deben ser menores al 38%, ya que no están presentes los procesos de degradación del tejido.

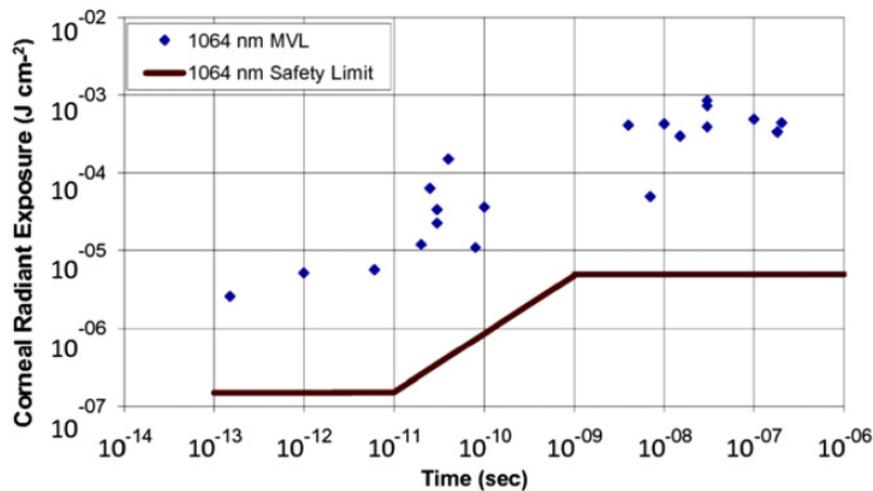


Figura 59: Umbrales de lesión mínima visible (MVL, por sus siglas en inglés) y el máximo permisible (línea continua) a 1064 nm (Rockwell et al., 2010).

Los resultados expuestos por (Rockwell et al., 2010), indican que para láseres pulsados cuya duración por pulso está comprendida entre algunos picosegundos hasta algunos microsegundos, y dentro de la región espectral de 400-1400 nm, el umbral de daño en el epitelio pigmentario retiniano (RPE, por sus siglas en inglés), medido sobre la superficie corneal, sigue el comportamiento mostrado en la Fig. 59. Aunque los resultados que se muestran están realizados para $\lambda = 1064$ nm, éstos se pueden extender al rango VIS-NIR (Cain et al., 1999). Por otro lado, (Kennedy et al., 2004) muestra el umbral teórico de daño en la retina según la fluencia F_{th} medida en la superficie corneal y retinal, utilizando un láser pulsado a una longitud de onda $\lambda = 590$ nm y duración del pulso $\tau_p = 3 \mu s$ (Ver tabla 15). Se puede observar que las fluencias obtenidas por (Kennedy et al., 2004) en la superficie corneal concuerdan dentro del rango de umbral de lesión mínima reportada por (Rockwell et al., 2010) para tiempos de pulso entre $10 \mu s$ y ≈ 1 ns.

Por lo tanto, de los resultados reportados por (Rockwell et al., 2010; Kennedy et al., 2004) y retomando el ejemplo de la aplicación de la técnica STM a un paciente, se obtiene una fluencia sobre la retina de $\approx 8.4 \times 10^{-3} \text{ J/cm}^2$, estando 6 órdenes de magnitud por debajo del umbral de daño en la retina, por lo que podría suponerse una mínima lesión en el RPE. Aunque éste resultado demuestra estar por debajo del daño umbral en la retina, debe hacerse notar que sirve más como una referencia para ubicar la magnitud de la fluencia en la retina, ya que éste no toma en cuenta las pérdidas del haz de bombeo por la absorción lineal de una córnea *in-vivo* y las debidas por el esparcimiento en cada interface del globo ocular, además, el cálculo del radio del haz de bombeo sobre la retina se realizó en la aproximación paraxial que utiliza el software WinLensBasic.

Tabla 15: Umbral de lesión mínima retinal teóricas utilizando un perfil de haz circular (Kennedy et al., 2004).

