

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN OPTICA**

**ABLACIÓN DE TEJIDO CORNEAL CON PULSOS DE
NANOSEGUNDOS Y FEMTOSEGUNDOS**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ALEJANDRA MINA ROSALES

Ensenada, Baja California, México, Abril del 2007

RESUMEN de la tesis de Alejandra Mina Rosales, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ÓPTICA con orientación en Optoelectrónica. Ensenada BC., México. Abril del 2007.

ABLACIÓN DE TEJIDO CORNEAL CON PULSOS DE NANOSEGUNDOS Y FEMTOSEGUNDOS

Resumen aprobado por:

Dr. Santiago Camacho López
Director de Tesis

Este trabajo se compone de un estudio acerca de la aplicación de láseres pulsados en el procesamiento de tejido corneal. Para la realización de nuestro estudio empleamos dos tipos de láseres pulsados: un láser de nanosegundos (Nd:YAG, 5ns) y otro de femtosegundos (Ti:Zafiro, 90 fs). La principal motivación de este trabajo es la comprensión y caracterización de los efectos físicos que se producen al irradiar tejido corneal con un láser pulsado.

La córnea esta compuesta por distintas capas, cada una de ellas con diferentes funciones y distintas características. Nuestro trabajo se enfocó en realizar irradiaciones en la capa de la córnea llamada estroma. Esta capa constituye el 90% del total de la córnea y en ella se realiza la corrección refractiva del ojo conocida comúnmente como LASIK (laser assisted in situ keratomileusis).

Un fenómeno físico interesante, que ha sido estudiado para aplicaciones médicas es conocido como cavitación. Se origina al enfocar un haz láser pulsado dentro de un tejido, favoreciendo la formación de una burbuja. Dicha burbuja está compuesta principalmente por vapor de agua y óxidos de carbono. Uno de los efectos estudiados en este trabajo es la formación de burbujas en el estroma. Se encontró que algunas características de las burbujas dependen de la fluencia láser aplicada y la duración del pulso. Se estudió también el efecto de calentamiento láser en el tejido al realizarse una irradiación con una fluencia controlada.

Presentamos resultados sobre la fluencia umbral para formación de burbujas en el estroma a dos distintas profundidades (100 μ m y 400 μ m). Así también presentamos resultados sobre la formación de canales intra-estromales a dichas profundidades en el estroma y, finalmente, presentamos una caracterización del calentamiento láser experimentado por el tejido.

Palabras claves: Láseres pulsados, irradiación láser de tejido biológico, fluencia umbral.

ABSTRACT of the thesis presented by Alejandra Mina Rosales, as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in OPTICS with orientation in Optoelectronics. Ensenada BC., México. April 2007.

ABLATION OF CORNEAL TISSUE WITH NS AND FS PULSE LASER

Abstract approved by:

Dr. Santiago Camacho López
Thesis Director

In this work we present a study of the applications of pulsed lasers to corneal tissue microprocessing. In our study we use two kinds of laser pulses: a nanosecond laser (Nd:YAG, 5ns) and a femtosecond laser (Ti:Zafiro, 90 fs). The main objective of the present work is to understand and characterize the physical effects resulting from the pulsed laser tissue (cornea) interaction.

The cornea is composed by several distinctive layers; each one of those layers with assorted functions and characteristics. Our work focused in carrying out irradiations of the cornea's layer called stroma. This layer constitutes 90% of the whole cornea thickness. The refractive vision correction surgery known as LASIK (laser assisted in situ keratomileusis) is performed in the stroma layer.

An interesting physical phenomena that has been studied for medical applications is called cavitation. It occurs when a pulsed laser beam is tightly focused within the tissue, generating a bubble. This bubble is mainly composed by water vapor and carbon oxides. The formation of this kind of bubbles in the stroma is the main subject of our work; we found that some characteristics of the bubbles depend directly on the applied laser fluence and the duration of the laser pulse. We also studied the laser- heating effect induced in the tissue under controlled fluence delivery.

We present results on the threshold fluence for bubble formation in the stroma layer at two different depths. We also presents results on intra-stromal channel formation at the depths mentioned above. Finally, we address the characterization of the laser heating of the irradiated tissue.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
<i>I.1. Antecedentes</i>	<i>1</i>
<i>I.2. Objetivos</i>	<i>3</i>
I.2.1. Objetivo general	<i>3</i>
I.2.1. Objetivo particular	<i>4</i>
II. CONCEPTOS BASICOS	7
<i>II.1. Introduccion</i>	<i>7</i>
<i>II.2. Características de una interacción láser- material usando pulsos de nanosegundos y femtosegundos</i>	<i>8</i>
<i>II.3. Mecanismos de interacción ocurridas en el tejido biológico al ser irradiado por láser</i>	<i>11</i>
II.3.1. Interacción fotoquímica	<i>11</i>
II.3.2. Interacción térmica (producción de calor)	<i>12</i>
II.3.3. Fotoablación	<i>14</i>
II.3.4. Inducción de plasma (material ionizado).....	<i>15</i>
II.3.5. Fotodisrupción	<i>16</i>
<i>II.4. Definiciones relevantes</i>	<i>18</i>
<i>II.5. Tejido corneal</i>	<i>23</i>

II.5.1. Parámetros físicos que caracterizan la córnea	29
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	31
<i>III.1. Introducción</i>	<i>31</i>
<i>III.2. Sistemas láser</i>	<i>32</i>
III.2.1. Láser de Nd:YAG (ns).....	33
III.2.2. Láser de Ti:Zafiro (fs).....	36
<i>III.3. Caracterización del haz láser</i>	<i>40</i>
III.3.1. Análisis del tamaño del haz enfocado.....	44
III.3.1.1. Tamaño de la cintura del haz calculado por propagación de haces Gaussianos	44
III.3.1.2. Tamaño de la cintura del haz medida experimentalmente	47
<i>III.4. Estación de microprocesado</i>	<i>49</i>
III.4.1. Descripción de la estación de microprocesado.....	49
III.4.2. Sistema de monitoreo (PEB).....	51
III.4.3. Calibración del monitor de energía (fotodiodo)	56
<i>III.5. Obtención, manejo y conservación de tejido corneal.....</i>	<i>58</i>
III.5.1. Material necesario para la disección del globo ocular porcino	58
III.5.2. Metodología de extracción de tejido corneal.....	61
<i>III.6. Procedimiento Experimental.....</i>	<i>67</i>
III.6.1. Selección de profundidades de irradiación en la córnea.....	67
III.6.2. Metodología para la generación de burbujas en tejido corneal.....	69
III.6.3. Frecuencia de suministro de pulsos láser para generar canales continuos en el tejido	73
III.6.3. Difusión de calor en tejido.....	78
III.6.4. Formación de burbujas en la córnea usando pulsos de femtosegundos	81
<i>III.7. Método para medir dimensión de burbujas de cavitación.....</i>	<i>85</i>
<i>III.8. Estimación de las fluctuaciones experimentales que afectan la formación de burbujas y canales en el tejido</i>	<i>87</i>
III.8.1. Tamaño de las burbujas.....	87

IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES	90
<i>IV.1. Introducción.....</i>	90
<i>IV.2. Obtención del espectro de Absorción del tejido corneal.....</i>	91
<i>IV.3. Generación de burbujas en tejido corneal porcino con pulsos láser de nanosegundos</i>	95
IV.3.1. Variación típica en las dimensiones de las burbujas	95
IV.3.2. Irradiación a 100 μ m de profundidad en la córnea	98
IV.3.3. Resultados obtenidos a 400 μ m de profundidad empleando pulsos de nanosegundos	105
<i>IV.4. Cambios de temperatura inducidos por la irradiación con pulsos láser de nanosegundos en tejido corneal.....</i>	112
IV.4.1. Cambios de temperatura a 100 μ m de profundidad empleando pulsos de nanosegundos	112
IV.4.2. Cambios de temperatura a 400 μ m de profundidad empleando pulsos de nanosegundos	115
<i>IV.5. Generación de burbujas de cavitación en tejido corneal porcino con un láser de pulsos de femtosegundos</i>	118
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	122
<i>V.1. Introducción.....</i>	122
<i>V.2. Análisis de los canales generados en el tejido corneal.</i>	122
<i>V.3. Cambio de temperatura aplicando pulsos láser de ns a dos distintas profundidades (100 μm, 400 μm).....</i>	131
VI. CONCLUSIONES.....	138
<i>VI.1. Trabajo futuro.....</i>	142
LITERATURA CITADA.....	144
APENDICE A.....	149

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1.	Dinámica de ablación del láser usando a) pulsos de larga duración y b) pulsos de corta duración [Bado y Said, 2001].....	10
	Diagrama esquemático de la generación del plasma mediante un láser.....	16
2.		
3.	Esquema del globo ocular.....	24
4.	Medidas de las dimensiones de la córnea.....	25
5.	Capas que componen la estructura de la córnea.....	25
6.	Perfil de la respuesta al impulso del sistema de medición y perfil del pulso medido con dicho sistema [Maisterrena, 2006].....	34
7.	Representación esquemática de la amplificación de pulsos de femtosegundos.....	39
8.	Perfil de intensidad del pulso de femtosegundos en el tiempo, obtenido por la autocorrelación del mismo pulso a la salida del compresor.....	39
9.	Arreglo experimental construido para determinar la M2, con este arreglo obtenemos el perfil transversal de intensidad del haz, medido en varias posiciones a lo largo de su eje de propagación. El haz es enfocado con una lente de $f = 20$ cm.....	42
10.	Estación de trabajo para el microprocesado láser de materiales.....	50

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
11. Diagrama del sistema de monitoreo PEB (Plano Equivalente de Blanco).....	52
12. Propagación de un haz enfocado a incidencia normal sobre la superficie de una muestra colocada en distintas posiciones con respecto a la cintura del haz.....	53
13. a) Imagen magnificada de la cintura del haz (capturada para el láser de nanosegundos); b) perfil de la imagen de la cintura del haz.....	55
Arreglo necesario para realizar calibración de	
14. fotodiodo.....	57
15. Curva de calibración.....	57
16. Material necesario para la extracción del tejido corneal porcino.....	61
17. Fotografía del globo ocular.....	62
18. Administración de agua destilada al globo ocular por medio del nervio óptico.....	62
19. Corte inicial para la extracción de la córnea.....	63
20. Primer corte realizado sobre la esclera.....	64
21. Desprendimiento de tejido corneal.....	65
22. Inicio de corte con tijeras.....	65
23. Desprendimiento final de la córnea.....	66
Forma adecuada de colocar la córnea sobre	
24. recipiente.....	66
25. Tira de córnea observada con un microscopio óptico.....	67
26. Colocación de cintura del haz a la profundidad deseada.....	70

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
27. Barrido y formación de un canal a partir de la formación de burbujas en el tejido.....	71
28. Los cuatro distintos posibles casos que se presentan al irradian el tejido con respecto a la frecuencia del pulso seleccionada y la dimensión de la burbuja generada.....	77
29. Colocación de termopar dentro de la córnea.....	80
30. Arreglo de estación de microprocesado empleando láser pulsado de femtosegundos e implementación auxiliar del láser de He-Ne y una lámpara de luz blanca.....	84
31. Ilustración del proceso para medir el ancho de un canal en el tejido corneal.....	86
32. Curva de transmitancia en córnea.....	92
Curva del coeficiente de absorción del tejido corneal.....	94
33. Curva de comportamiento estadístico en el ancho de canales para irradiaciones a 100µm de profundidad empleando pulsos de nanosegundos.....	96
34. Curva de comportamiento estadístico en el ancho de canales para irradiaciones a 400µm empleando pulsos de nanosegundos.....	97
35. Burbujas generadas a la fluencia umbral irradiando a 100 µm de profundidad, dimensión de las burbujas ~ 20 µm. Frecuencia de repetición de 3 Hertz, velocidad de barrido 250 µm/seg.....	100

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
37. Canales permanentes a 100 μ m de profundidad, aplicando fluencias hasta 30 veces la Fu, empleando láser de 5ns.....	101
38. Canales permanentes a 100 μ m de profundidad aplicando fluencias hasta 80 veces la Fu, empleando láser de 5ns.....	102
39. Canales de burbujas generadas a 100 μ m de profundidad, empleando pulsos de ns, con una frecuencia de suministro de pulsos de 3 Hz. a) Fluencia aplicada: 6.5 Fu, obteniendo un canal con ancho de 95 μ m, b) Fluencia aplicada: 7.6 Fu, obteniendo un canal con ancho de 140 μ m, c) Fluencia aplicada: 9.8 Fu, obteniendo un canal con ancho de 156 μ m, d) Fluencia aplicada: 12 Fu, obteniendo un canal con ancho de 230 μ m.....	103
40. Canales de burbujas generadas en tejido corneal a 100 μ m de profundidad, aplicando pulsos de ns, con una frecuencia de suministro de pulsos de 3 Hertz. a) Fluencia aplicada: 16.4 Fu, obteniendo un canal con ancho de 150 μ m, b) Fluencia aplicada: 22 Fu, obteniendo un canal con ancho de 260 μ m, c) Fluencia aplicada:, obteniendo un canal con ancho de 300 μ m; e) Ablación generada en la superficie, con un suministro de pulsos de 3 Hertz, aplicando una fluencia de 27.5 Fu (la fluencia aplicada para este caso es la misma que se aplicó en el caso d), diferenciándolos solo por la profundidad a la cual se realiza la irradiación).....	104

Figura	Página
41. Burbujas generadas a la fluencia umbral irradiando a 400 μm de profundidad, dimensión de las burbujas $\sim 30 \mu\text{m}$. Frecuencia de repetición de 3 Hertz, velocidad de barrido 250 $\mu\text{m}/\text{seg}$	105
42. Canales permanentes a 400 μm de profundidad, aplicando hasta 160 Fu, empleando láser de 5ns.....	106
43. Canales permanentes a 400 μm de profundidad, aplicando hasta 180 Fu, empleando láser de 5ns.....	107
44. Burbujas generadas en tejido corneal a 400 μm de profundidad, empleando pulsos de ns, usando una frecuencia de repetición de 15 Hz, a) Fluencia aplicada: 9.4 Fu, obteniendo un canal con ancho de 270 μm (variación entre medidas del canal de $\pm 80 \mu\text{m}$); b) Fluencia aplicada: 6.5 Fu, obteniendo un canal con ancho de 240 μm (variación entre medidas del canal de $\pm 50 \mu\text{m}$).....	108
45. Burbujas generadas en tejido corneal a 400 μm de profundidad, empleando pulsos de ns, usando una frecuencia de repetición de 15 Hz . a) Fluencia aplicada: 38 Fu, obteniendo un canal con ancho de 310 μm (variación entre medidas del canal de $\pm 50 \mu\text{m}$); b) Fluencia aplicada: 18.4 Fu, obteniendo un canal con ancho de 80 μm (variación entre medidas del canal de $\pm 10 \mu\text{m}$).....	109

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
46. Canales de burbujas obtenidas en la córnea de un globo ocular completo capturada 1 minuto después de llevar a cabo barridos con pulsos de 5ns, a una frecuencia de repetición de 15 Hz.....	110
47. Canales de burbujas obtenidas en la córnea de un globo ocular completo capturado 45 minutos después de llevar a cabo los barridos.....	111
48. Canales de burbujas obtenidas en la córnea de un globo ocular completo 90 minutos después de llevar a cabo los barridos.....	111
49. Cambio de temperatura registrado por el termopar en función de la fluencia aplicada, la separación entre el termopar y el punto irradiado es aproximadamente de 600µm. Pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.....	114
50. Lectura del cambio de temperatura registrado por el termopar a distintas fluencias. La separación entre el termopar y el punto irradiado es aproximadamente de 800µm. pulsos empleando láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.....	115
51. Cambio de temperatura registrado por el termopar a distintas fluencias, la separación entre el termopar y el punto irradiado es de aproximadamente 550µm. pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.....	116

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
52. Irradiaciones aplicadas a 400 μm de profundidad, la distancia entre el termopar y el punto irradiado $\sim 500 \mu\text{m}$. pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.....	117
53. Irradiaciones aplicadas a 400 μm de profundidad, la distancia entre el termopar y el punto irradiado $\sim 500 \mu\text{m}$. Pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.....	118
54. Tamaño de las burbujas como función de la fluencia aplicada empleando fs.....	119
55. Canales de burbujas generadas a 100 μm de profundidad, empleando pulsos de fs, a) Fluencia aplicada: 2.8 F_u , obteniendo un canal con ancho de 33 μm , b) Fluencia aplicada: 2 F_u , obteniendo un canal con ancho de 21 μm	120
56. Requerimientos de fluencia para formar canales con dimensiones similares usando pulsos de ns y fs.....	129
57. Comparación del cambio de temperatura a dos distintas profundidades.....	132
58. Temperatura promedio del tejido para irradiación por pasos, de fluencias altas a fluencias bajas.....	133
59. Temperatura promedio del tejido para irradiación por pasos de fluencia bajas a fluencias altas.....	134

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla</i>		<i>Página</i>
I.	Valores establecidos de los diferentes elementos que integran la córnea.....	29
II.	Dimensiones estimadas para ambos haces láser enfocados con la lente de 6mm de distancia focal.....	46
III.	Dimensiones de haz enfocado obtenidas experimentalmente.....	48
IV.	Experimentos realizados para el estudio de las burbujas de cavitación.....	123
V.	Comparación de valores obtenidos para irradiaciones aplicadas a 100 μ m y 400 μ m, empleando el láser de ns.....	125
VI.	Comparación de fluencias similares aplicadas a 100 μ m de profundidad para obtener canales de ancho similar empleando dos láseres distintos (ns, fs).....	128
VII.	Comparación de valores publicados y los obtenidos en nuestra investigación.....	130
VIII.	Valores teóricos de la temperatura que adquiere el tejido en el punto de irradiación.....	136

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El descubrimiento del láser ha logrado generar grandes adelantos tecnológicos. Un campo de investigación que continuamente se logra extender y mejorar son las aplicaciones en la medicina. Una de las aplicaciones más comunes es la ablación y corte de ciertos materiales de una manera controlada y con notable precisión. Con la aplicación de técnicas láser en algunas intervenciones quirúrgicas el paciente logra una mejor evolución postoperatoria, siendo ésta la razón primordial del desarrollo de este tipo de intervenciones quirúrgicas.

Algunas de las aplicaciones clínicas de láseres que actualmente se efectúan en varias especialidades médicas y quirúrgicas son:

- Oftalmología [Tortora y Anagnostako, 2004; Juhasz T. *et.al.*, 1999] (tratamiento del glaucoma, cirugía de córnea, tumores, cataratas, cirugía fotorefractiva).
- Dermatología y cirugía plástica [Xiaoayan, *et.al.*, 2005; Goldberg *et. al.*, 1998] (eliminación de lesiones, manchas de vino de oporto, y tatuajes).
- Cirugía gastrointestinal [Tortora y Anagnostako, 2004] (control de hemorragia y eliminación de tumores).
- Cirugía general [Tortora y Anagnostako, 2004] (incisiones y eliminación de úlceras de decúbito y leucoplaquias).
- Ginecología [Tortora y Anagnostako, 2004] (tratamiento de neoplasia vulvares, vaginales y cervicales, y endometriosis).
- Neurocirugía [Loeser *et.al.*, 1998] (incisión o eliminación de tejidos cercanos a estructuras vasculares o nerviosas sensitivas).
- Otorrinolaringología [Tortora y Anagnostako, 2004] (amigdalectomía, tratamiento de tumores de laringe y eliminación de pólipos nasales).
- Urología [Tortora y Anagnostako, 2004] (eliminación de lesiones y apertura de estenosis).
- Odontología [Smausz *et.al.* , 2004].

I.2. Objetivos

I.2.1. Objetivo general

El uso de láseres pulsados en el procesamiento, y en especial en el microprocesamiento de materiales tiene como finalidad producir remoción de material (ablación) o transformación de las propiedades físicas de los materiales con un daño colateral mínimo.

El ojo es un buen candidato para la aplicación de una cirugía altamente precisa lo cual se puede lograr empleando un láser de pulsos ultracortos [Spooner *et. al.*, 2000].

El objetivo general de este trabajo de tesis es explorar algunas aplicaciones de láseres pulsados en una rama de la medicina como lo es la oftalmología. El objetivo particular es estudiar el comportamiento del tejido corneal al ser expuesto a irradiación de pulsos láser, en particular de pulsos cortos (nanosegundos) y ultracortos (femtosegundos). Un láser de pulsos cortos puede ser un buen instrumento al aplicarlo correctamente en el tratamiento de algún problema médico; en nuestro caso, en problemas de tipo oftálmico: el uso de un pulso lo suficientemente corto ofrece la gran ventaja de poder aplicar una cierta cantidad de energía confinada en un volumen de material muy bien definido. Esto hace posible minimizar la invasión del tejido vecino permitiendo una alta precisión y la supresión de daño colateral en la vecindad de la zona donde se aplica la irradiación láser. Un claro ejemplo del daño que se puede presentar, y que se trata

de evitar, en las operaciones médicas con láser es una excesiva producción de calor y por lo tanto un aumento de temperatura, ya que si esto llegara a suceder ocasionaría la pérdida irreversible de las propiedades originales del tejido.

I.2.1. Objetivo particular

El objetivo particular de este trabajo fue observar el efecto físico que se presenta en el tejido corneal al ser irradiado por un láser de pulsos cortos; al irradiar el tejido corneal a una profundidad dada se observa la generación de burbujas [Wray W.O. *et al.*, 2002] con dimensiones que dependen de la fluencia láser suministrada al tejido. Este efecto fue estudiado a detalle dentro de nuestro trabajo de investigación. Otro de los aspectos de la interacción láser con la córnea, que se buscó comprender y caracterizar, fue el comportamiento térmico que presenta el tejido al ser irradiado con una cierta fluencia. Es de suma importancia poder determinar el cambio de temperatura que experimenta el tejido pues de esta manera tendremos un control adecuado de los procesos que podrían generar daño a la córnea.

De gran relevancia para el desarrollo del presente trabajo fue la relación establecida con el rastro municipal de Ensenada, ya que gracias a esta vinculación es posible la adquisición de globos oculares porcinos, de donde se extraen muestras de córnea para nuestros experimentos. Es de suma importancia la participación en este proyecto de los oftalmólogos que integran la Clínica de Ojos

de Tijuana. Su participación consiste en proporcionarnos entrenamiento para la obtención y manipulación de las muestras de córnea porcina, además de su contribución en la interpretación y aplicación de los resultados que emanan de nuestra investigación.