τ_p, λ	$d_r^\dagger (\mu\text{m})$	$E_{th}(\mu\text{J})$	$F(\text{J/cm}^2)$	
			–en la córnea	–en la retina
$\tau_p = 3 \mu\text{s}$	300	918.92	2.4×10^{-3}	1.3×10^0
$\lambda = 590 \text{ nm}$	230	540.12	1.4×10^{-3}	1.3×10^0
	160	261.38	6.8×10^{-4}	1.3×10^0
	70	57.73	1.5×10^{-4}	1.5×10^0

[†] d_r corresponde al diámetro del spot en la retina, el cual es distinto al tamaño del haz en la córnea (d_c), ya que $d_c \gg d_r$. El haz incide colimado a la entrada de la córnea y desde ahí se enfoca en la retina.

Capítulo 5. Conclusiones

5.1. Caracterización de los haces de bombeo y prueba

De las simulaciones realizadas con el software WinLensBasic, se concluye que la configuración óptima de la técnica STM adaptada al modelo de ojo de cerdo requiere que el haz de prueba incida a un ángulo de $52^\circ \pm 5^\circ$ respecto a la normal en el punto de entrada del haz de bombeo y que el punto de entrada del haz de prueba se encuentre ≈ 10 mm respecto al mismo punto de referencia.

De la propagación del haz de bombeo en el modelo de ojo de cerdo, se encontró un factor de aumento en el radio de la cintura del haz $W_0(f)$ de 1.8X con respecto a lo medido en propagación libre. Esto se traduce en que al utilizar la lente de distancia focal $f = 12$ mm, el área en la cintura del haz de $5.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2$ en propagación libre, pasa a $1.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ para la propagación en la CA del ojo de cerdo.

5.2. Caracterización óptica del medio

La transmitancia de la córnea para un ojo de cerdo *ex-vivo* es de 62% para la longitud de onda del haz de bombeo ($\lambda = 532$ nm). El coeficiente de absorción lineal es de $\alpha = 5.37 \text{ cm}^{-1}$. Si se analiza el decaimiento en la intensidad del haz de bombeo tras haber atravesado la córnea ($\approx 880 \mu\text{m}$), resulta en una disminución de $\approx 38\%$ de su valor de incidencia.

Se encontró vía espectroscopía de absorción del HA, que éste sufre una modificación en sus propiedades ópticas al ser irradiado por más de 1 hora y 30 min. por el haz de bombeo ($E_p = 2.5$ mJ y 10 Hz de tasa de repetición). El efecto de la irradiación es la aparición de una banda de absorción centrada en ≈ 410 nm. Utilizando los resultados reportados por (Beharry, 2012), ésta banda puede atribuirse a la formación de enlaces del tipo cross-link entre moléculas de glutatión. En este caso dichos enlaces son inducidos por los pulsos láser de nanosegundos utilizados para generar las burbujas de cavitación.

5.3. Técnica STM: aplicación en cubetas de cuarzo o plástico con HA

Se comprobó la tendencia creciente del primer tiempo de colapso en función de la energía del pulso de bombeo y la tendencia decreciente en función de la presión externa ejercida utilizando cubetas de cuarzo y plástico con HA. Además, se observó que para alcanzar un tiempo de colapso dado de la burbuja, se requiere en el caso de HA en cubeta de plástico, casi el doble de energía por pulso que la que se requiere en el caso de HA en cubeta de cuarzo. Esto se debe a que la cubeta de plástico tiene una absorción significativamente mayor que el cuarzo.

La utilización de una lente de $f = 25.4$ mm con el objetivo de optimizar la detección del 1er. tiempo de colapso y aumentar la distancia de trabajo entre la córnea y la lente no resultó viable. Esto puesto que la energía umbral ($E_p \approx 9.33$ mJ) para la detección del 1er. tiempo de colapso es al menos 3 veces mayor que el umbral obtenido para las cubetas de cuarzo y plástico, cuando se usa una lente de distancia focal de 12 mm. En el contexto de aplicaciones médicas se debe buscar trabajar con la menor energía posible para evitar daño.