Al someter un tejido a irradiación láser es importante determinar la fluencia umbral que se requiere para generar algún tipo de daño en el tejido. Por lo tanto es importante establecer un método apropiado para determinar la fluencia umbral de daño. El desarrollo de este método constituye una parte importante del trabajo que se presenta en esta tesis.

Dentro de la primera etapa de la investigación se estudió la estructura del ojo, y en particular la estructura de la córnea, se aprendieron técnicas sobre los cuidados pertinentes que se deben procurar a las muestras de tejido para que se conserven sus propiedades iniciales durante las sesiones experimentales.

Es importante mencionar que nuestros experimentos se llevaron a cabo con dos tipos de láseres pulsados uno en el régimen de nanosegundos y otro en el de femtosegundos. La realización de experimentos de irradiación de córnea bajo condiciones similares, excepto en la que concierne a la duración del pulso láser nos dio la oportunidad de poder diferenciar los fenómenos físicos que se presentan al irradiar el tejido ya sea con pulsos de nanosegundos o bien con pulsos de femtosegundos.

En los capítulos siguientes haremos una descripción detallada de la manera en que está constituida anatómicamente la córnea; se discutirá el diseño y desarrollo de nuestros experimentos; presentaremos los resultados

experimentales y algunas estimaciones teóricas. También presentaremos una discusión de los distintos resultados obtenidos. Por último presentaremos las conclusiones a las cuales llegamos al finalizar nuestro trabajo y propondremos trabajo futuro en base a los resultados y conclusiones presentadas en esta tesis.

II. CONCEPTOS BASICOS

II.1. Introducción

Este capítulo se enfoca en la revisión de algunos conceptos básicos importantes, con la finalidad de comprender de manera adecuada el trabajo de investigación experimental realizado.

Es importante analizar con detalle las características que ofrecen los láseres de pulsos cortos y ultracortos, en cuanto al tipo de interacción que estos producen sobre un determinado material.

Algunos de los diferentes efectos que se producen sobre el tejido al ser sometidos a irradiación láser, son: fotoablación, cambio de temperatura del tejido al ser irradiado, la formación de material ionizado (plasma) en el tejido, etc.

Ya que el tejido con el que trabajamos es tejido corneal, es indispensable conocer las características ópticas y físicas de la córnea.

II.2. Características de una interacción láser- material usando pulsos de nanosegundos y femtosegundos

Al realizar estudios de la interacción de láseres pulsados con tejido biológico, es importante conocer la duración del pulso láser, ya que los efectos físicos que se produzcan sobre el material estarán en buena medida determinados por este parámetro.

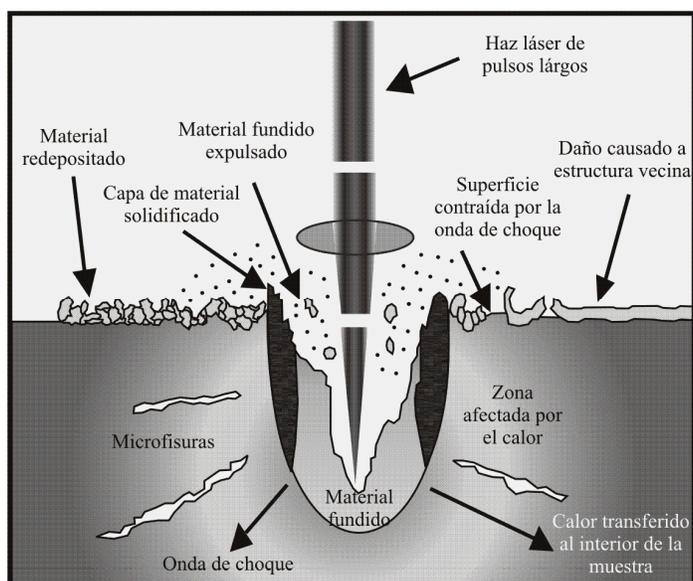
Existen dos regímenes distintos de la interacción de pulsos con el material:

- ***Régimen de picosegundos (10^{-12} segundos) y nanosegundos (10^{-9} segundos).*** La duración del pulso es del orden o mayor al tiempo de relajación electrónica del material, y por lo tanto la energía contenida en el pulso láser y que es absorbida por los electrones es transferida al material produciendo calor en el punto de irradiación, el cual puede propagarse en la vecindad de dicho punto de irradiación. Esto favorece que el material llegue a fundirse, o bien se produzca rápidamente una nube de ablación (al inicio del pulso) dando lugar a que la energía remanente en el pulso se refleje o bien se absorba en la nube de material ionizado. La irradiación de un material, cuyo coeficiente de absorción es significativo a la longitud de onda de la luz incidente, con un pulso

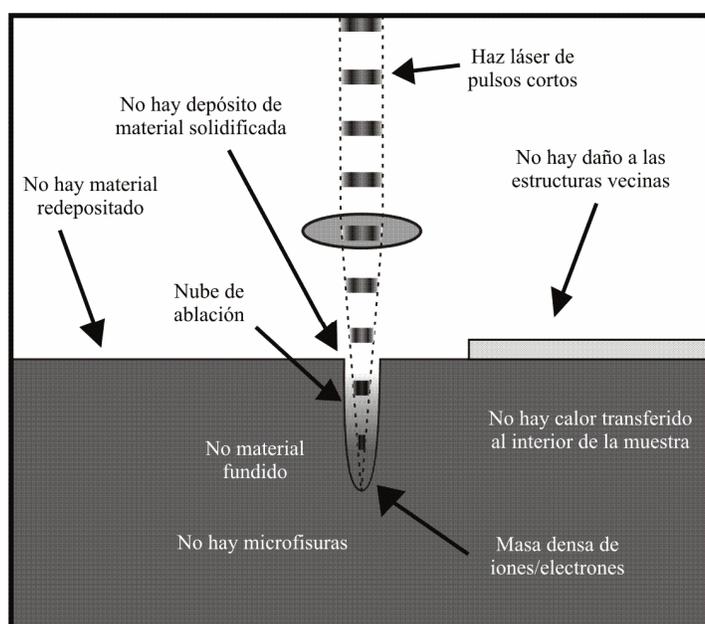
con duración de nanosegundos y hasta varios picosegundos genera daños colaterales del tipo mecánico.

- **Régimen de femtosegundos (10^{-15} segundos)** La duración del pulso es más corta que el tiempo de relajación electrónica del material. En este caso, el pulso láser se extingue antes de que la energía óptica transformada en “calor” se propague más allá del volumen de interacción [Momma, *et. al.*, 1996; Von Der Linde, *et. al.* 1997]. De esta forma la energía queda confinada en el volumen del material definido por las dimensiones del haz láser. En este caso se crea una nube de ablación de manera instantánea y con ello, la acción de fuerzas de coulomb producirán la expulsión del material ionizado de manera más efectiva que el caso de picosegundos y sobre todo de nanosegundos, minimizando los daños colaterales. Lo anterior hace posible un microprocesado de materiales con mayor fineza que cuando se emplean pulsos de duración en el rango de nanosegundos.

En la figura 1 a) y b) podemos ver esquemáticamente los efectos que se producen al trabajar en cada uno de los regímenes antes mencionados.



a)



b)

Figura 1. Dinámica de ablación del láser usando a) pulsos de larga duración y b) pulsos de corta duración [Bado y Said, 2001].

II.3. Mecanismos de interacción ocurridas en el tejido biológico al ser irradiado por láser

Para estudiar los fenómenos que se presenta durante la irradiación láser de tejido biológico es necesario conocer las propiedades ópticas de dicho material como lo son: el coeficiente de reflexión, de absorción y de esparcimiento.

Algunos de los fenómenos que se pueden presentar en el tejido biológico como resultado de la irradiación láser son:

- Interacción fotoquímica
- Producción de calor
- Fotoablación
- Inducción de plasma
- Fotodisrupción

En seguida se presenta una descripción detallada de cada uno de los fenómenos mencionados anteriormente.

II.3.1. Interacción fotoquímica

Un claro ejemplo de una interacción fotoquímica es el proceso de fotosíntesis que ocurre en las plantas al contar con la presencia de luz. El fenómeno fotoquímico involucra la presencia de un receptor cromóforo

(agrupamiento químico causante de la coloración de una sustancia) actuando como catalizador (elemento o componente capaz de realizar la transformación química motivada por sustancias que no se alteran en el curso de la reacción). Una técnica fotoquímica aplicada en la rama médica es conocida como fotodinámica y consiste en la irradiación del tejido con luz de una lámpara de LEDs (Light Emitting Diode). Esta lámpara proporciona una luz visible atérmica de banda estrecha de elevada pureza espectral. Al ser ésta una emisión de baja potencia no es un sistema invasivo. La luz emitida por el sistema de LEDs activa fotorreceptores en el tejido, que a su vez provocan una cascada de respuestas biológicas que transforman estructuras celulares induciendo los cambios deseados [Instituto médico láser, 2004, Moseley, *et al.* 2006]. Esta técnica óptica se emplea para tratamientos de cáncer, problemas de acné y renovación de la piel entre otras aplicaciones.

II.3.2. Interacción térmica (producción de calor)

La interacción térmica es un fenómeno de gran relevancia que debemos de considerar al realizar un estudio que involucre la aplicación de luz láser en un tejido biológico; el efecto importante a estudiar es el incremento de temperatura producido por el calentamiento láser del tejido, que a su vez resulta de la absorción de energía óptica a través del coeficiente de absorción lineal del tejido.

El tejido biológico puede sufrir varios efectos (físicos, químicos y biológicos) provocados por un incremento de temperatura local, dichos efectos

pueden ser: coagulación, vaporización, carbonización y fundimiento; todos estos efectos están directamente relacionados con la magnitud del incremento de temperatura y el tiempo de exposición a dicho incremento.

La necesidad de un estudio detallado del calentamiento del tejido ocasionado por la irradiación láser se debe a que los distintos componentes bioquímicos del tejido se deterioran a ciertas temperaturas del orden de unas decenas de grados centígrados.

La temperatura del cuerpo humano en su estado sano es de 37°C , los efectos que se producen con un incremento de temperatura de hasta 5°C sobre este valor se consideran libres de riesgo, debido a que bajo estas condiciones no se produce un cambio significativo sobre la composición bioquímica y biofísica del tejido. Sin embargo, al presentarse un cambio molecular generado por la aplicación de calor sobre el tejido se produce una alteración en las membranas y destrucción de enlaces celulares. A esto se le denomina *hipertermia*. Este fenómeno se presenta cuando se registra una temperatura del tejido en el rango de los 42 a 50°C . Cuando la temperatura registrada en el tejido alcanza valores mayores a 50°C , se presenta una reducción en la actividad enzimática. Esto genera que la transferencia de energía en las células disminuya y se presente inmovilidad celular. Al alcanzar el tejido una temperatura de 60°C , se observa una desnaturalización de proteínas y colágeno, lo cual conduce a que se presente el efecto de *coagulación* y necrosis (degeneración de un tejido por muerte de sus células) sobre el tejido. Cuando se alcanzan temperaturas de 100°C las moléculas de agua contenidas en la mayoría de los tejidos comienzan a *evaporarse*. El

alcanzar esta temperatura tiene una ventaja, pues la vaporización del agua contenida en el tejido ayuda a eliminar el calor contenido en él, evitando un incremento mayor de temperatura que daría como resultado un mayor daño al tejido. Dentro de esta etapa se presenta un cambio en el volumen del material, induciendo la formación de burbujas de gas y ocasionando rupturas mecánicas y fragmentaciones en la estructura del tejido. Si se alcanzan temperaturas por arriba de 100°C se presenta el proceso de *carbonización*; para temperaturas mayores a 300°C , y dependiendo de las propiedades del tejido a tratar, se presenta el fenómeno de *fundimiento*.

Sin un control adecuado de la cantidad de calor generado al irradiar el tejido podemos ocasionar que el tejido se queme y no vuelva a regenerarse. Es por esto que el estudiar el comportamiento térmico del tejido al ser irradiado por el láser es una tarea primordial.

II.3.3. Fotoablación

Ablación láser [Oraevsky *et. al.*, 1995; Paltauf Günther y Dyer Peter E. 2003; Anisimov y Luk'yachuk, 2002] es la remoción de material causado por el rompimiento directo de los enlaces electrónicos del material, al ser irradiado por un láser de emisión continua o pulsada de cierta potencia o fluencia umbral bien definida.

El umbral en donde se presenta este tipo de efecto de ablación en tejido biológico está aproximadamente en el rango de 10^7 a 10^8 W/cm² en láseres pulsados con duración del pulso de nanosegundos.

Esta técnica cuenta con ciertas ventajas, pues la precisión con la cual se puede llevar a cabo la ablación es muy buena, del orden de la distancia de penetración óptica.

Un ejemplo claro del empleo de esta técnica en la medicina es la cirugía refractiva corneal, donde la potencia refractiva del tejido corneal es alterada para solucionar problemas como miopía, hipermetropía, o astigmatismo. La técnica comúnmente utilizada para este propósito es conocida como LASIK (laser assisted in situ keratomileusis).

II.3.4. Inducción de plasma (material ionizado)

El parámetro más importante en la inducción de plasma es la fuerza local del campo eléctrico \vec{E} . El umbral en intensidad donde se presenta este tipo de efecto está aproximadamente en el rango de 10^{11} a 10^{13} W/cm². La generación del plasma inducido por dos tipos de láseres (Conmutación-Q y Amarre de Modos), se muestra gráficamente en la figura 2.

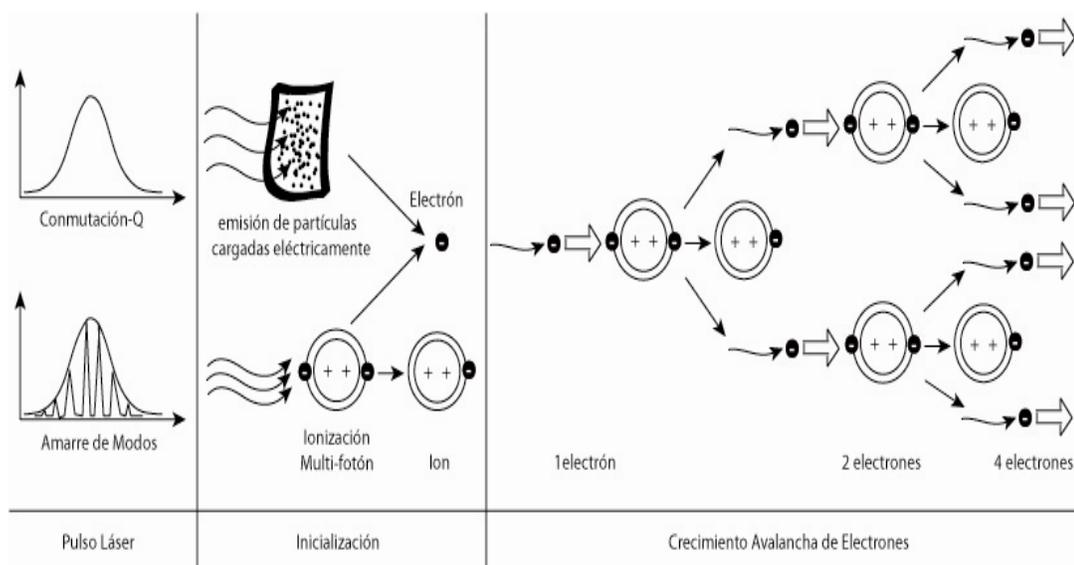


Figura 2. Diagrama esquemático de la generación del plasma mediante un láser.

Éste fenómeno puede ser de utilidad en medicina sobre tejidos transparentes como la córnea, ya que permite llevar a cabo el procesamiento de material, sin que exista necesariamente un coeficiente de absorción lineal significativo a la longitud de onda de la luz incidente.

II.3.5. Fotodisrupción

El efecto de foto disrupción es provocado por un rompimiento en los enlaces mecánicos del tejido. Tanto el efecto de disrupción como el efecto de ablación son dos mecanismos de interacción relacionados a la generación de material ionizado. Estos dos efectos son difíciles de diferenciar uno de otro.

Cuando se trabaja con pulsos láser cuya fluencia depositada sobre el material es alta, se genera en el material una onda de choque y otros

mecanismos secundarios que llegan a ser importantes (como son los efectos mecánicos) e inclusive pueden llegar a determinar el efecto global en el tejido.

Existe un efecto físico llamado *cavitación*, que se origina por la fotodisrupción en un fluido. Cuando un líquido contenido en un volumen dado fluye dentro de una región donde la presión se ve reducida hasta alcanzar la presión de vapor, se presenta el fenómeno conocido como ebullición. Al momento de producirse dicho fenómeno se observa la generación una burbuja de vapor en el fluido, conocida como burbuja de cavitación. En un líquido el parámetro de cavitación (σ) se define [Streeter, 1962] como:

$$\sigma = \frac{P - P_v}{\rho V^2 / 2}, \quad (1)$$

donde P es la presión absoluta en el punto de interés, P_v es la presión de vapor del líquido, ρ es la densidad del líquido, y V es la velocidad de generación de la cavitación.

El parámetro de cavitación es una manera de definir el coeficiente de presión, cuando σ es igual a cero, la presión en el material es reducida a presión de vapor y se presenta el fenómeno de ebullición.

Es posible observar el fenómeno de cavitación al irradiar un material como el tejido con un pulso láser. Para esto se requiere colocar la cintura del haz por debajo de la superficie del tejido, el pulso láser en un periodo de tiempo muy corto deposita sobre el tejido cierta cantidad de fluencia, lo anterior produce un

cambio súbito en la temperatura y presión en el volumen del tejido irradiado dando lugar a una burbuja conocida comúnmente como *burbuja de cavitación*. Dichas burbujas consisten de vapores gaseosos [Takamizawa A., *et al.*, 2003] (principalmente de vapor de agua y óxidos de carbono). Las dimensiones de la burbuja son dependientes de la cantidad de fluencia depositada sobre el material. Además, existe una fluencia umbral bien definida para la formación de burbujas. La influencia de la duración del pulso en la formación de burbujas en el tejido son motivo de estudios en esta tesis.

La fotodisrupción es una buena herramienta para cirugías de mínima invasión. Algunas de las aplicaciones médicas de este efecto de foto disrupción están en la cirugía posterior de cataratas y en los cálculos urinarios.

II.4. Definiciones relevantes

Un proceso de ablación se puede caracterizar en función de la *fluencia* aplicada, es decir, la cantidad de energía óptica depositada en el material por unidad de área.

A continuación desarrollaremos algunos conceptos que nos llevarán a la definición formal de la fluencia. Iniciamos con la expresión para el campo eléctrico de un pulso láser Gaussiano,

$$E(r,t) = E_0 e^{i\omega t} e^{-\frac{r^2}{w^2}} e^{-\frac{t^2}{\tau^2}}, \quad (2)$$

donde E_0 es la amplitud del campo eléctrico, w es el radio del haz ($HWe^{-1}M$), τ es la duración del pulso (FWHM), ω es la frecuencia de oscilación del campo eléctrico, r es la coordenada transversal, t es la variable temporal.

Por otra parte, la *irradiancia* es la cantidad que describe la potencia óptica confinada sobre una cierta superficie, en otras palabras es la energía óptica depositada durante un cierto periodo de tiempo t , sobre cierta sección transversal de radio r , y se puede definir como:

$$I_{rr}(r,t) = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} E(r,t) E^*(r,t), \quad (3)$$

donde ε es la permitividad eléctrica, μ es la permeabilidad magnética, E^* es el complejo conjugado del campo eléctrico

Si asociamos las dos ecuaciones anteriores (sustituyendo la ecuación 2 dentro de la Ecuación 3), obtenemos la irradiancia asociada a un pulso gaussiano como:

$$I_{rr}(r,t) = \frac{E_0^2}{2} \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} e^{-\frac{2r^2}{w^2}} e^{-\frac{2t^2}{\tau^2}} = I_0 e^{-\frac{2r^2}{w^2}} e^{-\frac{2t^2}{\tau^2}}, \quad (4)$$

donde

$$I_0 = \frac{E_0^2}{2} \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} \quad (5)$$

La fluencia por pulso es definida como la cantidad de energía del pulso depositada sobre la muestra en el área confinada a la sección transversal del haz. Por lo tanto, la fluencia asociada al pulso se obtiene, integrando desde $t = -\infty$ hasta $t = +\infty$ sobre el pulso completo [Maisterrena, 2006]. Por lo tanto la fluencia para un pulso gaussiano estará dada por:

$$F_p(r) = \int_{-\infty}^{\infty} I_{rr}(r,t) dt = \frac{E_0^2}{2} \sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} e^{-\frac{2r^2}{w^2}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{2t^2}{\tau^2}} dt ,$$

$$F_p(r) = E_0^2 \frac{\tau}{2} \sqrt{\frac{\pi \epsilon}{2 \mu}} e^{-\frac{2r^2}{w^2}} = I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} \tau e^{-\frac{2r^2}{w^2}} , \quad (6)$$

Al calcular la integral de I_{rr} con respecto al espacio obtenemos la potencia instantánea por pulso, quedando la expresión como:

$$p(t) = \int_0^{\infty} I_{rr}(r,t) 2\pi r dr = E_0^2 \frac{\pi w^2}{4} \sqrt{\frac{\epsilon}{\mu}} e^{-\frac{2t^2}{\tau^2}} = I_0 \frac{\pi w^2}{2} e^{-\frac{2t^2}{\tau^2}} . \quad (7)$$

Si se evalúa la doble integral de I_{rr} con respecto al tiempo y el espacio, obtenemos la energía total por pulso, expresada como:

$$E_{tot} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} I_{rr}(r,t) 2\pi r dr dt = E_0^2 \frac{\pi w^2 \tau}{4} \sqrt{\frac{\pi \varepsilon}{2 \mu}} = I_0 \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} w^2 \tau. \quad (8)$$

Para propósitos experimentales es conveniente expresar la fluencia de un pulso (F_p) en términos de la energía total (E_{tot}), ya que este parámetro es más factible de medir que el campo eléctrico (E_0). Por lo tanto, tomando la ecuación 8 se obtiene que:

$$\frac{2 E_{tot}}{\pi w^2} = E_0^2 \frac{\tau}{2} \sqrt{\frac{\pi \varepsilon}{2 \mu}},$$

y

$$\frac{2E_{tot}}{\pi w^2} = I_0 \sqrt{\frac{\pi}{2}} \tau.$$

Sustituyendo en la ecuación 6, finalmente obtenemos una expresión para la fluencia total de pulso en función de su energía total como:

$$F_p(r) = \left(\frac{2E_{tot}}{\pi w^2}\right) e^{-\frac{2r^2}{w^2}},$$

$$F_p(r) = \frac{2}{\pi w^2} E_{tot} e^{-\frac{2r^2}{w^2}}. \quad (9)$$

Esta expresión para la fluencia (ecuación 9) es válida para pulsos y haces Gaussianos.