Se comprobó que τ_c disminuye al utilizar un haz de bombeo cuya duración del pulso va de ns a fs , no sólo por la energía por pulso utilizada para la generación de cavitación, sino por la partición de la energía y la geometría del plasma que dependen de la duración del pulso. Además, se encontró que el láser Ti:Zafiro ($120 fs$, 790 nm) puede ser un buen candidato para la sustitución del láser Nd:YAG (9 ns, 532 nm) utilizado en éste trabajo de tesis, ya que se reduciría la probabilidad de daño en retina al requerir de una menor energía para la generación de cavitación. Por otro lado, las propiedades de absorción lineal de los diferentes medios en el ojo de cerdo para la longitud de onda del láser en el cercano infrarrojo minimizan las posibilidades de daño.

5.4. Técnica STM: aplicación en ojos de cerdo *ex-vivo*

En el presente trabajo de tesis se presentó una nueva configuración de la técnica STM para su adaptación dentro de la CA de ojos de cerdo *ex-vivo*, en específico se utilizó un sistema de bombeo y prueba no colineal, y el iris como superficie reflectora, para el registro de la evolución temporal de la burbuja de cavitación, el cual permitió corroborar las

tendencias en las curvas del tipo: P vs τ_c y E_p vs τ_c , y constatarlas con las anteriormente reportadas para agua destilada, solución salina y modelo artificial de ojo humano por (Devia-Cruz, 2014; Martínez, 2015). En especial, se obtuvieron curvas de calibración del tipo P vs τ_c , dentro del rango de la PIO con una resolución de $\Delta P = 4$ mmHg, utilizando energías con el pulso de bombeo de 13 y 16 mJ.

De la señal STM típica generada dentro de la CA de los ojos cerdo *ex-vivo*, se puede distinguir claramente la formación y colapso de la primer burbuja de cavitación seguida de los efectos de interferencia debidos a la interacción de la burbuja de cavitación y de las ondas de choque con las fronteras. También, se observó que se requirió de mayor energía de bombeo por pulso (≈ 13 mJ) para alcanzar un tiempo de colapso en el orden del obtenido con las cubetas de cuarzo y plástico. Esto se debe a las pérdidas por absorción lineal de la córnea *ex-vivo* y a una disminución en la fluencia en la cintura del haz debida a que por efectos de refracción en los distintos estratos el tamaño de la cintura del haz es mayor en la CA.

La señal resultante de 64 señales STM promediadas, demuestra ser insensible a los efectos de acomodación (al aplicar una presión externa de entre 10 y 30 mmHg) reportados por (He et al., 2012).

Se observó que al optimizar la alineación de la técnica STM, se puede aumentar la pendiente de la curva P vs τ_c , resultando en una mayor sensibilidad, es decir, es posible medir con precisión τ_c para cambios de presión cada vez más pequeños ($\Delta P < 3$ mmHg). Por ejemplo, en resultados preliminares en ojos de cerdo *ex-vivo* por (Martínez, 2015), se alcanzó una pendiente de $\approx 0.48 \mu\text{s/mmHg}$, mientras que en el presente trabajo de tesis se obtuvo un valor cercano a $\approx 1.2 \mu\text{s/mmHg}$.

De las curvas de dispersión de $\tau_c(P)$ se observó que se sigue la tendencia lineal decreciente esperada al aplicar una presión externa de 13 a 40 mmHg a ojos del tipo M, sin embargo, τ_c es sensible para ojos de tamaño CH debido a los efectos de acomodación, observando una mayor dispersión en los datos. Por otro lado, la dispersión de τ_c en función de E_p demostró que la dispersión (σ) y el R.I.Q debidos a la contribución de 3 ojos de cerdo de las mismas dimensiones disminuye $\approx 20\%$ al aumentar la energía por pulso (ΔE_p) en 2 mJ. También, se observó que el error en la estimación para cada ojo disminu-

ye $\approx 12\%$ al aumentar la energía del pulso en el mismo rango de energía anteriormente mencionado. Esto obedece al hecho de que a mayor energía de bombeo el fenómeno de cavitación se vuelve más determinista.

5.5. Análisis del fotodaño en córneas de cerdo *ex-vivo*

Según las condiciones para la generación de cavitación en la CA y analizando el fotodaño en el tejido corneal mediante pruebas histológicas, se observó que 1 pulso con energía $E_p = 13$ mJ, produce daño incipiente en la superficie del estroma por generación de burbujas de cavitación o bien por evaporación térmica del agua en el estroma debido a la presencia de queratocitos (centros absorbedores del haz de bombeo), sin embargo, el daño se puede reducir o eliminar ya que el umbral de detección del 1er. tiempo de colapso se ubica alrededor de 11 mJ. Un aumento en el número de pulsos depositados ($E_p = 13$ mJ, tasas de repetición de 1 ó 10 Hz) produce un daño mayor a lo largo del estroma; desprendimiento del tejido epitelial y una disminución en la eficiencia para la generación de las burbujas de cavitación. Los efectos de daño en el estroma y epitelio son debidos principalmente a la absorción lineal del medio, daños mecánicos por las burbujas de cavitación y efectos térmicos acumulativos. Se puede descartar el daño ocasionado por la generación de las burbujas de cavitación y de los chorros de vapor dentro de la CA, al no observarse cambio estructural en la membrana de Descemet sobre la zona de irradiación.

Por último, usando los resultados de la propagación del haz de bombeo en el modelo de ojo de cerdo, se encontró que la fluencia en la retina ($\approx 8.4 \times 10^{-3}$ J/cm²) en una situación de generación de cavitación y considerando las pérdidas por: absorción lineal en la córnea; partición de la energía y las debidas a la reflexión, está 6 órdenes de magnitud por debajo del umbral de daño en la retina. Aunque este resultado no toma en cuenta que las pérdidas por absorción lineal de una córnea *in-vivo* son menores que las pérdidas por absorción en una córnea *ex-vivo*.

5.6. Trabajo a futuro

A continuación se presenta una propuesta de trabajo a futuro sugerido en función de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis:

1. **Cambiar a una nueva configuración de la técnica STM a una colineal para los haces bombeo-prueba.** Debido a que la alineación entre los haces bombeo-prueba es fundamental para tener un estudio resuelto y de alta precisión en el tiempo de la burbuja de cavitación, se observó que la configuración utilizada en este trabajo de tesis resultó ser muy sensible, esto al tratar de hacer coincidir al haz de prueba con la burbuja de cavitación que se genera dentro de la CA. Esto se consigue variando el ángulo de incidencia del haz de prueba sobre la córnea. Una alternativa para asegurar la coincidencia del haz de prueba con la zona de generación de las burbuja de cavitación, se propone enviar los haces bombeo-prueba de manera colineal (Ver Fig. 60).

Ésta nueva configuración podría no sólo asegurar una mayor precisión en el estudio resuelto en el tiempo de la burbuja de cavitación, sino que también, por el ángulo de incidencia de ambos haces, asegurar una mínima lesión en cristalino y retina, ya que ambos haces no se propagarían sobre el eje óptico del ojo.

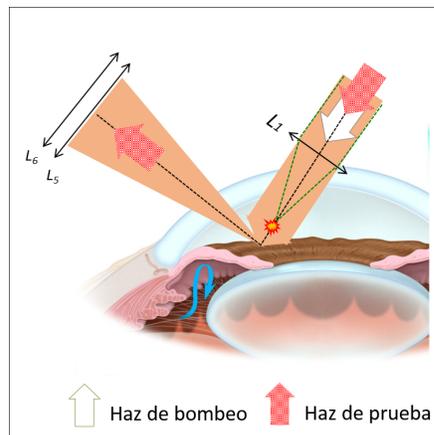


Figura 60: Propuesta de configuración STM colineal para los haces bombeo-prueba.

Utilizando o no la nueva propuesta de configuración STM con haces colineales, es importante incluir/correlacionar parámetros fisiológicos de los ojos de cerdo (edad, sexo, peso, etc.) que complementen la información obtenida de las curvas P vs τ_c y E_p vs τ_c . Ésto permitirá poder tener diferentes curvas de calibración P vs τ_c según

la fisiología o conjunto de parámetros en común de cada uno de los ojos.