Es importante definir la fluencia total asociada a una serie de pulsos depositados sobre una misma área durante un cierto intervalo de tiempo. A esta fluencia le llamamos fluencia integrada o fluencia neta (F_{int}), y está definida como la fluencia de un solo pulso por el número de pulsos incidentes sobre el área de interacción. Si consideramos que la sección transversal está determinada por el radio del haz $r = w$, de la ecuación (9) se obtiene que

$$F_p(w) = \frac{2\sqrt{2\pi}}{w^2} E_{tot} e^{-\frac{2w^2}{w^2}} = \frac{2\sqrt{2\pi}}{e^2} \frac{1}{w^2} E_{tot},$$

$$F_p(w) = \frac{2}{\pi w^2} E_{tot} e^{-\frac{2w^2}{w^2}} = \frac{2}{A_{haz}} E_{tot} e^{-2} = \frac{2}{e^2} \frac{E_{tot}}{A_{haz}}.$$

definiendo la constante β , como

$$\beta = \frac{2}{e^2},$$

obtenemos:

$$F_p(w) = \beta \frac{E_{tot}}{A_{haz}}, \quad (10)$$

donde A_{haz} es la sección transversal del haz con un radio w .

La fluencia integrada se expresa como

$$F_{int} = \beta N \frac{E_{tot}}{A_{haz}}, \quad (11)$$

con

$$N = f_{rep} \times t_{exp}, \quad (12)$$

donde N es el número de pulsos que incide sobre la misma área, f_{rep} es la frecuencia de suministro de los pulsos, t_{exp} es el tiempo de exposición sobre la misma área.

La *fluencia umbral de ablación* se define como el valor mínimo de fluencia requerido para iniciar la remoción del material (tejido). En nuestro caso estudiaremos el efecto de formación de burbujas en el tejido y determinaremos la *fluencia umbral de formación de burbujas* (F_u) se define como la mínima fluencia requerida sobre el tejido al irradiarlo a una determinada profundidad, donde se observa la generación de una burbuja con dimensiones mínimas (rango entre 5-30 micrómetros de diámetro).

II.5. Tejido corneal

Dado que queremos llevar a cabo un estudio de ablación láser en tejido corneal, es de suma importancia conocer adecuadamente la córnea: su composición, funcionamiento y propiedades principales.

La curvatura de la córnea es responsable de la mayor parte de la potencia refractiva del ojo [Djotyan, *et. al.*, 2001]. La córnea está localizada en la parte externa del globo ocular como se muestra en la figura 3. No presenta coloración y es totalmente transparente en el visible y cercano infrarrojo, permitiendo la

transmisión eficiente de la luz al interior del ojo. Su forma es la de una lente cóncavo-convexa. El globo ocular contiene dos lentes, las cuales son la córnea y el cristalino. La córnea es la capa que recubre el ojo (tiene contacto con el medio ambiente) en conjunto con la esclera. Es importante preservar la calidad óptica de la córnea, ya que de lo contrario se impediría el paso adecuado de luz a los componentes internos del ojo. La corrección de problemas de visión como miopía, astigmatismo e hipermetropía se llevan a cabo en la córnea, ya que es posible moldearla “a voluntad” a través de un procedimiento quirúrgico.

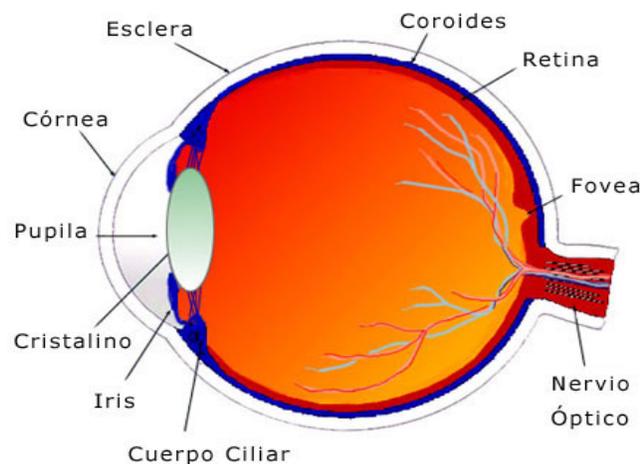


Figura 3. Esquema del globo ocular.

Las dimensiones de la córnea para la población promedio son 12 mm de medida horizontal, 11.5 mm de medida vertical y entre 550-600 μm de espesor; la figura 4 muestra gráficamente las medidas de la cornea mencionadas

anteriormente. El grosor en la periferia es mayor (por algunos micrómetros) que el grosor en el centro de la córnea.

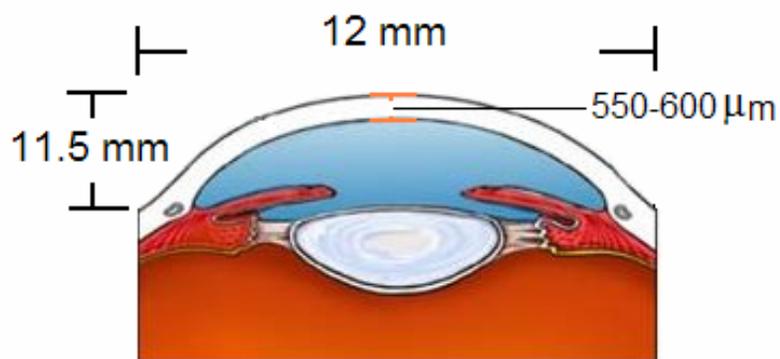


Figura 4. Medidas de las dimensiones de la córnea.

La córnea está constituida por cinco capas diferentes, las cuales tienen una función distinta cada una. La figura 5 muestra en un corte transversal la manera en que está constituida la córnea por capas.

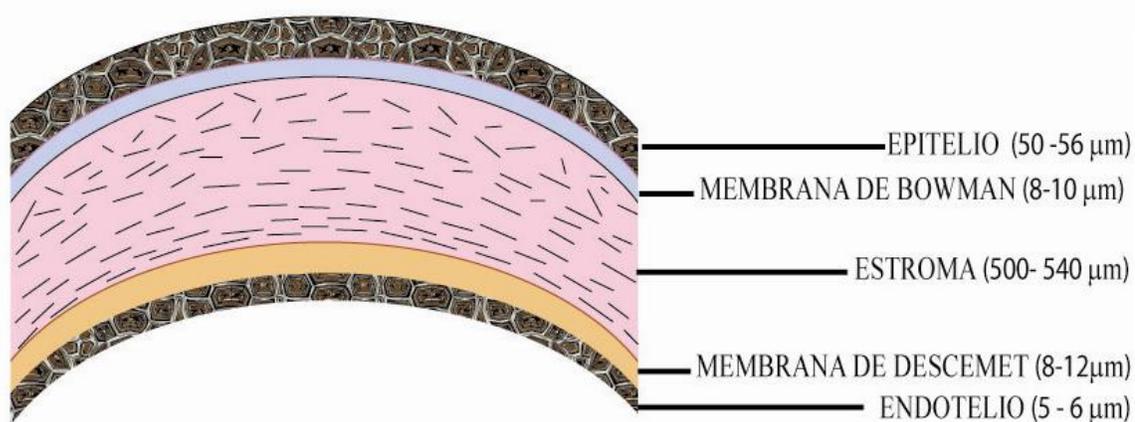


Figura 5. Capas que componen la estructura de la córnea.

A continuación presentamos una pequeña descripción de cada una de las capas que integran la córnea en orden de la superior (capa que tiene contacto directo con el aire) a la inferior.

- *Epitelio*. Tiene un grosor de aproximadamente 50-56 μm y está compuesto por capas. Tiene de 5 a 7 capas en el centro y de 8 a 10 capas en la periferia. Una de las principales funciones del epitelio es proteger a las capas inferiores de algún daño físico. Una de sus virtudes es la alta resistencia que presenta esta capa a situaciones de riesgo. Y otra cualidad muy importante es la regeneración, si por alguna circunstancia física llegara a dañarse cierta zona de ésta capa. El riesgo de perder la capa es baja pues después de un evento solo toma unos días para regenerarse, adquiriendo las cualidades originales. La unión intercelular que posee la capa epitelial está muy desarrollada. Está compuesta por tres tipos de células, las cuales son:
 - Escamosas
 - Intermedias
 - Basales
- *Membrana de Bowman*. El grosor de ésta capa es aproximadamente de 8 a 10 μm , su composición es a base de fibras de colágeno, una de las finalidades de esta segunda capa es mantener el aspecto transparente de la córnea; la pérdida de transparencia en la córnea significa una

deshidratación que se manifiesta como un cambio de aspecto de la córnea de transparente a un color blancuzco.

- *Estroma.* El grosor de esta capa es aproximadamente de 500-540 μm , esta capa constituye el 90 % del grosor total de la córnea. Dentro de esta capa se llevan a cabo la mayoría de las operaciones de corrección refractiva de la visión, como el procedimiento conocido como Lasik. Las razones para trabajar en esta capa incluyen, además de su espesor, que es mucho mayor al de las otras capas de la córnea, su composición celular. El estroma está compuesto de queratocitos. Al ser invadido el tejido estromal por un fenómeno externo como lo es la irradiación láser, los queratocitos son los encargados de restaurar las estructuras dañadas. La constitución del estroma es de aproximadamente 250 láminas paralelas compuestas por fibras de colágeno, la orientación que guardan es oblicua, esto confiere al tejido mucho mayor resistencia, pues el acomodamiento que se presenta entre las laminillas generan la existencia de cierta protección entre ellas. Entre una laminilla y otra se encuentran los queratocitos. El estroma también contribuye a la transparencia de la córnea. Se divide en dos zonas llamadas estroma anterior (parte superior del estroma, la estructura del acomodamiento de laminillas no presenta un patrón bien definido) y estroma posterior (parte inferior del estroma, la estructura del acomodamiento de fibrillas presenta un patrón de láminas paralelas entre si).

- *Membrana de Descemet.* El grosor de esta capa está en el rango de 8 a 12 μ m. Es una capa homogénea y fina. La unión de esta capa con el estroma no es muy estrecha, contiene grandes cantidades de glicoproteínas, laminina y colágeno, lo cual ayuda a que esta capa adquiera una alta elasticidad impidiendo su ruptura en condiciones de riesgo; una de sus propiedades es que tiene una mayor elasticidad que el estroma. Si por algún motivo esta capa llegara a romperse en alguna intervención quirúrgica su reacción es enrollarse hacia la capa anterior.
- *Endotelio.* Constituida de una monocapa celular, El grosor de esta capa está en el rango de 5 a 6 μ m. Debido a su ubicación esta capa está en contacto directo con el humor acuoso. Las células endoteliales presentan una superficie lisa que favorece una buena condición óptica. Una característica biológica que presenta esta capa es que las células que la constituyen no se regeneran. A medida que pasan los años existe una pérdida de este tipo de células; en un adulto joven la cantidad promedio de dichas células es de aproximadamente entre 3000 y 3500 por milímetro cuadrado, cuando el conteo se ubica en el rango de 500 a 700 por milímetro cuadrado, la persona puede llegar a perder la visión. Cuando se pretende llevar a cabo un estudio de irradiación láser en el tejido corneal es indispensable considerar las propiedades de no-regeneración de la capa endotelial.

II.5.1. Parámetros físicos que caracterizan la córnea

Algunos de los parámetros físicos de la córnea que se encontraron en la literatura se presentan en la tabla I y se describen a continuación.

Tabla I. Valores establecidos de los diferentes elementos que integran la córnea.

Compuesto	Densidad (Kg/m ³)	Porcentaje de peso (%)	Conductividad Térmica (Wm ⁻¹ K ⁻¹)	Calor específico (J/g K)
Agua	1000	79	0.22	≈ 0
Grasa	811	20	0.195	1.56
Proteínas	1536	1	0.603	4.178

- Densidad (ρ) [Kampmeier, *et. al.* 2000]

La córnea está compuesta básicamente de agua, grasa y proteínas. Si conocemos la densidad de cada uno de sus componentes y el peso aproximado, podemos determinar la densidad de la córnea con la siguiente expresión.

$$\rho_c = \frac{1}{\left(\frac{w_{agua}}{\rho_{agua}} + \frac{w_{grasa}}{\rho_{grasa}} + \frac{w_{proteinas}}{\rho_{proteinas}} \right)}, \quad (13)$$

donde w es la proporción del peso de cada elemento que integra la córnea, ρ es la densidad cada componente que integra la córnea.

La densidad de la córnea es de 1087 Kg/m³

- Conductividad térmica (K) [Kampmeier, *et. al.* 2000]

Una vez conocido el peso de los elementos que integran la córnea, la conductividad térmica de cada elemento y la densidad de la córnea podemos obtener su conductividad térmica. Así, la conductividad térmica de la córnea esta dada por:

$$K = \delta_m \sum_{n=1}^{n=3} \frac{K_n W_n}{\rho_n}, \quad (14)$$

donde K_n es la conductividad térmica de cada componente que integra la córnea.

La conductividad térmica de la córnea es de $0.530 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$

- Capacidad de calor específico (C) [Kampmeier, *et. al.* 2000]

El calor específico se obtiene conociendo el peso de cada elemento de la córnea y el calor específico de cada uno de los elementos que la integran, sustituyéndolos en la ecuación 15, se obtiene.

$$C = \sum_{n=1}^{n=3} W_n c_n, \quad (15)$$

donde C_n es el calor específico de cada elemento de la córnea

La capacidad de calor específico de la córnea es de 3.61 J/g K

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.1. Introducción

Este capítulo se dedicará a la descripción de la metodología experimental que se implementó para llevar a cabo los experimentos. Daremos una descripción del arreglo experimental que se empleó para tal propósito.

Los experimentos que llevamos a cabo implicaron la irradiación de tejido corneal empleando un láser de pulsos cortos (5ns) y uno de pulsos ultracortos (80fs). La finalidad era estudiar la formación de burbujas (mencionada en la sección II.3.5) en el tejido. También estudiamos el comportamiento del tejido en función del calentamiento láser producido por la irradiación.

Los experimentos se desarrollaron empleando tejido corneal porcino. La razón por la cual se trabajó con este tipo de tejido fue por la similitud biológica del globo ocular porcino con el globo ocular humano. La córnea es uno de los elementos que integran el globo ocular de ambas especies (humano y porcino); se presentan grandes similitudes, tanto en sus características físicas como biológicas.

El empleo de tejido corneal porcino provee de grandes ventajas a nuestra investigación pues nos ofreció un acercamiento directo con el tejido que deseamos investigar. Se identificaron las cualidades que ofrece el material como medio óptico, así como los inconvenientes que presenta en ciertas circunstancias. Ambos temas serán abordados con mayor detalle dentro de este capítulo.

El trabajar con tejido biológico presenta un cierto grado de dificultad, ya que se deben tener ciertos cuidados, tanto para la conservación y manejo del tejido, como para el personal que trabaja con dicho material. Es importante que el laboratorio en el cual se emplee tejido biológico cuente con las normas pertinentes de higiene y manejo de residuos biológicos. En este caso el CICESE tiene normas que señala como indispensables para mantener la seguridad.

III.2. Sistemas láser

En los experimentos que se realizaron en este trabajo de investigación se usaron dos diferentes láseres pulsados, uno de ellos es un Nd:YAG con pulsos del orden de 5 nanosegundos. El otro es un Ti:Zafiro con pulsos de aproximadamente 80 femtosegundos.

III.2.1. Láser de Nd:YAG (ns)

Uno de los láseres que se emplea es un Nd:YAG (de conmutación Q), doblado en frecuencia, con duración nominal del pulso del orden 5 nanosegundos (FWHM) y longitud de onda central de 532nm. Alcanza energías por pulso de hasta 25mJ, a una tasa de repetición de 15Hz (las especificaciones se presentan en el Apéndice A).

Es importante medir la duración real del pulso que usaremos en los experimentos, por lo que se llevó a cabo la caracterización de los pulsos utilizando un fotodetector cuyo tiempo de respuesta es de 1 ns (las especificaciones del fabricante están en el apéndice A) y un osciloscopio con resolución de 500 MHz. Ya que el tiempo de respuesta del detector es del orden de la duración esperada de los pulsos producidos por el láser, la traza obtenida en el osciloscopio para la detección de un pulso no representará necesariamente al pulso real [Ruiz-de-la-Cruz, 2006].

Con el fin de obtener la duración del pulso real del láser es necesario considerar la respuesta impulso del sistema de medición (osciloscopio y fotodetector). Para determinar la función de respuesta al impulso del sistema de medición se toma un pulso mucho más corto que el tiempo de respuesta del fotodetector, por ejemplo, un pulso de femtosegundos (52 fs FWHM, a la salida del oscilador del arreglo, descrito en la siguiente sección) que para efectos prácticos representa una función impulso comparada con la respuesta temporal del sistema

de medición [Maisterrena, 2006]. El resultado de la caracterización se muestra en la figura 6.

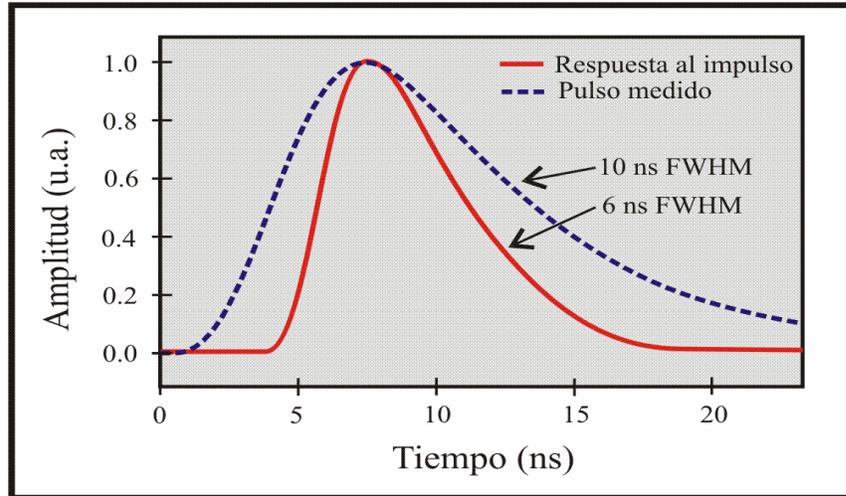


Figura 6. Perfil de la respuesta al impulso del sistema de medición y perfil del pulso medido con dicho sistema [Maisterrena, 2006].

Donde se puede observar que la convolución que relaciona la respuesta al impulso del sistema de medición y el pulso real (producido por el láser de Nd:YAG) nos da como resultado la función obtenida por el sistema de medición a partir del pulso real. Expresado matemáticamente como:

$$f_{med}(t) = f_{imp}(t) * f_{real}(t), \quad (16)$$

donde f_{med} es la función medida por el sistema de medición, f_{imp} es la función de respuesta al impulso del mismo sistema de medición, f_{real} es la función que representa al pulso real que es necesario medir.

El siguiente paso a realizar es deconvolucionar la función de la señal capturada en el sistema de medición, ya que se busca el valor del ancho del pulso real, por lo tanto es necesario aplicar la transformada de Fourier para pasar al espacio de la frecuencia, quedando la expresión como:

$$\mathcal{F}\{f_{med}(t)\} = \mathcal{F}\{f_{imp}(t)\} \times \mathcal{F}\{f_{real}(t)\}. \quad (17)$$

Despejando la función f_{real} y aplicando transformada inversa, obtenemos:

$$f_{real}(t) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{f_{med}(\omega)}{f_{imp}(\omega)} \right\}, \quad (18)$$

Considerando la respuesta al impulso y el perfil gaussiano obtenemos la siguiente expresión:

$$f_{real}(t) = \mathcal{F}^{-1} \left\{ \frac{\mathcal{F} \left\{ e^{-\frac{2t^2}{t_{imp}^2}} \right\}}{\mathcal{F} \left\{ e^{-\frac{2t^2}{t_{med}^2}} \right\}} \right\}, \quad (19)$$

donde t_{imp} es el ancho de la respuesta al impulso del sistema, t_{med} es el ancho del perfil medido con el sistema.

De la ecuación 19 obtenemos:

$$f_{real}(t) = \left(\frac{2t_{med}}{t_{imp} \sqrt{t_{med}^2 - t_{imp}^2}} \right) e^{\left(\frac{2t^2}{t_{med}^2 - t_{imp}^2} \right)}, \quad (20)$$

Aplicando la Ecuación 20, obtenemos la duración del pulso real τ_{real} (FWHM), como se muestra a continuación [Ruiz-de-la-Cruz, 2006]:

$$\tau_{real} = 1.1774 \sqrt{t_{med}^2 - t_{imp}^2}. \quad (21)$$

Empleando los datos que se obtuvieron (mostrados en la figura 5), y considerando que $t_{med} = 10\text{ns}$ y $t_{imp} = 6\text{ns}$, se obtiene que la duración del pulso del láser de Nd:YAG es: $\tau_{real} = 9.4\text{ns}$ (FWHM).

III.2.2. Láser de Ti:Zafiro (fs)

El equipo utilizado para la generación de pulsos ultracorto amplificados consta básicamente de dos componentes principales: un oscilador y un amplificador [Ruiz-de-la-Cruz, 2006]. Dentro de la etapa del *oscilador* se realiza la producción de pulsos ultra cortos mediante el método de amarre de modos [Fowles G. R., 1989]. El medio activo es un cristal de Ti: Zafiro bombeado con la línea verde (514.5 nm) de un láser de iones de Ar^+ de emisión continua con una potencia de 4.4W. Las características de los pulsos de femtosegundos generados

en el oscilador son: duración de 52fs (FWHM), medida por autocorrelación [Ruiz-de-la-Cruz, 2006], energía de 6 nJ por pulso, longitud de onda central de 803 nm (25 nm de ancho espectral), y una tasa de repetición de 70 MHz.