2. **Análisis de la dinámica espacial de la burbuja de cavitación dentro de la CA con la técnica de Shadowgraphy.** Conocer si la burbuja de cavitación se ve infuida por la cercanía de las fronteras (iris y córnea) y determinar a qué distancia éstos efectos disminuyen o desaparecen, es importante para entender el comportamiento del 1er. tiempo de colapso. Se podrían además analizar los efectos de acomodación dentro de la CA, lo cual permitirá entender si τ_c es más sensible a este efecto para ojos pequeños que para ojos medianos o grandes.
3. **Fotodaño en cristalino y retina por haz de bombeo, e iris por haz de prueba.** Como complemento a los resultados aquí expuestos sobre fotodaño en la córnea vía pruebas histológicas, es importante analizar si manteniendo la misma configuración y condiciones, se presenta daño en retina y cristalino, además de analizar el daño en el iris por el haz de prueba.
4. **Longitud de onda y duración del pulso.** Uno de los aspectos importantes a considerar para la implementación a futuro de la técnica STM como herramienta tonométrica para el glaucoma, es la elección del tipo de fuente del haz de bombeo que proporcione la energía y en consecuencia (dependiendo de la lente de enfoque), la fluencia suficiente para la generación de cavitación, además, de que la fluencia alcanzada en la retina esté por debajo del umbral de daño. Para evitar una lesión en la retina se puede pensar en reducir al máximo la fluencia que llega a la misma, ya sea utilizando la mínima energía requerida y/o aumentando el área en la superficie retinal. Para aumentar el área en la superficie retinal se puede variar la apertura numérica (N.A.) de la lente de enfoque y para disminuir la energía del haz de bombeo se tiene la opción de aprovechar la absorción lineal de los diferentes medios por los que se propaga el haz hasta llegar a la retina. De hecho, como se observa en la Fig. 61:Derecha, se puede elegir una fuente cuya longitud de onda central se encuentre en la ventana de mayor transmitancia en la córnea comprendida entre 400 - 1000 nm; a fin de reducir la pérdidas por absorción en la córnea para la generación de cavitación en la CA, pero que por otro lado, esta longitud de onda se encuentre en las bandas de mínima transmitancia del HV y cristalino (Ver Fig. 61:Izquierda) definidas en: (1) alrededor de 400 nm y (2) de 900 a 1000 nm, lo cual ayudaría a

reducir la energía del haz de bombeo por absorción evitando así que la fluencia en la retina sobrepase el umbral de daño.

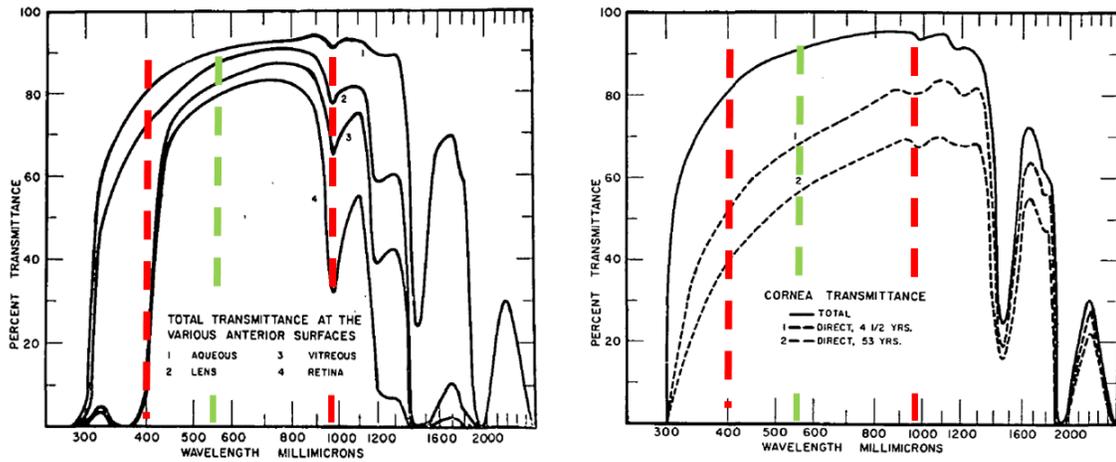


Figura 61: Transmitancia total (contiene la luz esparcida a un ángulo de 170° y la que pasa directamente a través del medio) de: HA, HV, cristalino, retina y córnea, de un ojo humano (Boettner and Wolter, 1962).

Literatura citada

- Bajraszewski, T., Wojtkowski, M., Szkulmowski, M., Szkulmowska, A., Huber, R., and Kowalczyk, A. (2008). Improved spectral optical coherence tomography using optical frequency comb. *Optics express*, 16(6):4163–4176.
- Beharry, A. A. (2012). *Characterization of Azobenzene-based Photo-switches and their Evaluation for In Vivo Applications by Characterization of Azobenzene-based Photo-switches and their Evaluation for In Vivo Applications*. Tesis de doctorado, University of Toronto.
- Benes, P., Synek, S., and Petrová, S. (2013). Corneal shape and eccentricity in population. *Collegium antropologicum*, 37(1):117–120.
- Boettner, E. A. and Wolter, J. R. (1962). Transmission of the Ocular Media. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 1(6):776–783.
- Brennen, C. E. (2016). Cavitation and bubble dynamics, Recuperado (Mayo de 2016) de: <http://authors.library.caltech.edu/25017/4/chap3.htm>.
- Cain, C. P., Toth, C. A., Noojin, G. D., Carothers, V., Stolarski, D. J., and Rockwell, B. A. (1999). Thresholds for visible lesions in the primate eye produced by ultrashort near-infrared laser pulses. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40(10):2343–2349.
- Devia-Cruz, L. F. (2014). *Estudio del fenómeno de cavitación inducido en medios biológicos con pulsos láser cortos*. Tesis de doctorado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México.
- Devia-Cruz, L. F., Camacho-López, S., Evans, R., García-Casillas, D., and Stepanov, S. (2012). Laser-induced cavitation phenomenon studied using three different optically-based approaches - An initial overview of results. *Photonics Lasers Med.*, 1(3):195–205.
- Devia-Cruz, L. F., Pérez-Gutiérrez, F. G., and García-Casillas, D. (2013). High resolution optical experimental technique for computing pulsed laser-induced cavitation bubble dynamics in a single shot. *Atomization and Sprays*, 23(6):505–515.
- Evans, R. and Camacho-López, S. (2010). Pump-probe imaging of nanosecond laser-induced bubbles in distilled water solutions: Observations of laser-produced-plasma. *J. Appl. Phys.*, 108(10):1–9.
- Evans, R., Camacho-López, S., Pérez-Gutiérrez, F. G., and Aguilar, G. (2008). Pump-probe imaging of nanosecond laser-induced bubbles in agar gel.
- Foundation, G. R. (2016). Recuperado (Junio de 2016) de: <http://www.glaucoma.org/es/tipos-de-glaucoma.php>.
- García, D. A. I. (2016). Recuperado (Noviembre de 2016) de: <http://www.ofthalmologia-online.es/anatom%C3%ADa-del-globo-ocular/c%C3%B3rnea/>.
- Gemert, A. J. W. y. M. J. V. (2011). *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*. Austin, TX 78712, second edition.