Dado que la energía por pulso proporcionada por el oscilador es muy baja (del orden de nJ) es necesario amplificar estos pulsos para usarlos en el procesado de materiales. Por lo tanto se debe contar con un sistema de amplificación de pulsos ultracortos. Este consta de varias etapas que se describen a continuación:

- *Expansor*. Etapa donde se incrementa la duración del pulso. Tiene la finalidad de disminuir la potencia pico del pulso para que, una vez amplificados, sean comprimidos a su duración original [Ruiz-de-la-Cruz, 2006]. El alargamiento de la duración de los pulsos se lleva a cabo introduciendo dispersión positiva a la velocidad de grupo del paquete de ondas que componen un pulso ultracorto, lo cual se hace utilizando rejillas de difracción.
- *Amplificación*. Dentro de esta etapa se usa un medio de ganancia (Ti:Zafiro) bombeado típicamente por láseres de Nd:YAG pulsados y longitud de onda en el verde (532 nm). Existen dos configuraciones comunes; el amplificador regenerativo y el amplificador multipasos [Ruiz-de-la-Cruz, 2006].

- *Compresor.* Es la etapa donde se revierte el efecto del expansor, comprimiendo el pulso a una duración cerca de su duración original [Ruiz-de-la-Cruz, 2006]. La compresión se lleva a cabo mediante rejillas de difracción que introducen dispersión positiva al paquete de ondas. Esto compensa la dispersión negativa que se proporcionó al paquete de ondas en la etapa de expansión del pulso.

Una vez realizado el proceso descrito arriba obtenemos pulsos de ~ 80 fs con una longitud de onda centrada en 803nm, alcanzando energías entre 600 μ J y 1 mJ por pulso, con una tasa de repetición de 10Hz, la cual está determinada por la frecuencia de repetición del bombeo.

La figura 7 muestra esquemáticamente las distintas etapas por las que el pulso se propaga desde el oscilador hasta la salida del compresor. A la salida de nuestro sistema obtenemos un tren de pulsos cada uno de los pulsos tiene una duración de 80 fs, con una separación entre pulsos consecutivos de aproximadamente 12 ns.

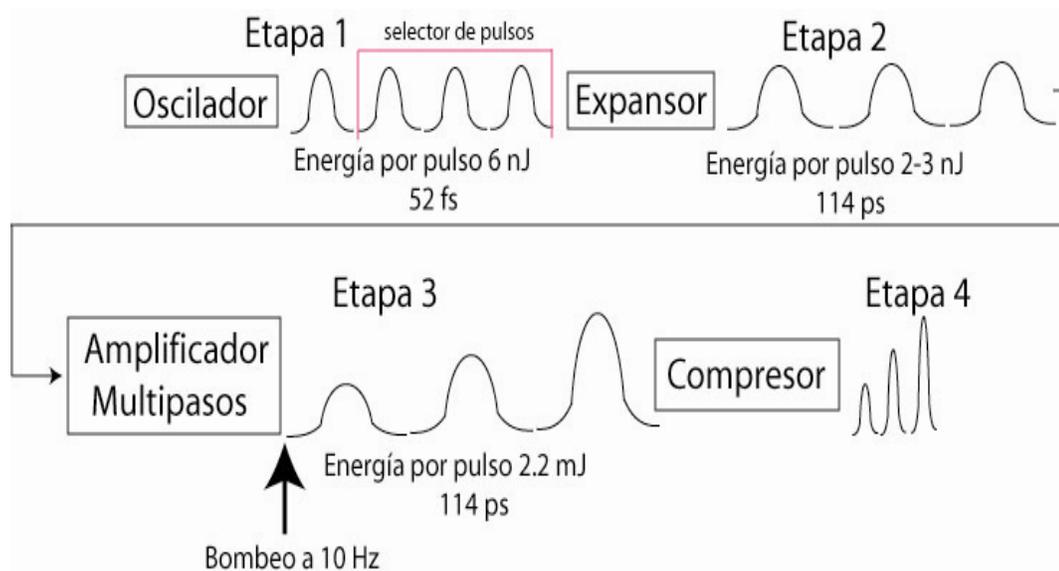


Figura 7. Representación esquemática de la amplificación de pulsos de femtosegundos

En la figura 8 podemos observar el comportamiento de la distribución de intensidad con respecto al tiempo de un pulso de femtosegundos, obtenido por el método de autocorrelación [Ruiz-de-la-Cruz, 2006].

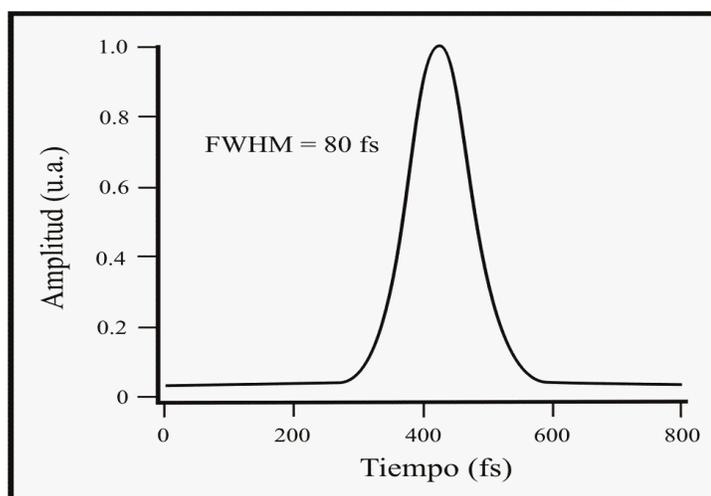


Figura 8. Perfil de intensidad del pulso de femtosegundos en el tiempo, obtenido por la autocorrelación del mismo pulso a la salida del compresor.

III.3. Caracterización del haz láser

Es importante caracterizar adecuadamente la propagación del haz real que emplearemos en los experimentos. Tomando como base las ecuaciones convencionales de haces gaussianos podemos obtener parámetros importantes de un haz enfocado, como lo es el tamaño de la cintura del haz y la distancia de Rayleigh. Estos parámetros son útiles en el diseño de nuestro experimento pues nos proporcionan información para poder estimar los valores de la fluencia que se administrará a las muestras de tejido corneal.

Un parámetro que debemos de conocer en nuestros dos láseres es el parámetro conocido como M^2 [Silfvast W., 1999], el cual es conocido como constante de propagación o factor de propagación y nos ayuda para conocer la calidad modal del haz láser. Dicho parámetro nos da información acerca de las propiedades del haz real en comparación con un haz gaussiano ideal o monomodal (TEM_{00} , para el cual $M^2 = 1$). Mientras más grande sea el valor de M^2 ($M^2 > 1$), mayor es la divergencia del haz. Por otro lado, si el haz es enfocado, el tamaño de la cintura de un haz real será más grande que el de un haz gaussiano ideal. Si se cuenta con un instrumento capaz de medir la M^2 dentro del arreglo experimental, es posible alinear los espejos o ajustar la apertura del haz para producir la calidad modal deseada, otras de las ventajas de medir la M^2 es determinar las aberraciones que el haz pudiera presentar después de ser transportado por distintos elementos ópticos (lentes), y medir el astigmatismo del haz. Es por este motivo que conociendo la M^2 del haz de cada uno de los láseres,

así como las características de la lente de microprocesado que usaremos en nuestros experimentos podemos estimar el tamaño del haz enfocado, y por lo tanto la fluencia en la región de enfoque, así también podemos estimar la distancia de Rayleigh [Roundy, 1999].

La metodología que se empleó para estimar el parámetro M^2 se describe en el trabajo desarrollado por [Maisterrena, 2006]. M^2 se obtiene a través de la expresión de propagación [Silfvast, 1999] siguiente y realizando mediciones de $w(z)$ en varias posiciones a lo largo del eje de propagación del haz:

$$w(z) = w_0 \left[1 + \left(\frac{M^2 \lambda (z - z_0)}{\pi w_0^2} \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (22)$$

donde w es el radio del haz medido en la posición z , w_0 es el radio medido en la cintura del haz, es decir $w(z_0)=w_0$, λ es la longitud de onda del haz que se propaga, z es la posición medida a lo largo del eje de propagación, z_0 es la posición de la cintura del haz medida lo largo del eje de propagación.

En la figura 9 se muestra el arreglo experimental que se emplea para la obtención de una imagen del perfil transversal del haz enfocado por una lente convergente de distancia focal f , formando imágenes en distintas posiciones a lo largo del eje de propagación.

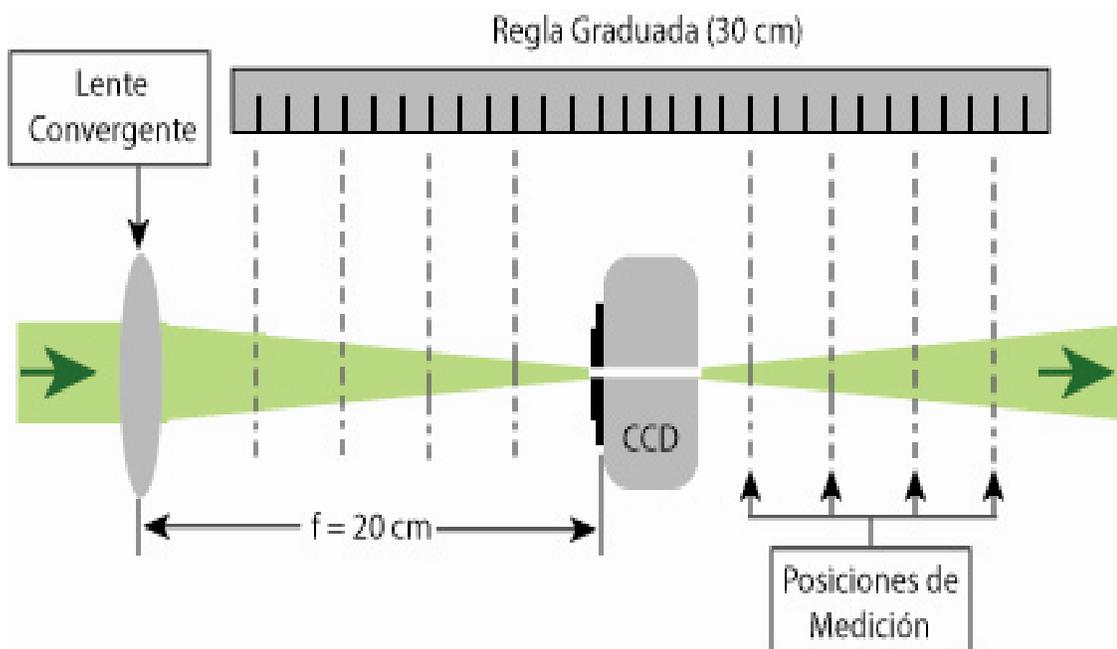


Figura 9. Arreglo experimental construido para determinar la M^2 , con este arreglo obtenemos el perfil transversal de intensidad del haz, medido en varias posiciones a lo largo de su eje de propagación. El haz es enfocado con una lente de $f = 20 \text{ cm}$.

Debido a que los haces de ambos láseres (Nd:YAG y Ti:Zafiro) presentan una sección transversal elíptica fue necesario medir el perfil de intensidad del haz tanto para el eje mayor como para el eje menor. Sin embargo debido a que la diferencia entre las dimensiones de los ejes elípticos no es significativamente grande se consideró pertinente aproximarla a una sección circular; la explicación detallada del procedimiento que se llevó a cabo está explicada a detalle dentro del trabajo desarrollado por: [Maisterrena, 2006].

Una vez que se tienen mediciones experimentales de $w(z)$, el radio del haz a $1/e^2$ del máximo, se realiza un ajuste de la expresión 22 con M^2 como parámetro libre.

Es importante destacar aquí que el perfil de intensidad se midió a e^{-2} del valor máximo. Esto debido a que la expresión 22 está escrita en términos del radio del campo eléctrico (w_E) medido a un valor $1/e$ del máximo central. La relación entre ambos radios se muestra a continuación:

$$E = E_0 e^{-\frac{r^2}{w_E^2}}, \quad (23)$$

y teniendo que:

$$I = |E|^2 = |E_0|^2 e^{-\frac{2r^2}{w_E^2}}. \quad (24)$$

Evaluando las ecuaciones 23 y 24 en $r = w_E$ obtenemos que el radio del perfil del campo medido a $1/e$ de su máximo es igual al radio del perfil de intensidad medido a $1/e^2$ de su radio:

$$I = I_0 (1/e^2). \quad (25)$$

Del ajuste de la expresión 22 a los radios $w(z)$ obtenidos experimentalmente se obtiene que: $M^2 = 3.66$ para el láser de nanosegundos y $M^2 = 1.5$ para el láser de femtosegundos.

III.3.1. Análisis del tamaño del haz enfocado

Como se mencionó anteriormente es necesario conocer las dimensiones del haz enfocado para conocer el valor de la fluencia que se le administra a la muestra irradiada.

Dentro de nuestro trabajo se usaron dos métodos distintos para determinar las dimensiones del haz. Uno de los métodos como se anticipó en la sección anterior fue basado en la teoría de propagación de un haz gaussiano enfocado por una lente convergente, en dicho método se utilizó el valor de M^2 obtenido en la sección III.3. El otro método fue directamente experimental y se obtuvo una medida directa del haz enfocado sobre la superficie de la muestra. Una descripción de este segundo método se presenta en la sección III.4.2.

III.3.1.1. Tamaño de la cintura del haz calculado por propagación de haces

Gaussianos

En la obtención del haz enfocado empleando el *método de la propagación de haces gaussianos* es necesario considerar lo siguiente: conociendo M^2 y el tamaño del haz incidente sobre una lente dada, en nuestro caso la lente de microprocesado, se puede calcular el tamaño de la cintura del haz enfocado por esta lente y también su distancia de Rayleigh [Roundy C., 1999]. Las ecuaciones que usaremos para el cálculo del diámetro de la cintura del haz y la distancia de Rayleigh del haz enfocado son [Silfvast W.T., 1999]:

$$D_c = \frac{4}{\pi} M^2 \left(\frac{f}{D_h} \right) \lambda = \frac{4}{\pi} M^2 f_{\#} \lambda, \quad (26)$$

$$Z_R = \frac{\pi}{4} \frac{D_c^2}{M^2 \lambda} = \frac{4}{\pi} M^2 f_{\#} \lambda = D_c f_{\#}, \quad (27)$$

donde D_c es el diámetro de la cintura del haz, Z_R es la distancia de Rayleigh, f es la distancia focal de la lente de microprocesado, D_h es el diámetro del haz que incide en la lente de microprocesado, λ es la longitud de onda de la luz láser, $f_{\#}$ es conocido como f número.

El $f_{\#}$ está definido como el diámetro de la pupila de entrada en términos de la distancia focal efectiva de la lente [Hecht E., 2000].

$$f_{\#} = \frac{f}{D_h}, \quad (28)$$

El diámetro del haz que incide sobre la lente es de: *4.7 mm para el láser de nanosegundos ($FWe^{-2}M$), 7 mm para el láser de femtosegundos ($FWe^{-2}M$).*

La abertura libre de la lente al ser colocada sobre su montura de soporte es de 6mm, por lo que dicha abertura es llenada al 78.3 % cuando se hace incidir el diámetro del láser de nanosegundos y al 100% cuando se hace incidir el diámetro del láser de femtosegundos.

Los valores de $f_{\#}$ para la misma lente ($f = 6\text{mm}$, medido experimentalmente) en el caso de cada haz son distintos. El valor de $f_{\#}$ para el arreglo óptico usando cada uno de los láseres es: $f_{\#} = 1.3$ para el arreglo con el láser de nanosegundos, $f_{\#} = 0.85$ para el arreglo con el láser de femtosegundos.

En la tabla II se presentan las dimensiones del haz enfocado estimadas teóricamente para los dos láseres (nanosegundos, y femtosegundos). Se trabajó con una lente de marca Thorlabs (especificaciones en Apéndice A), las especificaciones teóricas marcan que la distancia de trabajo es de 8mm, sin embargo al medirla prácticamente se observa que la distancia focal es de 6mm, es por esta razón que consideramos 6mm como su distancia de trabajo ó distancia focal.

Tabla II. Dimensiones estimadas para ambos haces láser enfocados con la lente de 6mm de distancia focal.

Datos obtenidos empleando la misma lente de microprocesado $f = 6\text{mm}$						
Tipo de Láser	Lente de microprocesado		Eje analizado	M^2	D_c (μm)	Z_R (μm)
	D_h (mm)	$f_{\#}$				
Nd:YAG	4.7	1.3	menor	2.7	2.4	3.1
			mayor	3.6	3.2	4.2
			TEM 00	1	0.4	0.6
Ti:Zafiro	7	0.85	menor	1.2	1.1	0.8
			mayor	1.5	1.2	1.1
			TEM 00	1	0.8	0.78

III.3.1.2. Tamaño de la cintura del haz medida experimentalmente

La metodología empleada para medir el tamaño del haz enfocado experimentalmente requirió del sistema PEB (descrito en la sección III.4.2.), con la ayuda de este sistema es posible capturar una imagen ampliada de la cintura del haz enfocado en la superficie de una muestra plana. La captura de la imagen de la cintura del haz se realiza mediante una cámara CCD, de esta manera conociendo con certeza el tamaño de pixeles de la cámara es posible procesar la imagen del haz enfocado y medir de forma directa su tamaño. La imagen proporciona información acerca del perfil de distribución de intensidad del haz enfocado, el ancho de la distribución de intensidad en la imagen está dada en unidades de pixeles, de tal manera que es necesario conocer el tamaño de los pixeles del CCD y el factor de magnificación en la imagen para determinar el tamaño real del haz enfocado sobre la superficie de la muestra.

La siguiente tabla muestra las dimensiones del haz enfocado obtenidas experimentalmente para ambos láseres cuando son enfocadas por nuestra lente de microprocesado ($f = 6\text{mm}$).

Tabla III. Dimensiones de haz enfocado obtenidas experimentalmente.

Datos obtenidos empleando la misma lente de microprocesado $f = 6\text{mm}$			
Tipo de Láser	Eje analizado	D_c (μm)	Z_R (μm)
Nd:YAG	menor	4.6	6
	mayor	5	6.5
Ti:Zafiro	menor	3.6	3.1
	mayor	4	3.4

Existe cierta discrepancia entre las dimensiones del haz medidas experimentalmente que se muestran en la tabla III, y aquellas obtenidas teóricamente. Esta discrepancia puede tener origen en la manera en que se opera el sistema PEB, el cual requiere de una muestra con superficie ópticamente plana para brindarnos una imagen libre de distorsiones. En nuestro caso la superficie de la córnea presenta cierta rugosidad y modulación que bien podría dar lugar a una imagen un poco más grande que aquella que se obtendría del mismo haz reflejado en una superficie ópticamente plana. Para los resultados mostrados en nuestro trabajo empleamos las dimensiones del haz medidas experimentalmente, y debido a las fluctuaciones que presenta el sistema láser el tamaño de la cintura del haz se midió periódicamente al realizar sesiones experimentales.

III.4. Estación de microprocesado

III.4.1. Descripción de la estación de microprocesado

La figura 10, muestra la estación de trabajo, la cual es una estación de microprocesado láser de materiales que cuenta con la versatilidad de poder acoplar cualquiera de los dos láseres mencionados en la sección III.2. La estación de microprocesado esta diseñada para llevar a cabo la irradiación del material a estudiar.

El haz láser pasa a través de una placa de $\lambda/2$ y un polarizador lineal (GLAN-AIR), los cuales son empleados para variar la energía por pulso suministrada al blanco, posteriormente es transportado a través de espejos hasta la lente de microprocesado, dichos espejos cuentan con un recubrimiento de plata protegida que proporciona una reflectividad para la longitud de onda empleada (532 nm y 800 nm) del 99%, consecutivamente el haz pasa a través de un divisor de haz (92-8), el cual nos permite monitorear la energía para cada pulso suministrado al blanco, en este proceso el haz reflejado se hace incidir sobre un fotodiodo (ver apéndice A), debidamente calibrado (ver sección III.4.3). La señal del fotodiodo es capturada con la ayuda de un osciloscopio (Ver apéndice A) con ancho de banda de 500 MHz y muestreo de Gs/seg. El haz transmitido a través del divisor del haz (con el 92% de la energía incidente) es enfocado empleando una lente que denominamos de microprocesado ($f = 6\text{mm}$, $NA = 0.5$).

Adicionalmente al arreglo óptico nuestra estación de microprocesado también cuenta con dos mesas de traslación (X,Y), las cuales tienen la capacidad

de poder ser controladas por computadora con una resolución en movimiento de hasta $0.1\mu\text{m}$, además se cuenta con una mesa de translación en el eje Z, el movimiento en este eje es controlado manualmente con un micrómetro cuya resolución es de $5\mu\text{m}$.