- Goel, M., Picciani, R. G., Lee, R. K., and Bhattacharya, S. K. (2010). Aqueous Humor Dynamics : A Review. *The Open Ophthalmology*, 9(4):52–59.
- Hammer, D. X., Noojin, G. D., Rockwell, B. a., Vogel, A., and Lu, D. (1998). Influence of pulse duration on mechanical effects after laser-induced breakdown in water. *Journal of Applied Physics*, 83(12):7488–7495.
- He, L., Wendt, M., and Glasser, A. (2012). Manipulation of intraocular pressure for studying the effects on accommodation. *Experimental Eye Research*, 102:76–84.
- Idalia, D., Casado, T., Yamelyn, D., and Bregado, V. (2012). Corneal thickness and the epidemiological and physiological variables seen in the glaucoma risk population. *Revista Cubana de Oftalmología*, 25(2):254–263.
- Kennedy, K. (1997). Laser-Induced Breakdown Media. *Progress in Quantum Electronics*, 21(3):155–248.
- Kennedy, P. K., Zuclich, J. A., Lund, D. J., Edsall, P. R., Till, S., Stuck, B. E., and Hollins, R. C. (2004). Laser-induced retinal damage thresholds for annular retinal beam profiles. *Proc. of SPIE*, 5319:258–266.
- Lauterborn, W. (1979). Optic Cavitation. *Journal of Physique*, 40(11):8–273.
- Leung, C.-S. (2011). Anterior chamber angle imaging with optical coherence tomography. *Yearbook of Ophthalmology*, 25:261–267.
- Maher, E. F. (1978). Transmission and absorption coefficients for ocular media of the rhesus monkey. *USAF School of Aerospace Medicine*, page 106.
- Markolf H. Niemz (2007). *Laser-Tissue Interactions*. Germany, third edition.
- Martínez, L. M. (2015). *Modelo de sensor de presión intraocular basado en cavitación láser*. Mc thesis, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México.
- Padilla-Martinez, J. P., Berrospe-Rodriguez, C., Aguilar, G., Ramirez-San-Juan, J. C., and Ramos-Garcia, R. (2014). Optic cavitation with CW lasers: A review. *Phys. Fluids*, 26(12):122007.
- Quigley, H. a. and Broman, a. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *The British journal of ophthalmology*, 90(3):262–267.
- Ramirez-San-Juan, J. C., Rodriguez-Aboytes, E., Martinez-Canton, a. E., Baldovino-Pantaleon, O., Robledo-Martinez, A., Korneev, N., and Ramos-Garcia, R. (2010). Time-resolved analysis of cavitation induced by CW lasers in absorbing liquids. *Opt. Express*, 18(9):8735–8742.
- Rockwell, B. A., Thomas, R. J., Vogel, A., and City-base, B. (2010). Ultrashort laser pulse retinal damage mechanisms and their impact on thresholds. *Medical Laser Application*, 298(704):84–92.
- Rosales, A. M. (2008). *Ablación de tejido corneal con pulsos de nanosegundos y femtosegundos*. Mc thesis, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México.

- Ruiz-Ederra, J., García, M., Hernández, M., Urcola, H., Hernández-Barbáchano, E., Araiz, J., and Vecino, E. (2005). The pig eye as a novel model of glaucoma. *Experimental Eye Research*, 81(5):561–569.
- Sanchez, I., Martin, R., and Ussa, F. (2014). Measurement of Intraocular Pressure in a Porcine Ex Vivo Model Eye. 2(2):55–64.
- Sanchez, I., Martin, R., Ussa, F., and Fernandez-Bueno, I. (2011). The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(4):475–482.
- Schaffer, C., Nishimura, N., Glezer, E., Kim, A., and Mazur, E. (2002). Dynamics of femtosecond laser-induced breakdown in water from femtoseconds to microseconds. *Opt. Express*, 10(3):196–203.
- Thiyagarajan, M. and Thompson, S. (2012). Optical breakdown threshold investigation of 1064 nm laser induced air plasmas. *Journal of Applied Physics*, 111(7).
- Tinguely, M. (2013). *The effect of pressure gradient on the collapse of cavitation bubbles in normal and reduced gravity*. PhD thesis, École Polytechnique Fédérale de Lausanne.
- Toytman, I., Simanovski, D., and Palanker, D. (2010). Optical breakdown in transparent media with adjustable axial length and location. *Optics express*, 18(24):24688–24698.
- Vogel, A. (1989). Optical and acoustic investigations of the dynamics of laser-produced cavitation bubbles near a solid boundary. *J. Fluid. Mech.*, 206(1):299–338.
- Vogel, A. (1996). Shock wave emission and cavitation bubble generation by picosecond and nanosecond optical breakdown in water. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 100(1):148.
- Vojnikovi, B., Gabri, N., Dekaris, I., and Juri, B. (2013). Curvature Analyses of the Corneal Front and Back Surface. *Coll. Antropol.*, 37(1):93–96.
- Yang, J., Klassen, H., Pries, M., Wang, W., and Nissen, M. H. (2006). Aqueous humor enhances the proliferation of rat retinal precursor cells in culture, and this effect is partially reproduced by ascorbic acid. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 24(12):2766–2775.