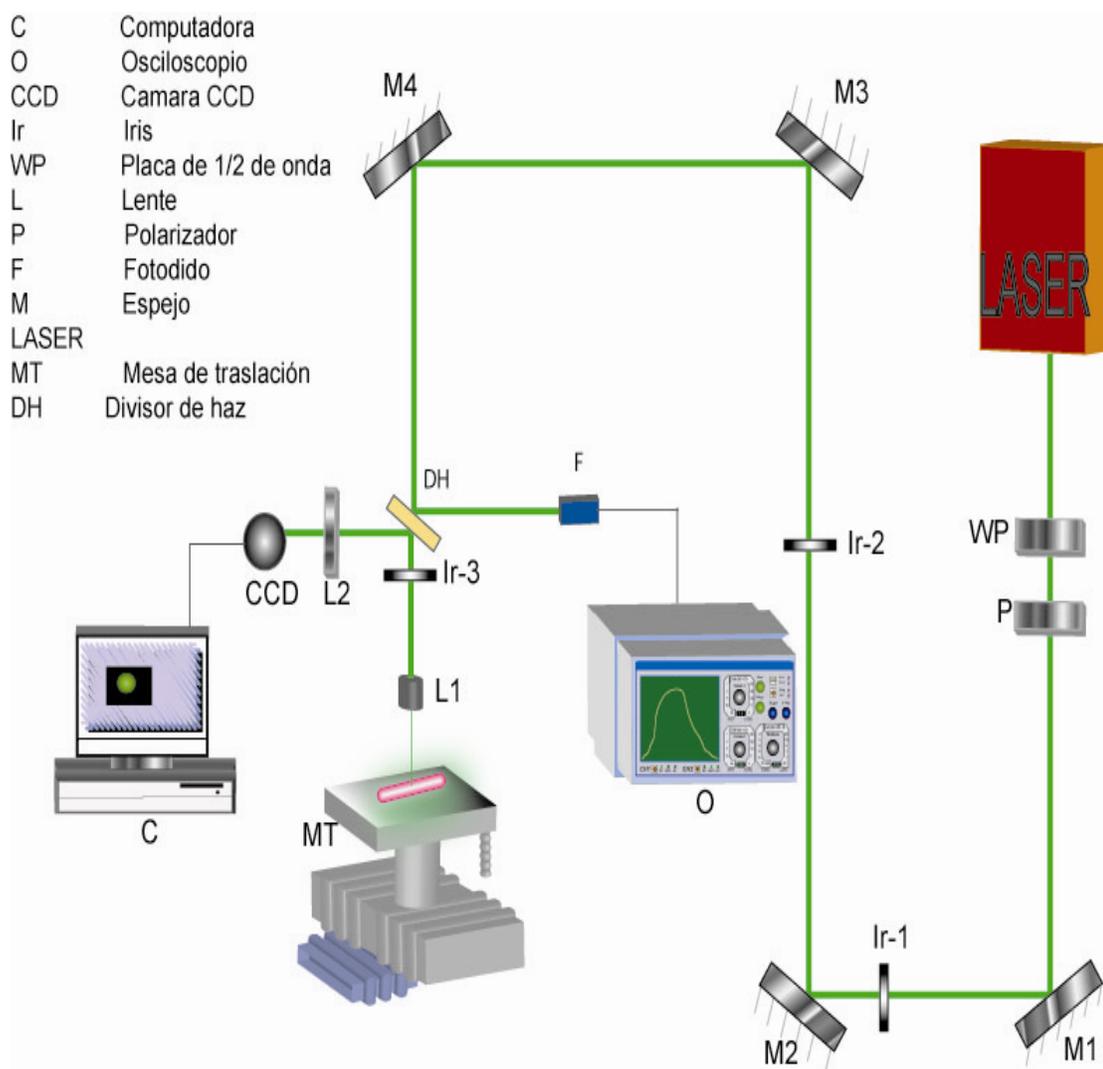


Figura 10. Estación de trabajo para el microprocesado láser de materiales.

III.4.2. Sistema de monitoreo (PEB)

Un punto importante en el procedimiento experimental es la localización de la cintura del haz sobre la superficie del tejido y la medición del tamaño real de la cintura del haz, ambas tareas se realizan empleando un sistema óptico que denominamos *Plano Equivalente del Blanco (PEB)*, el cual nos permite obtener la imagen magnificada de la cintura del haz reflejada en la superficie de la muestra. El PEB tiene tres funciones fundamentales en nuestro arreglo óptico, las cuales son:

- 1) Localizar la cintura del haz sobre la superficie del material a irradiar.
- 2) Determinar el tamaño real de la cintura del haz, con la finalidad de calcular posteriormente el área de la sección transversal en la cintura del haz.
- 3) Localizar la posición de la cintura del haz a la profundidad en la muestra donde se desee formar ya sea una burbuja o bien un canal.

El PEB consiste en el arreglo óptico mostrado en la figura 11, el haz enfocado por la lente f_1 incide sobre la superficie de la muestra (ópticamente plana en el caso ideal), si se cumple que la incidencia es normal a la superficie de la muestra la luz será reflejada en sentido opuesto a la incidente. Si además, la cintura del haz está localizada exactamente sobre la superficie de la muestra el haz reflejado se contrapropaga exactamente retrazando el camino óptico del haz incidente (como se muestra en la figura 12 b)). En caso de que la cintura del haz no se encuentre localizada exactamente sobre la superficie de la muestra, es decir

ésta se encuentra desplazada del orden de una o más distancias de Rayleigh (resolución del sistema), el frente de onda que incide sobre la superficie (plana) es un frente de onda curvo, y por lo tanto la reflexión en la superficie de la muestra ocasionará que el haz retroreflejado diverja o converja, produciendo una imagen distorsionada de la cintura del haz en el plano donde se ubica la cámara CCD.

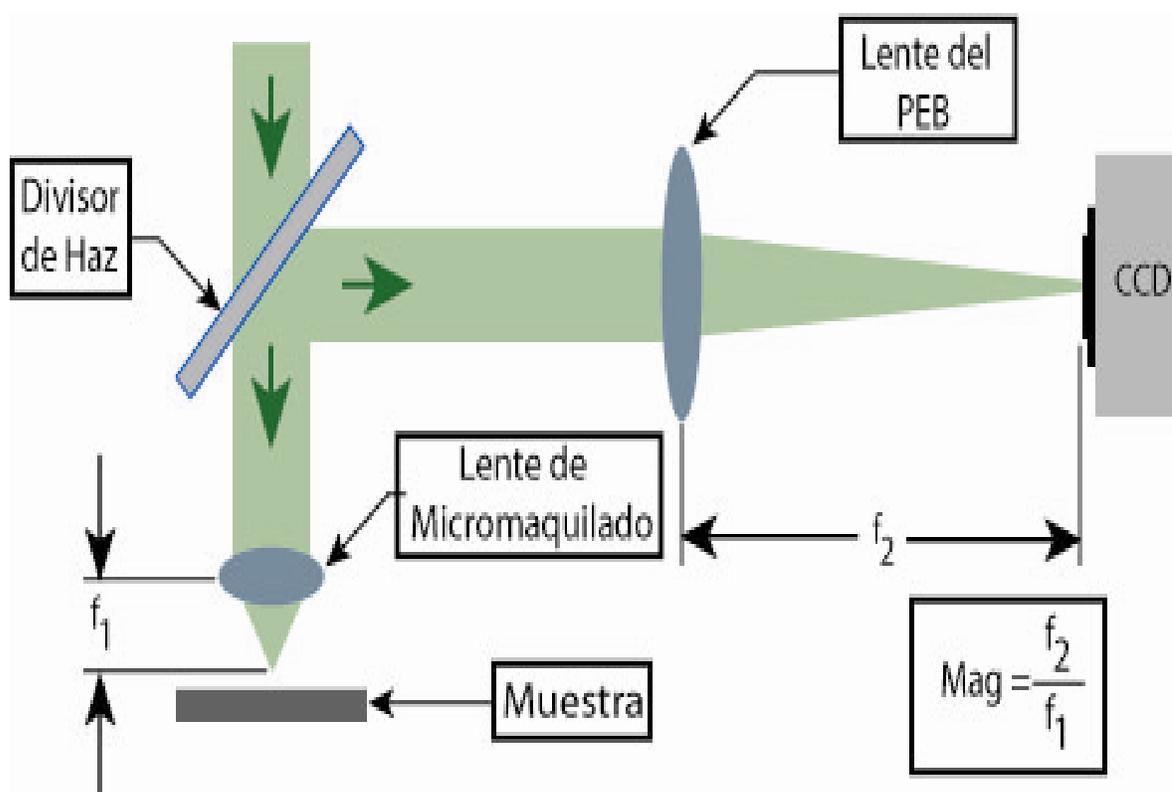


Figura 11. Diagrama del sistema de monitoreo PEB (Plano Equivalente de Blanco)

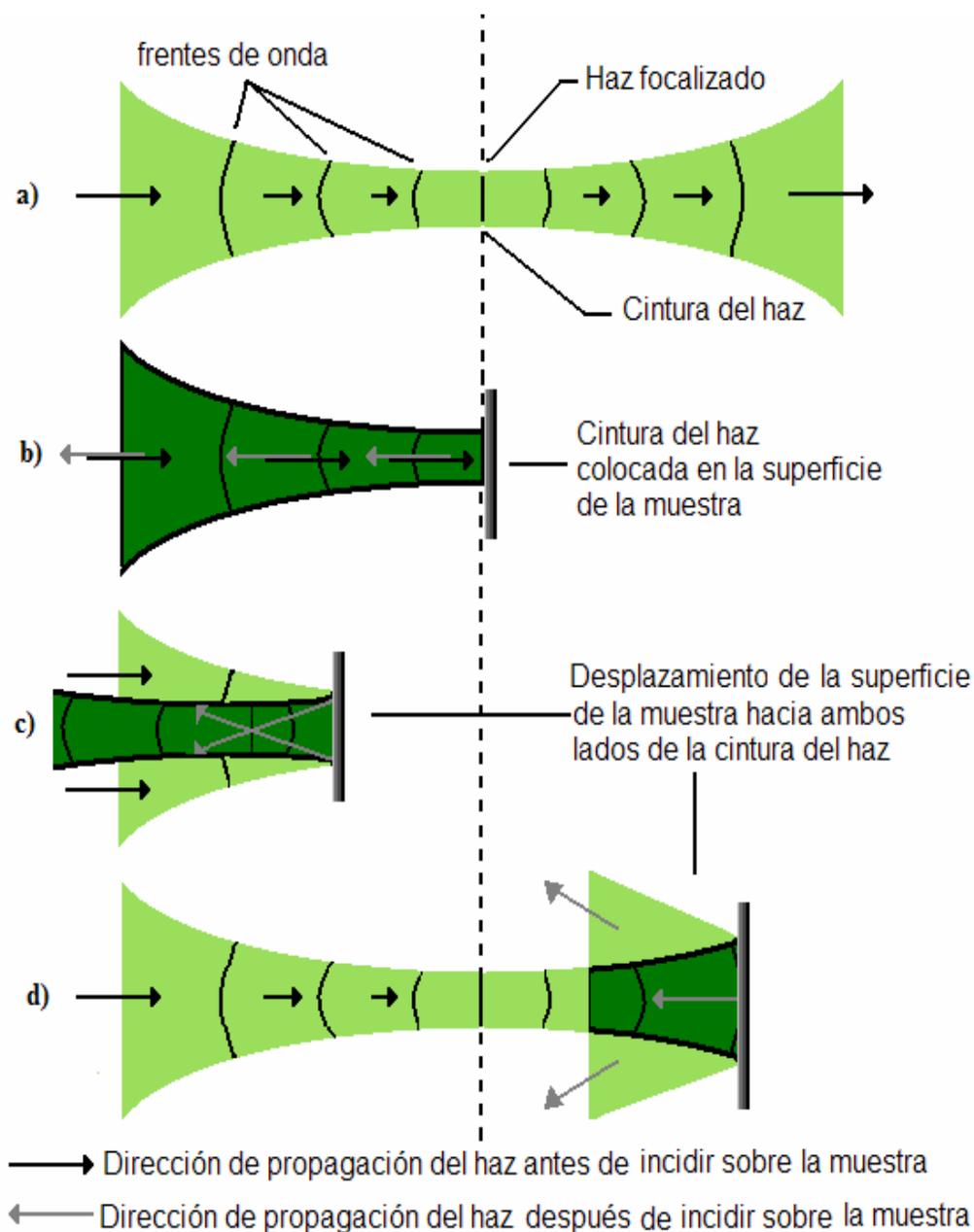


Figura 12. Propagación de un haz enfocado a incidencia normal sobre la superficie de una muestra colocada en distintas posiciones con respecto a la cintura del haz

En la puesta a punto del PEB es importante considerar como primer punto la configuración correcta de la lente de micromaquinado y la muestra a irradiar,

para este propósito se procede a realizar convenientemente el desplazamiento de la muestra a lo largo del eje de propagación del haz, hasta el punto en que el haz reflejado se contrapropague exactamente en dirección contraria a la de incidencia, al llegar a este punto sabemos que la cintura del haz está colocada justo en la superficie de la muestra (figura 12 b). Para que el procedimiento funcione es importante asegurarnos que el haz incidente esté colimado. Como siguiente paso se coloca la lente del PEB, sin importar su distancia con respecto a la lente de micromaquinado, puesto que el haz está colimado, finalmente colocamos la cámara CCD a la distancia focal de la lente f_2 con el propósito de capturar la imagen magnificada de la cintura del haz. Por último se realizan algunos movimientos muy finos en la posición del CCD con el objetivo de encontrar la imagen del haz con el mínimo tamaño posible. Cabe mencionar que todo el proceso de ubicar la cintura sobre la superficie de la muestra se realiza con la mínima fluencia posible, esto para evitar dañar por ablación la superficie de la muestra.

La imagen magnificada de la cintura del haz obtenida de la superficie de la muestra y capturada por el CCD nos permite obtener el tamaño real de la cintura del haz; esto nos brinda la ventaja de poder realizar el cálculo directo del área real del haz para cada sesión experimental y así no depender de una estimación teórica. El tamaño del haz sobre la muestra se determina conociendo el factor de magnificación (Mag), el cual está dado por:

$$Mag = \frac{f_2}{f_1}, \quad (29)$$

donde f_1 es la distancia focal de microprocesado, f_2 es la lente empleada en el PEB.

Una imagen típica de la cintura del haz en la CCD es la que se muestra en la figura 13. Si tomamos un perfil de la imagen a lo largo del diámetro, éste se aproxima a un perfil gaussiano, si aumentamos superficialmente el valor de la fluencia observamos que la imagen de la cintura del haz se distorsiona debido a que se genera daño por ablación en la superficie de la muestra.

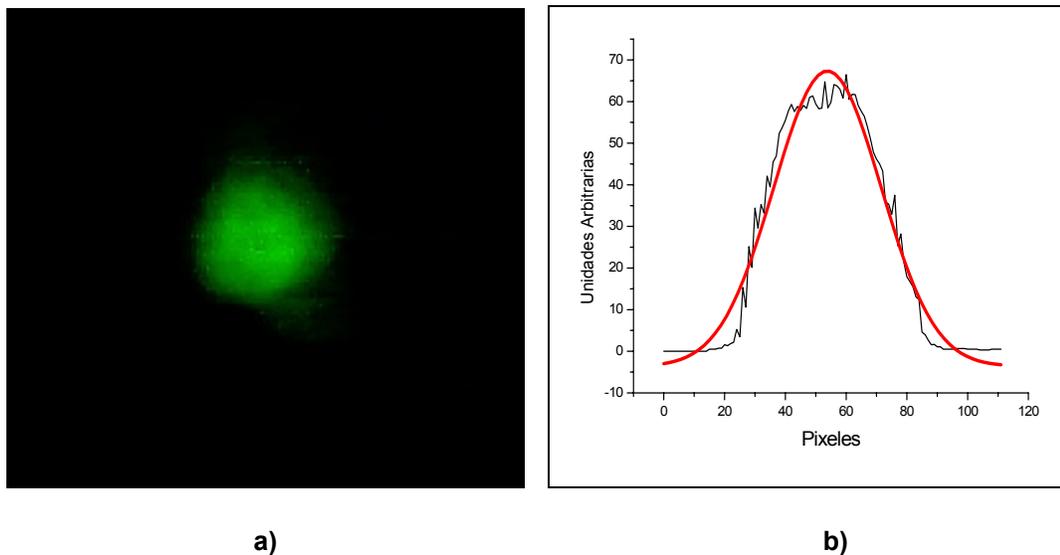


Figura 13. a) Imagen magnificada de la cintura del haz (capturada para el láser de nanosegundos); b) perfil de la imagen de la cintura del haz.

III.4.3. Calibración del monitor de energía (fotodiodo)

Uno de los accesorios indispensables que se deben de incluir en el arreglo experimental, es un monitor de energía que permita medir la energía suministrada a la muestra por cada pulso, esta tarea se lleva a cabo utilizando un fotodiodo debidamente calibrado. La figura 14, muestra el arreglo y procedimiento que se usa para llevar a cabo la calibración del fotodiodo.

Como se mencionó anteriormente en la sección III.4.1. El arreglo experimental o estación de microprocesado incluye un divisor de haz en el cual incide el haz antes de llegar a la lente de microprocesado. La porción de haz reflejada en el divisor de haz es dirigido a un fotodiodo (ver apéndice A), mientras que la porción del haz transmitida incide sobre la lente de microprocesado y enseguida sobre la muestra de tejido. El método de calibración consiste en lo siguiente: usando un medidor de energía (ver apéndice A) en el haz transmitido a través del divisor de haz y el fotodiodo en el haz reflejado se grafican los valores de energía y voltaje (pico a pico) para distintas energías por pulso (curva mostrada en la figura 15), las cuales son seleccionadas por medio del atenuador variable ubicado a la salida del láser.

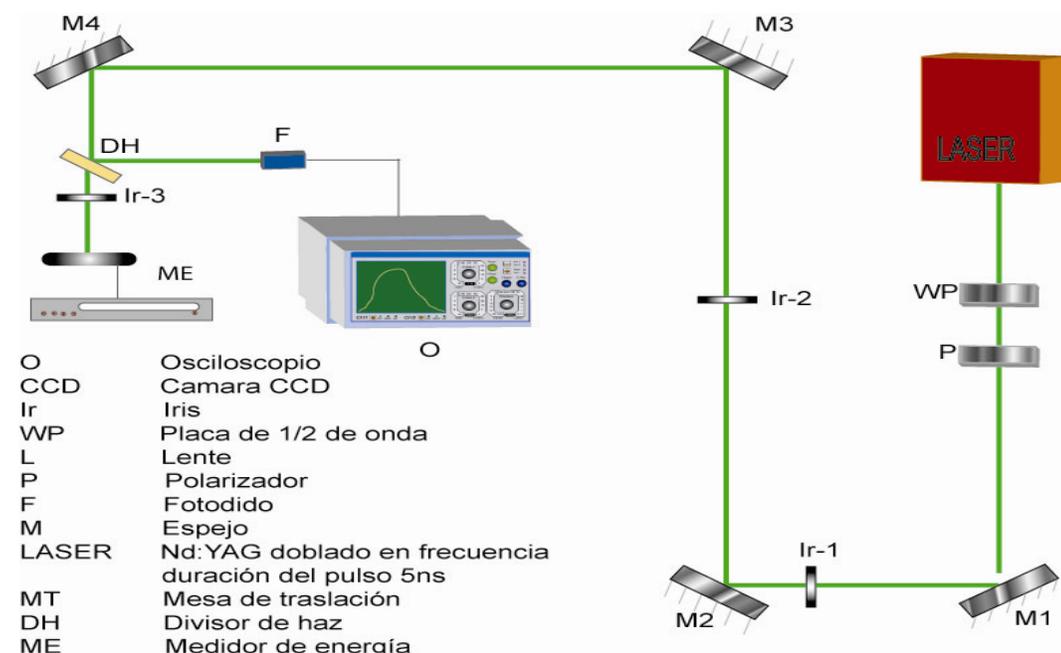


Figura 14. Arreglo necesario para realizar calibración de fotodiodo.

Este procedimiento de calibración nos permite además identificar el rango de respuesta lineal del fotodiodo.

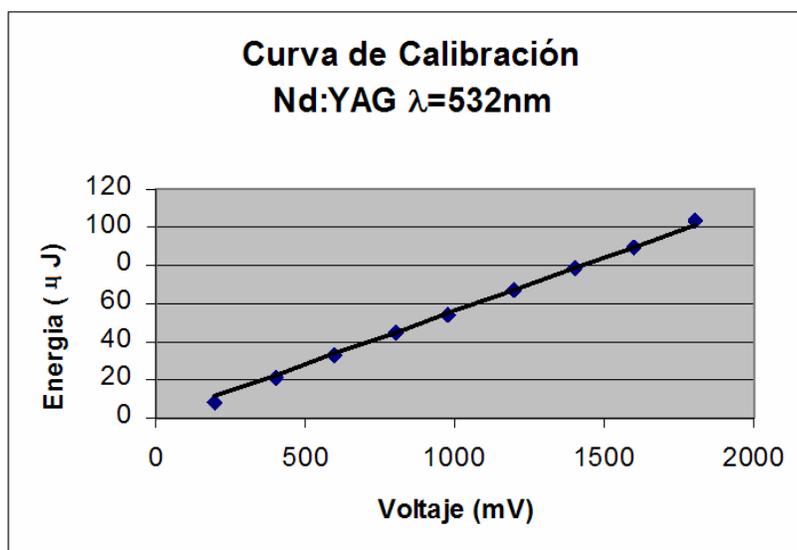


Figura 15. Curva de calibración.

III.5. Obtención, manejo y conservación de tejido corneal

Un proceso importante en la realización de estudios experimentales en el área de procesamiento láser de tejido biológico, es el aprendizaje adecuado de obtención, conservación y manipulación del tejido. En nuestro caso usaremos tejido corneal porcino.

El método para la adecuada extracción de la córnea del ojo porcino fue puesto en práctica bajo la asesoría de los oftalmólogos de la Clínica de Ojos de Tijuana. La participación de los oftalmólogos que integran la Clínica de Ojos de Tijuana en éste proyecto nos brinda, además de su ayuda en la interpretación y aplicación de los resultados de nuestra investigación, asesorías para el manejo y conservación adecuada del tejido corneal.

De gran relevancia para el desarrollo del proyecto fue la relación establecida con el rastro municipal de Ensenada, ya que gracias a ésta vinculación es posible la adquisición de los ojos porcinos.

III.5.1. Material necesario para la disección del globo ocular porcino

Para lograr la extracción adecuada del tejido corneal, es necesario contar con instrumentos especializados, ya que de lo contrario podríamos llegar a rasgar o maltratar el tejido.

Previamente a la adquisición del ojo es importante tener listo el material de manipulación, extracción y almacenamiento del tejido, la lista del material necesario para llevar a cabo la tarea de disección está compuesta por:

- Guantes
- Gasas
- Agua destilada
- Solución salina
- Recipiente esterilizado
- Jeringas (mediana y de insulina)
- Pinzas
- Bisturí
- Tijeras para cortar el tejido del ojo
- Alcohol
- Porta objetos
- Bolsas para desechos biológicos
- Recipiente con medio de preservación (solución salina) para tejido corneal

Un punto importante para realizar exitosamente el proceso de separación de la córnea es el manejo cuidadoso y sistemático del globo ocular durante todo el proceso de disección.

El primer paso que se debe de realizar es impregnar una gasa con agua destilada o solución salina; las gasas previamente húmedas sirven para cubrir la zona del ojo llamada esclera (parte blanca que recubre el globo ocular), dejando al descubierto solo la superficie donde está localizada la córnea; una vez realizada esta tarea se coloca el globo ocular dentro de un recipiente esterilizado, donde se debe de tener el cuidado pertinente para que la zona donde se localiza la córnea no este en contacto con ninguna superficie del recipiente que podría dañar el tejido corneal; un vez que se colocó adecuadamente el ojo se aplican sobre la córnea varias gotas de solución salina, esto nos ayuda a mantener sin variaciones significativas las propiedades celulares de la córnea, ya que la córnea cuenta con la característica de que al poco tiempo de no estar humectada comienza a presentar un cambio en su transparencia adquiriendo un aspecto blanco inhomogeneo como resultado de la deshidratación.

Una vez colocada y humectada la córnea adecuadamente se almacena en refrigeración, es importante tener en cuenta el tiempo de almacenaje, pues es conveniente que pase poco tiempo entre la obtención del tejido y los experimentos de irradiación láser. Lo ideal es emplear el tejido máximo 5 horas después de adquirir el ojo, y aunque la córnea puede durar hasta 24 horas en refrigeración, en este caso, presenta el aspecto blanco (esparcimiento de la luz en el tejido) desfavorable para nuestros experimentos.

Es importante tener previamente listo el material que es indispensable para la extracción de la córnea, este material incluye pinzas, empleadas para prevenir

movimientos involuntarios al momento de la extracción del tejido; bisturí para el corte del tejido.

En la siguiente sección se proporciona una descripción más detallada del procedimiento llevado a cabo para la extracción del tejido corneal.

La figura 16, muestra el material necesario para realizar la disección del globo ocular y la extracción de la córnea porcina.



Figura 16. Material necesario para la extracción del tejido corneal porcino.

III.5.2. Metodología de extracción de tejido corneal

Es necesario sacar el globo ocular del recipiente donde estaba contenido, manipulando con sumo cuidado y procurando no tener contacto con la zona donde se encuentra la córnea (ver figura 17), esto con la finalidad de prevenir algún daño al tejido corneal que se usará como muestra. Posteriormente se identifica el nervio óptico localizado en la parte trasera del globo ocular, es necesario ubicar el nervio óptico debido a que a través de éste elemento se inyecta agua destilada

dentro del globo ocular, para que este adquiriera cierta rigidez y de esta manera sea más fácil su manipulación durante la disección; la figura 18 muestra la manera en que se administra el líquido dentro del globo ocular.



Figura 17. Fotografía del globo ocular.

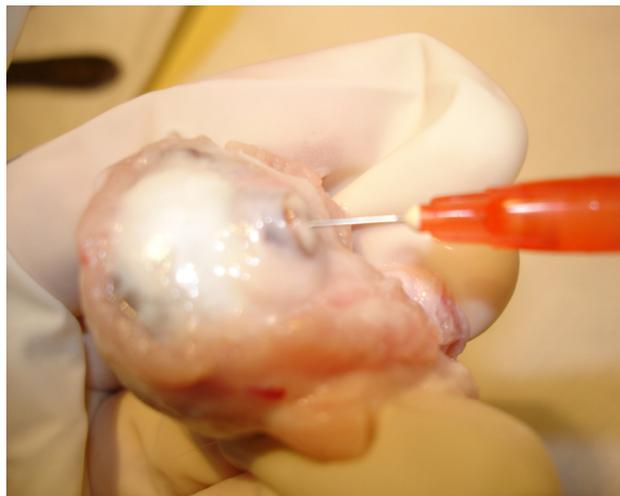


Figura 18. Administración de agua destilada al globo ocular por medio del nervio óptico.

Cuando el globo ocular ha adquirido suficiente rigidez, es colocado sobre una gasa para su disección procurando siempre la misma precaución en su manejo. Al llegar a este punto se prosigue con la realización de los cortes necesarios para desprender la córnea del globo ocular. Un punto muy importante en esta etapa del proceso es la pertinencia de realizar el corte en la esclera, es decir siguiendo el contorno de la córnea pero en la zona de la esclera, esto con la finalidad de que al momento de tomar el tejido con pinzas no se dañe la córnea.

Al iniciar la manipulación sobre el globo ocular, se busca iniciar el corte en la esclera aproximadamente 3mm debajo de la córnea, ayudando el proceso con pinzas como se ilustra en la figura 19.

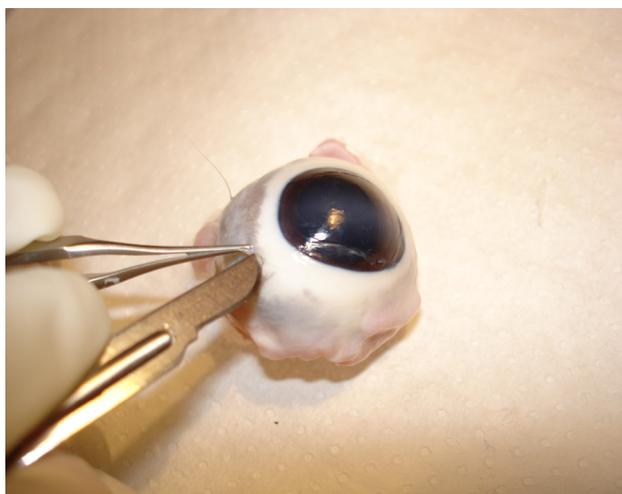


Figura 19. Corte inicial para la extracción de la córnea.

Es indispensable tener extremo cuidado al realizar éste corte, ya que se debe cuidar no introducir con mucha profundidad el bisturí, para evitar perforar el

globo ocular lo cual impediría una extracción exitosa de la córnea, los cortes deben ser muy delicados y pequeños, para que el tejido escleral se vaya desprendiendo paulatinamente, como se muestra en la figura 20.



Figura 20. Primer corte realizado sobre la esclera.

Una vez que se tiene el primer corte, se procura introducir el bisturí para empezar a desprender la córnea, este paso también se debe de realizar con extremo cuidado, ya que si se introduce demasiado el bisturí, se podrían dañar las células endoteliales que se encuentran en la capa posterior de la córnea ó si se introduce el bisturí con mucha profundidad se corre el riesgo de perforar el iris. Un indicador de que el proceso está siendo realizado adecuadamente, es poder observar la punta del bisturí por debajo de la córnea como se muestra en la figura 21, de esta manera tendremos la seguridad de obtener la córnea intacta conservando las cinco capas del tejido que la componen.

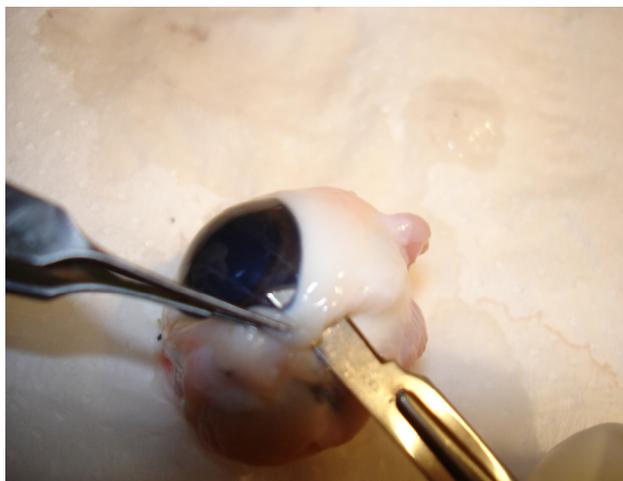


Figura 21. Desprendimiento de tejido corneal.

El proceso de desprendimiento de la córnea se termina de realizar con la ayuda de tijeras especiales para corte de tejido biológico y de manera simultánea se emplean pinzas para proporcionar ayuda en este paso de la extracción, la figura 22 muestra esta etapa del desprendimiento corneal. Finalmente obtenemos la córnea completamente desprendida del globo ocular, como se muestra en la figura 23.



Figura 22. Inicio de corte con tijeras.



Figura 23. Desprendimiento final de la córnea.

Si una vez que se tiene la córnea desprendida del globo ocular se desea conservarla en una sustancia de preservación, es indispensable la adecuada colocación de la córnea en el recipiente que contiene el medio de preservación; es necesario colocar la córnea evitando el contacto directo de la capa del epitelio con las paredes del recipiente, como se observa en la figura 24.

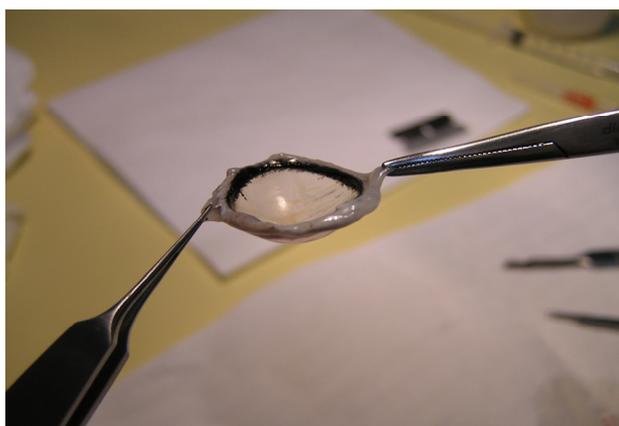


Figura 24. Forma adecuada de colocar la córnea sobre recipiente.

Para nuestros experimentos de irradiación láser del tejido es necesario cortar la córnea en tiras pequeñas, y colocarlas en porta objetos para facilitar su manipulación, la figura 25 muestra una tira de córnea fotografiada a través de un microscopio óptico.

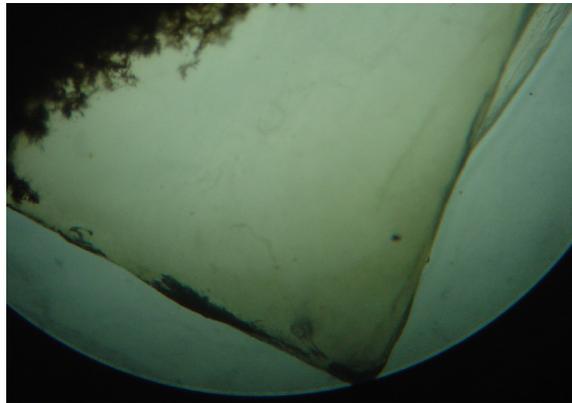


Figura 25. Tira de córnea observada con un microscopio óptico.

III.6. Procedimiento Experimental

III.6.1. Selección de profundidades de irradiación en la córnea

En general los procedimientos quirúrgicos de correcciones refractivas de visión se llevan a cabo dentro del tejido corneal y no sobre la superficie, la capa donde tienen lugar las correcciones de visión es conocida como estroma, ésta es la capa más gruesa de entre las distintas capas que constituyen la córnea (aproximadamente el 90% del grosor total de la córnea); además cuenta con una alta resistencia mecánica y por lo tanto la probabilidad de producir fisuras en el tejido es pequeña. Esta capa de la córnea tiene características idóneas para ser

irradiada, debido a sus cualidades celulares, las cuales son capaces de proporcionar restauración del tejido estromal al verse invadido por la presencia de un fenómeno como lo es la irradiación láser. Dentro de ésta capa se realizan la mayoría de las operaciones de corrección refractiva del ojo como lo son el LASIK y la inserción de anillos intraestromales. Nuestro trabajo contempla la posibilidad de innovación en aplicaciones láser en la oftalmología, específicamente en el área de inserción de anillos intraestromales, proponemos el uso de láseres pulsados como herramienta para perforación de canales intraestromales. Este objetivo nos llevó al diseño de experimentos donde debemos enfocar un haz láser pulsado a una profundidad predeterminada dentro del estroma de una córnea porcina.

Las profundidades a las cuales se llevó a cabo irradiación fueron de 100 μ m y 400 μ m por debajo de la superficie de la córnea; la razón por la cual se seleccionaron estas dos profundidades obedece al hecho de que se buscó estudiar el comportamiento físico del tejido en dos subcapas distintas del estroma y de esta manera poder observar si el comportamiento que se presenta a lo largo de toda la capa estromal es el mismo o si existe alguna variante según la profundidad en la cual se realice la irradiación.

El estroma a su vez se subdivide en dos capas llamadas estroma posterior (capa más cercana a la superficie) y estroma anterior (capa más profunda); en la sección II.5 se hace una descripción a detalle de la capa estromal. Al irradiar a 100 μ m de profundidad estamos explorando los efectos producidos en el estroma posterior, de igual manera al irradiar el tejido a 400 μ m estudiamos los efectos físicos producidos en el estroma anterior.

III.6.2. Metodología para la generación de burbujas en tejido corneal

Al llevar a cabo la irradiación láser en el tejido corneal a las dos distintas profundidades mencionadas (100 μ m y 400 μ m), con la finalidad de observar el efecto físico producido en el tejido por un pulso láser de nanosegundos, se observó en ambos casos la formación de una cavitación la cual debido a sus características [Juhasz T., *et. al.*, 2002] identificamos como una burbuja.

Nuestros experimentos de irradiación del tejido se llevan a cabo de la siguiente manera: con la ayuda del sistema óptico PEB, y manteniendo una fluencia baja, se ubica la cintura del haz sobre la superficie de la muestra de córnea; posteriormente se introduce la cintura del haz enfocado en la muestra, esto se realiza desplazando la muestra del tejido la dirección contraria a la del haz este desplazamiento se hace con la ayuda de un micrómetro, hasta colocar la cintura del haz a la profundidad a la cual se desee llevar a cabo la irradiación, ya sea a 100 μ m ó 400 μ m por debajo de la superficie de la córnea, como se muestra en la figura 26. Una vez que se tiene la cintura del haz a la profundidad deseada en el tejido corneal se obstruye el paso del haz láser hacia la muestra, esto con la finalidad de ajustar (sin dañar) la fluencia con la que se desea irradiar la muestra. Una vez ajustado el valor de fluencia deseada se permite nuevamente el paso del haz hacia el blanco realizando la irradiación con un solo pulso y observando el comportamiento del tejido al ser irradiado.

Se observó que al aplicar un solo pulso sobre el tejido a una profundidad de 400 μ m y con fluencia suficiente es posible la formación de una burbuja la cual

en un lapso de tiempo corto tiende a colapsarse, dicho fenómeno se presenta también en las irradiaciones realizadas a 100 μm de profundidad, sin embargo el tiempo que le toma al tejido colapsar la burbuja a esta profundidad es mayor que en el caso de burbujas realizadas 400 μm de profundidad. El tiempo de vida media de una burbuja depende del nivel de fluencia aplicada, siendo mayor el tiempo de vida cuanto mayor es la fluencia. El tiempo de vida de una burbuja es del orden de unos cuantos segundos hasta varios minutos.

Posteriormente siguiendo la metodología mencionada anteriormente para formación de burbuja con un solo pulso, se genera un barrido de pulsos (a la profundidad deseada: 100 μm ó 400 μm) en la muestra del tejido; el barrido se realiza a una velocidad constante (250 $\mu\text{m}/\text{seg}$), con una frecuencia de suministro de pulsos constante (3 Hertz para irradiaciones aplicadas a 100 μm de profundidad y 15 Hertz para la profundidad de 400 μm). La figura 27 muestra de manera esquemática la manera de generar dicho barrido en nuestras muestras de tejido.

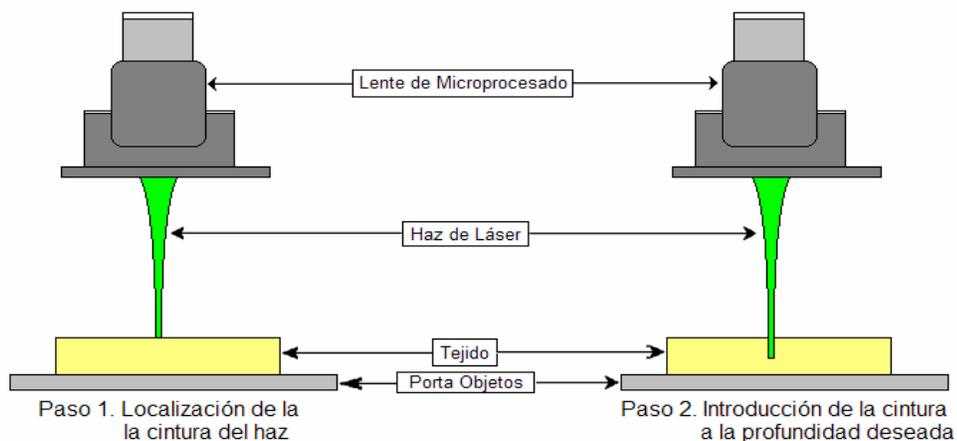


Figura 26. Colocación de cintura del haz a la profundidad deseada.

Cada pulso suministrado al tejido genera una burbuja. Al realizar un barrido continuo con una serie de pulsos láser y aplicando una fluencia constante en todo el trayecto del barrido, se observa la generación de burbujas con dimensiones muy similares. La proximidad física entre burbujas generadas por cada uno de los pulsos, da como resultado la formación de un canal en el tejido. Es importante mencionar que para que se genere un canal continuo a partir de la formación de burbujas individuales en el tejido, es necesario que las dimensiones de las burbujas sean tales que dos burbujas consecutivas prácticamente se toquen, pues de lo contrario solo se observa la formación de burbujas individuales separadas una de otra. La formación de canales continuos en el tejido depende directamente de la cantidad de fluencia aplicada al tejido, la frecuencia de suministro de los pulsos láser a la muestra y la velocidad del barrido sobre la muestra.

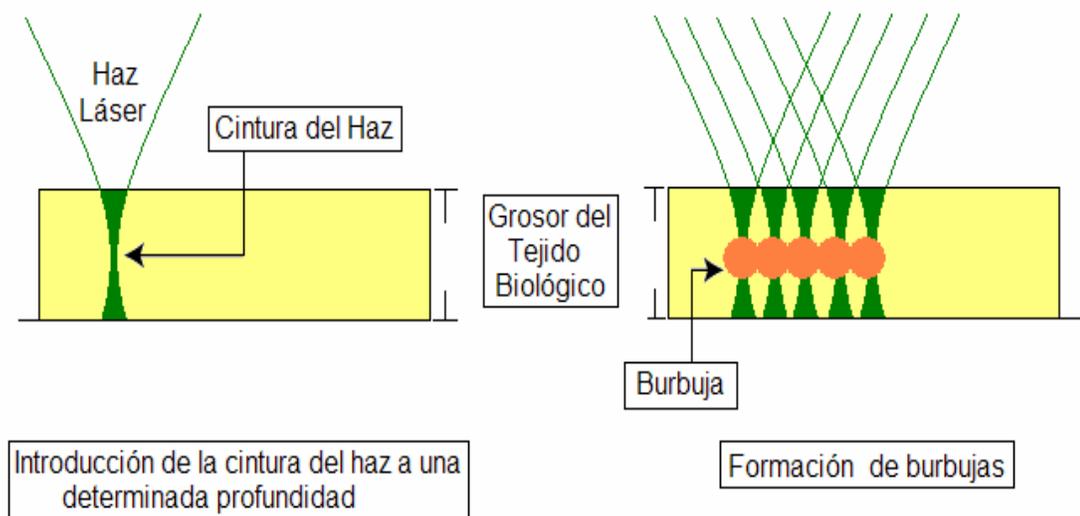


Figura 27. Barrido y formación de un canal a partir de la formación de burbujas en el tejido.

Es importante hacer notar que se pudieron identificar burbujas con tiempo de vida media relativamente corta, las cuales no duran más de unos cuantos segundos; sin embargo también fue posible generar burbujas que presentaban un tiempo de vida más largo, las cuales permanecían en el tejido varios minutos. Determinamos la fluencia umbral para la formación de burbujas con tiempo de vida media de minutos, a las cuales denominamos burbujas permanentes.

Para la parte experimental donde se empleó un láser de Nd:YAG (ns) y se procuró irradiar el tejido a 100 μm de profundidad, la frecuencia de suministro de pulsos láser fue de 3 Hertz; sin embargo para las irradiaciones aplicadas a 400 μm de profundidad, se aplicó una frecuencia de suministro de 15 Hertz. En la siguiente sección daremos una breve explicación de la razón para seleccionar dichas frecuencias.

Los experimentos realizados incluyen el determinar la fluencia umbral de formación de burbujas a las profundidades predeterminadas (100 y 400 μm) en la córnea. Definimos como fluencia umbral de formación de burbujas (F_u) la cantidad de fluencia mínima necesaria para la cual se observa la formación de una burbuja en el tejido.

El método que se empleó para verificar en qué punto se generaba una burbuja sobre el tejido estuvo basado en observar continuamente el tejido, por medio de un microscopio, una vez aplicada una irradiación con una cierta fluencia dada.

III.6.3. Frecuencia de suministro de pulsos láser para generar canales continuos en el tejido

La frecuencia de suministro de pulsos a emplear en el experimento es un parámetro importante que hay que estimar adecuadamente. Dada una velocidad constante (V_b) de barrido en la muestra de tejido y el diámetro que alcanza la burbuja, la frecuencia de suministro de los pulsos láser determina la formación continua o interrumpida (por segmentos) del canal.

Es importante notar que la formación de un canal continuo también depende de la profundidad a la cual se genera la irradiación, esto por las propiedades materiales del tejido estromal a profundidades distintas.

La distancia entre los dos puntos en la muestra irradiados por dos pulsos consecutivos está dada por:

$$d_{bb} = V_b / f_p, \quad (30)$$

donde V_b es la velocidad de barrido, d_{bb} es la separación entre el centro de dos burbujas consecutivas, f_p es la frecuencia de suministro de pulsos.

Con el objetivo de analizar los casos que se pueden presentar al realizar los experimentos, planteamos un escenario similar al que se nos presenta en el laboratorio. En nuestro arreglo experimental la muestra de córnea es desplazada con ayuda de una mesa de traslación a una velocidad constante de 250 $\mu\text{m}/\text{seg}$, por lo tanto si aplicamos cierta cantidad de fluencia con el haz enfocado en el

tejido, existen cuatro posibles escenarios para la formación de canales que se pueden presentar. Estos dependen de la cantidad de fluencia aplicada y la frecuencia de suministro de los pulsos láser. Los escenarios que se pueden llegar a presentar están ilustrados en la figura 28 y son los que se describen a continuación:

- caso 1. *Selección de frecuencia de repetición de 10-15 Hz, velocidad del barrido constante, fluencia baja.* Si seleccionamos una frecuencia de repetición grande favorecemos el efecto de coalescencia entre las burbujas formadas en el tejido. Sin embargo, si la cantidad de fluencia aplicada sobre el tejido es pequeña ($F_{aplicada} \leq F_u$) el tamaño de la burbuja será pequeño, y por lo tanto la unión entre burbujas no se dará; un ejemplo de este caso puede ser con una selección de frecuencia de suministro del pulso de 15 Hz, con una velocidad constante de 250 $\mu\text{m}/\text{seg}$, de tal manera que obtendremos que la separación entre un pulso y otro es de 16.6 μm . Si la fluencia al tejido genera burbujas con radios menores a la mitad de dicha separación teóricamente la unión entre burbujas no se dará. Cabe señalar que en la practica se ha observado (trabajo de Gerardo Romo y Francisco Pérez) que si la distancia de separación entre burbujas consecutivas es mínima, burbujas vecinas tienden a migrar acercándose una a otra hasta unirse entre sí para formar una burbuja elongada.

- *Caso 2. selección de frecuencia de repetición grande, velocidad de barrido constante y fluencia aplicada sobre el tejido alta.* Al aplicar una cantidad de fluencia grande ($F_{\text{aplicada}} > F_u$) se generarán burbujas con dimensiones mayores al caso anterior, y debido a que la frecuencia de repetición del haz es grande esto genera que la posibilidad de que las burbujas coalezcan sea grande. En el ejemplo que se mencionó para el caso 1 se tiene que la separación entre un pulso y otro es de $16.6\mu\text{m}$, por lo tanto para que se de la unión entre burbujas (sin necesidad de migración), éstas deben de tener un radio igual o mayor de $8.3\mu\text{m}$. En el caso de que apliquemos un valor de fluencia alta generamos burbujas con diámetros mayores. Por lo tanto si se aplica una frecuencia de repetición del pulso grande las burbujas generadas con diámetros grandes se irán ensamblando unas con otras a lo largo de la trayectoria del barrido. Dentro de éste trabajo se observó que al irradiar el tejido corneal a una profundidad de $400\mu\text{m}$ (mencionado en la sección IV.3.3.) se requirió necesariamente aplicar una frecuencia de repetición del pulso de 15 Hertz para poder observar la generación de un canal de burbujas relativamente continuo y uniforme, ya que al aplicar una frecuencia de repetición del pulso menor a 15 Hertz no fue posible formar un canal de burbujas uniforme.

- *Caso 3. selección de frecuencia de repetición 1-9Hz, velocidad del barrido constante, aplicando fluencia baja sobre el tejido.* Al aplicar fluencia baja ($F_{aplicada} \leq F_u$) se genera una burbuja con dimensiones pequeñas, si la frecuencia de repetición del pulso es pequeña la distancia de separación entre cada pulso irradiado será grande, por lo que la unión entre burbujas con la finalidad de generar un canal no tendrá posibilidades de darse. Un ejemplo de este caso es una selección de frecuencia de suministro del pulso de 3 Hz, con una velocidad constante de 250 $\mu\text{m}/\text{seg}$ obtendremos que la separación entre un pulso y otro es de 83 μm , si aplicamos fluencia baja sobre la muestra, generamos burbujas cuyos diámetros son pequeños ocasionando que la unión entre burbujas vecinas no se efectúe. Para el caso experimental en donde irradiamos el tejido a una profundidad de 100 μm (mencionado en la sección IV.3.2.) se seleccionó la aplicación de pulsos láser a esta frecuencia de repetición debido a que la generación de canales fue posible a esta frecuencia de suministro de pulsos.
- *Caso 4. Selección de frecuencia de repetición pequeña, velocidad de barrido constante, aplicando fluencia grande.* Al aplicar una irradiación con una cantidad de fluencia grande ($F_{aplicada} > F_u$) se genera una burbuja con dimensiones grandes, por lo que a pesar de tener una

frecuencia de repetición pequeña las posibilidades de que las burbujas coalezcan serán altas. Por ejemplo si se emplea una frecuencia del pulso de 3 Hz con una velocidad constante de 250 $\mu\text{m}/\text{seg}$ obtendremos que la separación entre un pulso y otro es de 83 μm , por lo tanto para poder generar un canal de burbujas es requerido aplicar un valor de fluencia tal que genere burbujas con radios mayores o iguales 41.5 μm .

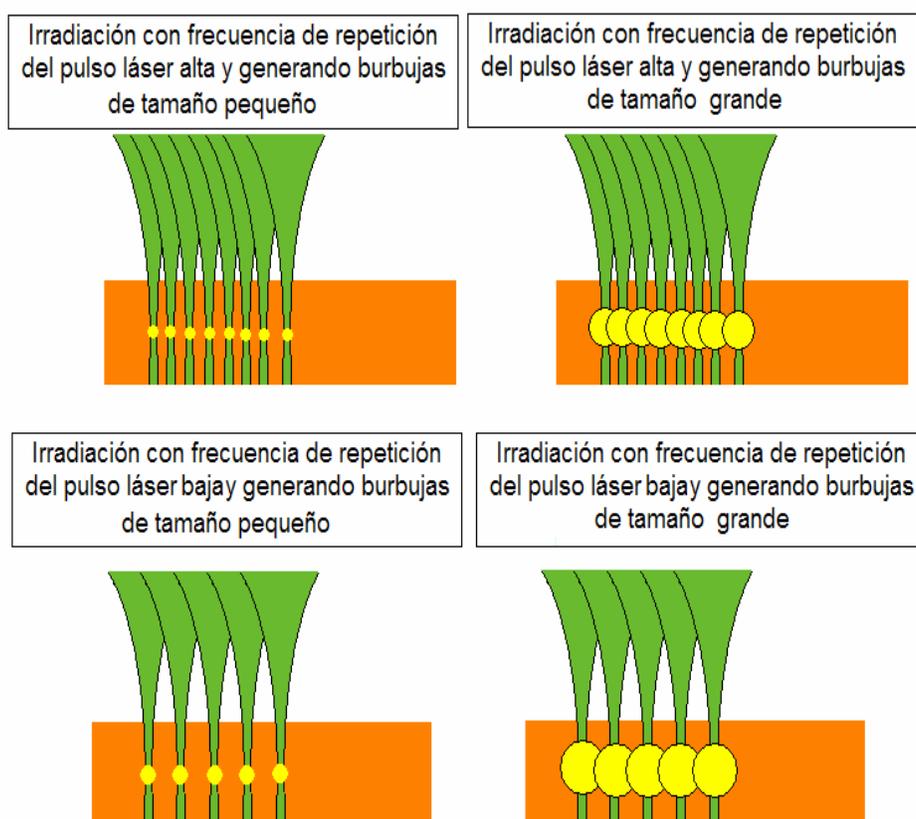


Figura 28. Los cuatro distintos posibles casos que se presentan al irradian el tejido con respecto a la frecuencia del pulso seleccionada y la dimensión de la burbuja generada.

Además de poder estimar la frecuencia de suministro de los pulsos al tejido, con el objetivo de generar la unión entre burbujas para formar canales es importante saber que el tejido corneal (en especial el estroma) se comporta distinto a la irradiación láser dependiendo de la profundidad a la cual se lleve a cabo dicha irradiación, este tema lo estudiaremos a detalle en los siguientes capítulos.

III.6.3. Difusión de calor en tejido

Otro de los efectos físicos que se buscó caracterizar fue el fenómeno del calentamiento que se presenta al irradiar el tejido con el láser. El calentamiento láser es proporcional a la fluencia aplicada, siendo el cambio de temperatura descrito por la expresión [Savas G. y Koubenakis A., 2002]:

$$\Delta T(z) = \frac{\alpha F_{laser}}{\rho_c C} e^{-\alpha z}, \quad (31)$$

donde $\Delta T(z)$ es el cambio de temperatura inducido por el pulso láser en el punto de irradiación, α es el coeficiente de absorción del tejido para la longitud de onda empleada, ρ_c es la densidad del tejido corneal, F_{laser} es la fluencia aplicada sobre la muestra, C es la capacidad de calor específico del tejido, z es la profundidad a la cual se realiza la irradiación.

En nuestro caso caracterizamos el calentamiento que sufre el tejido corneal para irradiaciones en el estroma (100 μm y 400 μm) a distintas fluencias y usando pulsos de ns con longitud de onda de 532 nm.

La metodología que se empleó para éste propósito fue la siguiente: en una tira de córnea se buscó realizar un corte horizontal (con bisturí) procurando efectuarlo a la mitad del grosor de la muestra de tejido corneal, realizado lo anterior se introdujo en el corte un termopar (ver apéndice A) que nos permitió medir el cambio de temperatura que se presenta al irradiar la córnea con distintos valores de fluencia. La captura de las lecturas de temperatura a través del termopar se llevaron a cabo mediante una tarjeta de adquisición de datos (Ver apéndice A), y un programa de adquisición específico para esta tarjeta.

Los pasos que se requiere seguir para la realización de estos experimentos son los siguientes:

- Es necesario localizar la cintura del haz láser a una distancia muy próxima con respecto a la ubicación del termopar, con la finalidad de que el termopar registre el cambio de temperatura en una vecindad muy cercana al punto en el cual se realiza la irradiación (típicamente la distancia entre el termopar y el punto de irradiación es de aproximadamente 500 μm).
- Se introduce la cintura del láser a la profundidad deseada (100 μm ó 400 μm).

- Se irradia sobre un punto a una determinada fluencia y con una frecuencia de repetición de 10 Hertz.
- Se irradia la muestra durante aproximadamente 45 segundos, a la vez se captura la medición de temperatura que el termopar registra.
- Después de los 45 segundos de irradiación se obstruye el haz y se continúa con la adquisición de datos de temperatura hasta observar que la temperatura del tejido regresa a una temperatura cercana a la inicial.

La figura 29, muestra una fotografía capturada con ayuda de un microscopio (40x), donde se observa el termopar colocado dentro del tejido corneal.

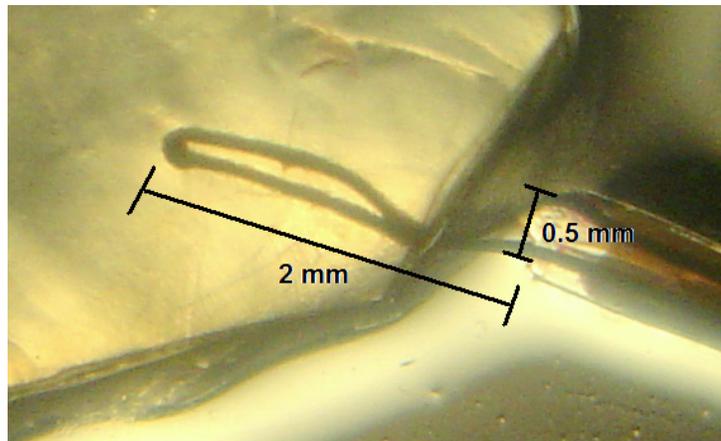


Figura 29. Colocación de termopar dentro de la córnea.

III.6.4. Formación de burbujas en la córnea usando pulsos de femtosegundos

Aunque no formó parte del objetivo central de esta tesis, es de gran interés para nosotros el llevar a cabo experimentos de irradiación de tejido corneal con pulsos láser de femtosegundos. Al igual que en el caso de nanosegundos es posible inducir la formación de burbujas en la córnea usando pulsos de femtosegundos. Las dimensiones de las burbujas que se producen empleando éste tipo de láser son más finas y precisas. Para dichos experimentos se empleó el arreglo mostrado en la figura 30. Es importante mencionar que los experimentos que se llevaron a cabo con pulsos de femtosegundos son de carácter preliminar para efectos de esta tesis. La profundidad a la cual se irradió en este caso fue de $100\mu\text{m}$. En el diseño y desarrollo de los experimentos se contó con varios accesorios que facilitarían el estudio de la formación inicial y evolución de la burbuja, el tiempo de vida (pocos segundos) y el tamaño ($< 50 \mu\text{m}$) de las burbujas formadas con el pulso de femtosegundos hicieron necesario el diseño de las siguientes herramientas y accesorios que se agregan a nuestro arreglo experimental anterior (ns):

- *Láser de He-Ne.* Su implementación tiene como objetivo el auxiliar en el monitoreo del fenómeno de la formación de burbujas de cavitación en el tejido. El haz de este láser de emisión continua se propaga

colinealmente con el láser pulsado responsable de la formación de las burbujas en el tejido; el láser de He-Ne se enfocó directamente a la muestra propagándose en el mismo camino óptico que el haz láser de femtosegundos. El haz de He:Ne transmitido a través de la muestra se hace incidir sobre un fotodiodo, el cual está conectado a una tarjeta de adquisición de datos (InstruNet). La colección de datos se lleva a cabo en una computadora, se inicia la captura de la señal del láser He:Ne transmitida unos pocos segundos antes de que un pulso de femtosegundos genere una burbuja en el tejido y se continúa con la captura durante todo el proceso de formación y evolución de la burbuja en el tejido. Esta técnica nos proporciona información resuelta en el tiempo del lapso que le toma a una burbuja alcanzar su tamaño máximo y nos permite también medir el tiempo de vida media de la burbuja.

- *Tarjeta InstruNet*, se implementó con la finalidad de capturar datos de la luz transmitida (haz de He:Ne) a través del tejido corneal antes, durante y posterior a la formación de la burbuja. La luz transmitida es monitoreada por un fotodiodo (Thorlabs, ver apéndice A).

- *Fuente de luz blanca*, se alineó de tal manera que sirviera como fuente de iluminación de la zona de interacción en la muestra con la cámara CCD del PEB se captura la imagen (video, durante ~ 3 min.) de la

muestra de tejido en el momento exacto en que se genera la burbuja y se observa la evolución de la burbuja durante el lapso en el que persiste dicha burbuja (menos del tiempo de captura).

- *Cámara CCD*, captura la imagen (video) en tiempo real del tejido irradiado, por lo que registra la generación y evolución de la burbuja. La información que obtenemos de la cámara CCD puede ser cotejada con la traza de transmitancia obtenida a través del fotodiodo y la tarjeta InstruNet, ya que ambas contienen información acerca de la formación y evolución de la misma burbuja.

Los pasos necesarios para realizar los experimentos de esta sección fueron:

- Alineación adecuada del PEB
- Introducir la cintura del haz a la profundidad a la cual deseamos irradiar
- Seleccionar la fluencia con la cual se desea irradiar el tejido
- Llevar a cabo una irradiación con solo un pulso, y determinar la fluencia umbral para la formación de una burbuja
- Desplazar lentamente la muestra una distancia adecuada (con la mesa de traslación) para no irradiar nuevamente en el área donde se irradió con un solo pulso, y con el mismo valor de fluencia irradiar a

una velocidad constante de $250\mu\text{m}/\text{seg}$ por aproximadamente 15 segundos sin bloquear el paso de pulsos láser, la frecuencia de suministro de los pulsos láser fue de 10 Hertz. El objetivo fue generar un canal en el tejido.

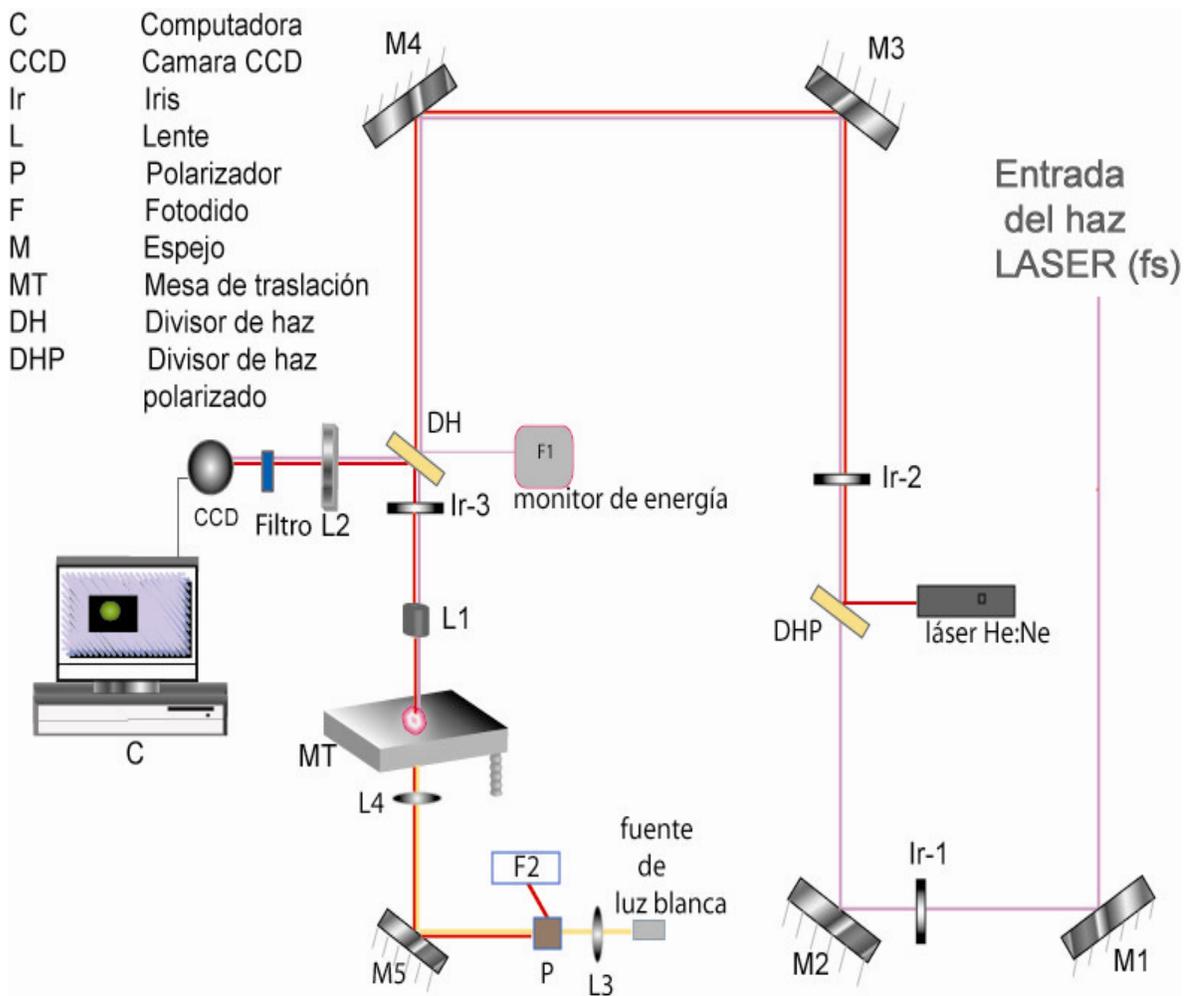


Figura 30. Arreglo de estación de microprocesado empleando láser pulsado de femtosegundos e implementación auxiliar del láser de He-Ne y una lámpara de luz blanca.

III.7. Método para medir dimensión de burbujas de cavitación

Para medir el tamaño de las burbujas que se generaron en los diferentes experimentos se fotografió el tejido irradiado y posteriormente se analizaron y procesaron las imágenes con detalle.

Es importante mencionar que para lograr una medición adecuada de las burbujas generadas en el tejido corneal fue de suma importancia el contar con un microscopio (ver apéndice A) de disección con magnificación 20X y 40X que nos permitiera observar con detalle suficiente las características particulares de cada región irradiada. Las imágenes analizadas en el microscopio fueron capturadas con una cámara digital marca Sony modelo Cyber Shot de 5.0 mega píxeles.

Como primer paso se colocó la muestra irradiada en el microscopio y se fijó la magnificación (variable en cada muestra) tal que la visibilidad de las burbujas fuera óptima para la captura de la imagen a través de la cámara digital (ver apéndice A). Posteriormente se captura a la misma magnificación en el microscopio la imagen de una retícula grabada con una escala que presenta subdivisiones cada 100 μ m.

Usando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (ver apéndice A) se hace una medición directa de la burbuja usando la imagen calibrada de la retícula. De esta manera se puede determinar el tamaño de las dimensiones de la burbuja o bien de los canales formados en el tejido.

Los experimentos se realizaron generando un barrido de la muestra con una serie de pulsos láser, el resultado es la formación de un canal a partir de

burbujas individuales. Para medir el ancho del canal se tomó un corte transversal en el imagen del canal (perpendicular al eje del canal) como se muestra en la figura 31; así se obtiene el perfil del grosor del canal en unidades de pixeles, una vez teniendo ésta información se compara con la cantidad de pixeles que se tienen en la unidad de medida conocida (subdivisiones de 100 μ m de la imagen calibrada) y de esta manera obtenemos el ancho del canal formado en el tejido.

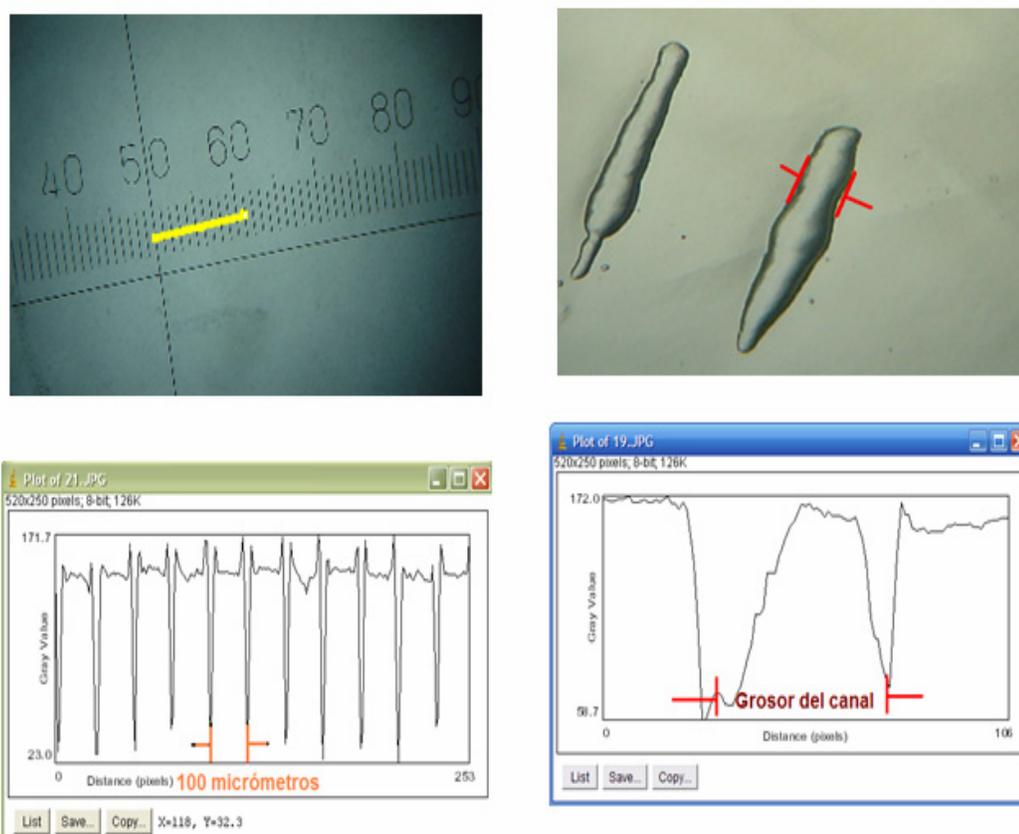


Figura 31. Ilustración del proceso para medir el ancho de un canal en el tejido corneal.

III.8. Estimación de las fluctuaciones experimentales que afectan la formación de burbujas y canales en el tejido

III.8.1. Tamaño de las burbujas.

Los experimentos realizados en nuestra investigación fueron llevados a cabo en tejido corneal de distintas crías porcinas. En todos los tejidos corneales recolectados se pudo observar el efecto de la formación de burbujas.

Un efecto que se observó es que la formación de burbujas presenta cierta variación en su diámetro al reproducir el mismo experimento con los mismos parámetros físicos, con la excepción de que en cada caso se emplearon tejidos corneales de distintos animales. Existe también cierta variación (que por lo general es pequeña) en el ancho de un canal formado en la córnea aplicando la misma fluencia a lo largo de toda la trayectoria de irradiación.

En los resultados que obtuvimos (presentados en el siguiente capítulo) se observó que existe un rango de fluctuación en los datos obtenidos con respecto al tamaño de las burbujas. Las fluctuaciones en tamaño obtenidas para una fluencia fija están asociadas directamente al control en la localización exacta de la cintura del haz a la profundidad a la cual se desea llevar a cabo la irradiación; a la fluctuación natural (pulso a pulso) en la fluencia aplicada al tejido y a la inhomogeneidad natural que se presenta en el tejido. Las fluctuaciones en la fluencia aplicada se deben a la variación de energía pulso a pulso que suministra el sistema láser, sin embargo esta fluctuación es mínima, en el siguiente capítulo se muestran dichas fluctuaciones.

El criterio para estimar las fluctuaciones en el tamaño de las burbujas generadas fue el siguiente: se registraron 5 mediciones del diámetro de burbujas cuya fluencia aplicada haya sido la misma (o muy similar, con diferencia de un ~1-2% entre las fluencias).

- Para la variación en Fluencia:

Se consideraron los valores de fluencia registrados al realizarse el experimento; se obtuvo la diferencia entre la fluencia máxima y mínima que se registra del propio sistema (ΔF) y el promedio entre éstas (\bar{F}) para posteriormente sustituirlas en ecuación 32.

$$\textit{Fluctuación en Fluencias} = \frac{\Delta F}{\bar{F}}, \quad (32)$$

- Para estimar la fluctuación en el tamaño de las burbujas:

Se realizaron 5 mediciones distintas del diámetro de burbujas, cuya condición experimental fuera similar, como primer paso se obtiene el valor promedio de los valores obtenidos y posteriormente se obtiene el valor de la desviación estándar que es la medida que nos da información de cuánto tienden a alejarse los valores puntuales del

valor promedio, ambos valores se obtienen con las formulas mostradas a continuación:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i, \quad (33)$$

donde \bar{x} es el promedio, N es la cantidad de valores dados, x_i es cualquier valor que se encuentra en el conjunto de datos.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}, \quad (34)$$

donde σ es la desviación estándar.

IV. RESULTADOS EXPERIMENTALES

IV.1. Introducción

Dentro de éste capítulo de la tesis presentaremos los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados en este trabajo de investigación.

Los resultados experimentales obtenidos dieron pauta para la creación de algunas ideas que ayudarán en un futuro en el estudio más detallado del tejido corneal sometido a distintas exposiciones láser.

Ya que la planeación del proyecto incluye en un futuro poder implementar una nueva aplicación en la rama de la oftalmología es importante explorar aquellas situaciones donde se pudiera aplicar el láser como herramienta del área médica.

Los experimentos que se desarrollaron para el trabajo de esta tesis estuvieron basados en propiedades del tejido corneal como su transparencia y su constitución por capas.

IV.2. Obtención del espectro de Absorción del tejido corneal

Es importante caracterizar algunos parámetros ópticos del tejido corneal, es por este motivo que llevamos a cabo mediciones del espectro de absorción de la córnea.

Con el fin de obtener el espectro de absorción usamos un espectrofotómetro. El espectrofotómetro empleado fue un Perkin-Elmer 330 Spectrophotometer, el cual nos proporciona la curva de transmitancia de la córnea en función de la longitud de onda de la luz incidente.

La figura 32 muestra la curva de transmitancia obtenida para el tejido corneal porcino en el rango de longitud de onda de 350nm a 900nm; es importante conocer qué valores de coeficiente de absorción presenta el tejido dentro de éste rango, ya que los láseres que usamos en nuestro estudio de irradiación emiten en las longitudes de onda de 532nm (láser de ns) y 800nm (láser de fs).

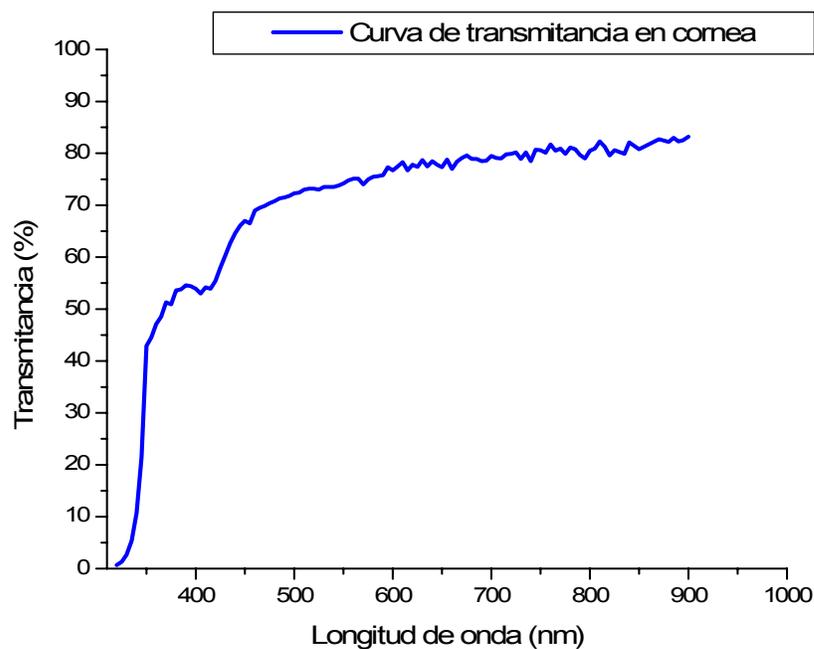


Figura 32. Curva de transmitancia en córnea.

La información que el espectrofotómetro nos proporciona es el porcentaje de luz transmitida (transmitancia) para distintas longitudes de onda.

El espectrofotómetro que se empleó está diseñado mediante un arreglo a base de dos esferas integradoras (una de referencia y otra donde se coloca la muestra a estudiar), también presenta su propio programa para la captura de datos. Teniendo esta información podemos así mismo obtener el coeficiente de absorción de la córnea para las longitudes de onda cubiertas por el espectrofotómetro.

Cuando se describe el efecto de absorción óptica en algún material con un grosor dado o con una concentración de absorbedor dada, las leyes de Lambert y

de Beer [Neims H. M., 1996] son frecuentemente aplicadas, éstas se expresan respectivamente de la siguiente manera.

$$I(z) = I_0 \exp(-\alpha z), \quad (35)$$

$$I(z) = I_0 \exp(-k' c z), \quad (36)$$

donde $I(z)$ es la intensidad transmitida dentro del medio de grosor z , I_0 es intensidad incidente, α es el coeficiente de absorción del medio, c es la concentración del agente absorbente, k' son parámetros internos de la muestra (como temperatura).

Para nuestro propósito solo emplearemos la ley de Lambert (ecuación 35). Despejando α obtenemos:

$$\alpha = -\frac{1}{z} \ln \frac{I(z)}{I_0}, \quad (37)$$

sabiendo que la transmitancia esta dada por

$$T = \frac{I(z)}{I_0}, \quad (38)$$

podemos expresar la ecuación 37 como:

$$\alpha = -\frac{\ln(T)}{z}, \quad (39)$$

Si conocemos el valor de la transmitancia a través del espectrofotómetro, y además conocemos el grosor de la córnea (aproximadamente 550 μm) podemos usar la ecuación 39, para determinar el coeficiente de absorción en función de la longitud de onda.

El coeficiente de absorción para el tejido corneal se muestra en la figura 33.

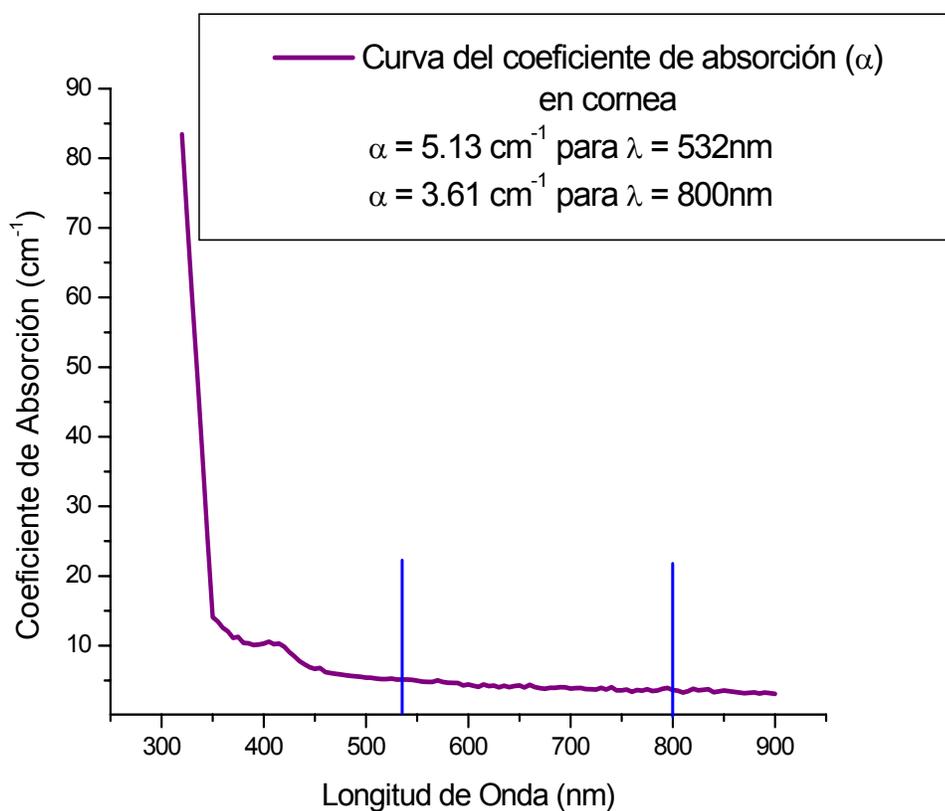


Figura 33. Curva del coeficiente de absorción del tejido corneal.

El resultado obtenido para el coeficiente de absorción de la córnea, fue comparado con el reportado por [Neims H. M., 2003] obteniéndose un

comportamiento de la curva del coeficiente de absorción muy similar en ambos casos.

Los láseres que se usaron en nuestros experimentos emiten en $\lambda=532\text{nm}$, (Nd:YAG doblado en frecuencia) y $\lambda = 800\text{nm}$ (Ti:Zafiro), los valores del coeficiente de absorción para cada una de estas longitudes de onda son 5.13 cm^{-1} cuando trabajamos con la longitud de onda de 532nm , 3.61 cm^{-1} cuando trabajamos con la longitud de onda de 800nm .

IV.3. Generación de burbujas en tejido corneal porcino con pulsos láser de nanosegundos

IV.3.1. Variación típica en las dimensiones de las burbujas

Las figuras 34 y 35 nos proporcionan información sobre la variación típica en los diámetros de los canales obtenidos para las irradiaciones aplicadas a $100\mu\text{m}$ y a $400\mu\text{m}$ de profundidad empleando pulsos de nanosegundos; es importante notar que para los canales realizados a $100\mu\text{m}$ de profundidad la variación en el ancho del canal es del orden de $\pm 30\mu\text{m}$ aproximadamente, ya que los canales a esta profundidad se generan de una manera uniforme; sin embargo, para los canales producidos en las irradiaciones aplicadas a $400\mu\text{m}$ de profundidad la fluctuación en el ancho de los canales es mayor, alrededor de $\pm 80\mu\text{m}$, es decir que para esta profundidad la formación de los canales no se genera

de manera tan uniforme como para el caso de irradiaciones aplicadas a 100 μm de profundidad.

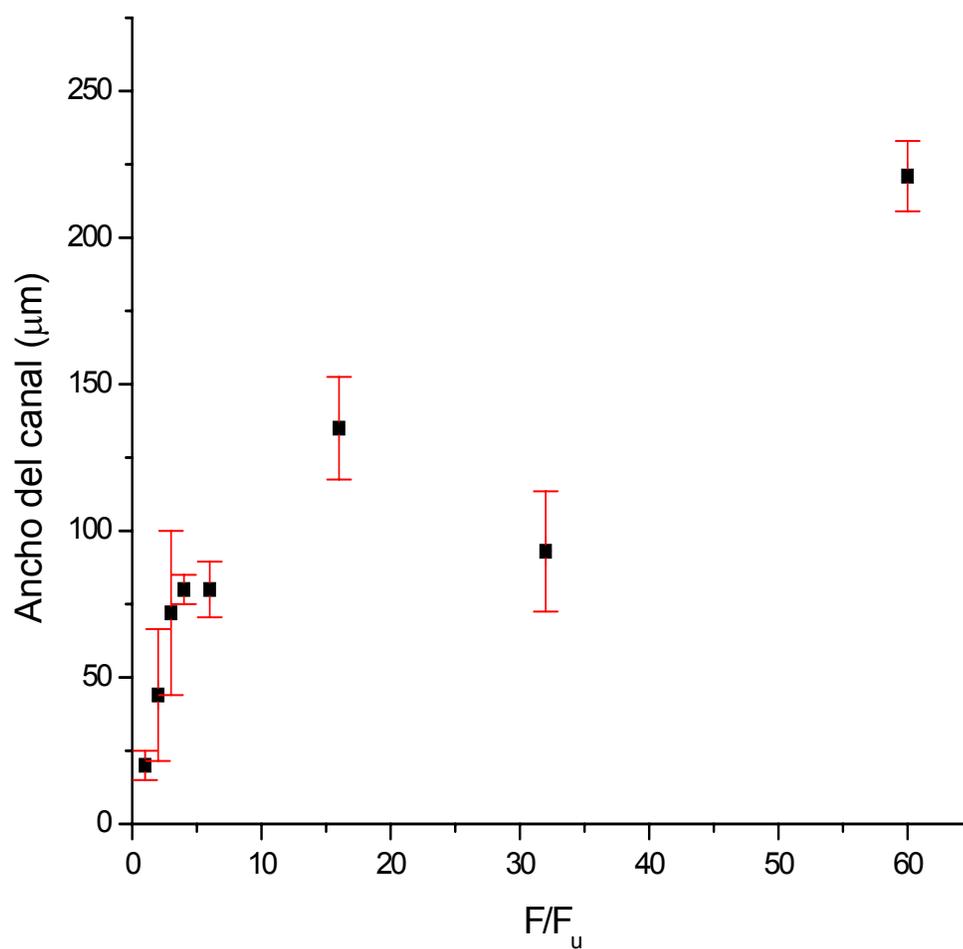


Figura 34. Curva de comportamiento estadístico en el ancho de los canales para irradiaciones a 100 μm de profundidad empleando pulsos de nanosegundos.

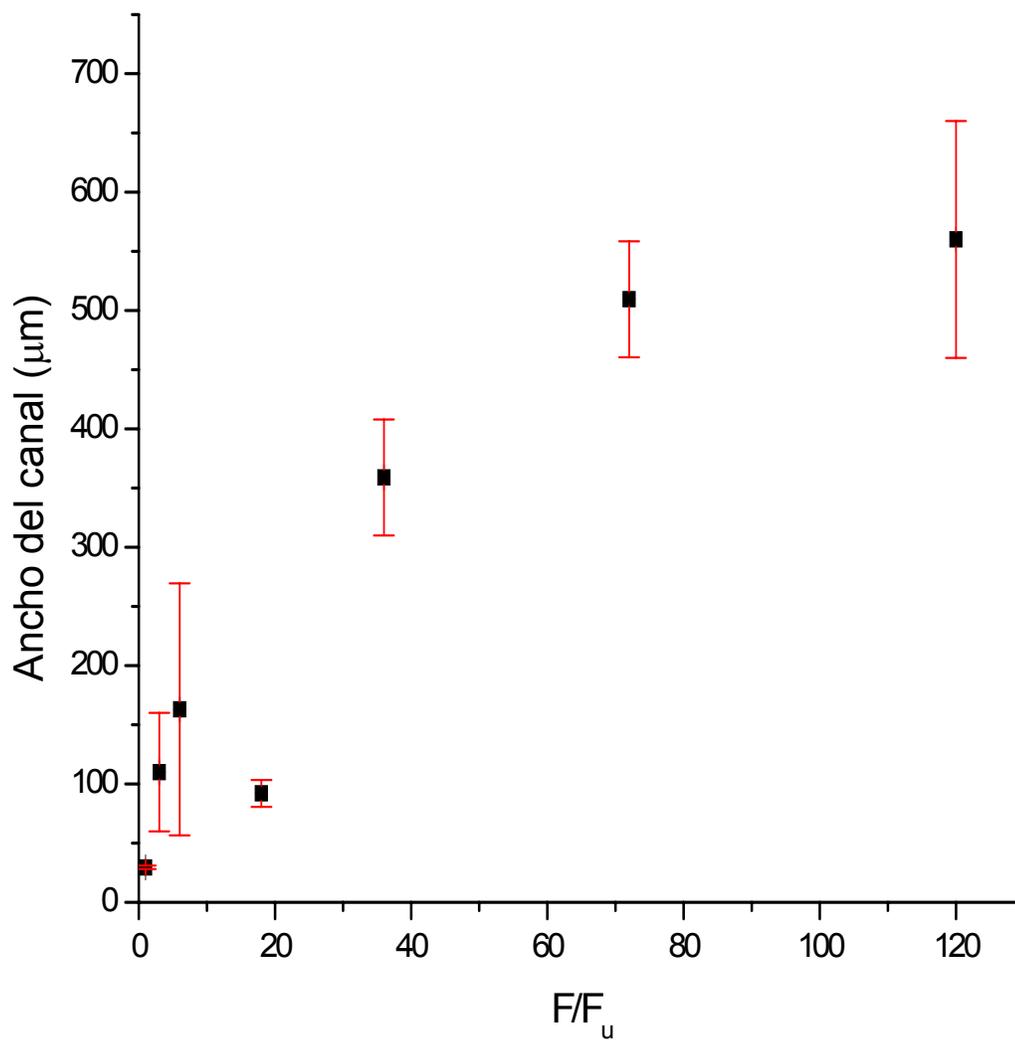


Figura 35. Curva de comportamiento estadístico en el ancho de canales para irradiaciones a $400\mu\text{m}$ empleando pulsos de nanosegundos.

Uno de los aspectos a considerar es que nuestros experimentos se realizaron en tiras de tejido corneal extraído del globo ocular por la facilidad que la muestra preparada de esta forma ofrece para observar con mayor exactitud el

proceso de generación de las burbujas; sin embargo, cabe esperar que si dichos experimentos se llevaran a cabo sobre el tejido corneal sin desprenderlo del globo ocular, es decir, en su condición natural los resultados serían distintos afectando las dimensiones de burbujas o la forma y dimensión de canales formados en la córnea. En la sección IV.3.3. Se observaron algunos resultados físicos de la irradiación sobre la córnea sin desprenderla del globo ocular, se verifica que los canales presentan una dimensión más uniforme a los canales que se generaron sobre tiras de córnea desprendida.

IV.3.2. Irradiación a 100 μm de profundidad en la córnea

Como mencionamos en la sección III.6.2., donde tratamos la metodología para generar burbujas en el tejido, nuestros experimentos consistieron en la irradiación de la córnea a dos distintas profundidades siendo éstas de 100 μm y 400 μm .

Para el caso de irradiaciones a 100 μm se hicieron los experimentos empleando tanto pulsos de nanosegundos como pulsos de femtosegundos. Esta sección presenta los resultados obtenidos empleando pulsos de nanosegundos.

Básicamente la metodología que se siguió fue localizar la cintura del haz en la superficie de la muestra (con la ayuda del sistema PEB) para posteriormente introducir dicha cintura a la profundidad deseada, ya sea 100 μm ó 400 μm , para finalmente irradiar el tejido con uno o más pulsos con una fluencia controlada.

Deseamos identificar los cambios que pudiera sufrir el tejido como es el caso de la presencia de una burbuja.

Los experimentos nos permitieron identificar la fluencia umbral para la formación de burbujas en el tejido. Podemos además caracterizar las burbujas en función de los parámetros láser.

La frecuencia de suministro de pulsos fue de 3 Hertz (en la sección III.6.3., tratamos el tema de la frecuencia de suministro de pulsos).

La fluencia umbral aplicada en el tejido y a la cual se pudo observar la generación de una burbuja permanente, fue de: F_u ($100\mu\text{m}$ de profundidad empleando pulsos de 5 ns) = 0.308 kJ/cm^2 . A dicha fluencia, la denominamos como “*fluencia umbral de formación de burbuja (F_u)*” definimos burbuja permanente a una burbuja cuyo tiempo de vida media es mayor al tiempo de deshidratación de la córnea.

En el caso en el que se aplica una fluencia por pulso de la magnitud de F_u , se presenta la formación de una burbuja con diámetro aproximado de $20\ \mu\text{m}$. A la fluencia umbral no fue posible generar un canal de burbujas, debido a que el tamaño de la burbuja es pequeño en comparación con el tamaño que se requiere para que se logre la unión entre burbujas, todo esto realizando el barrido a una frecuencia de repetición de 3 Hertz. La figura 36 muestra el barrido de pulsos en el estroma al aplicar la fluencia umbral (F_u).

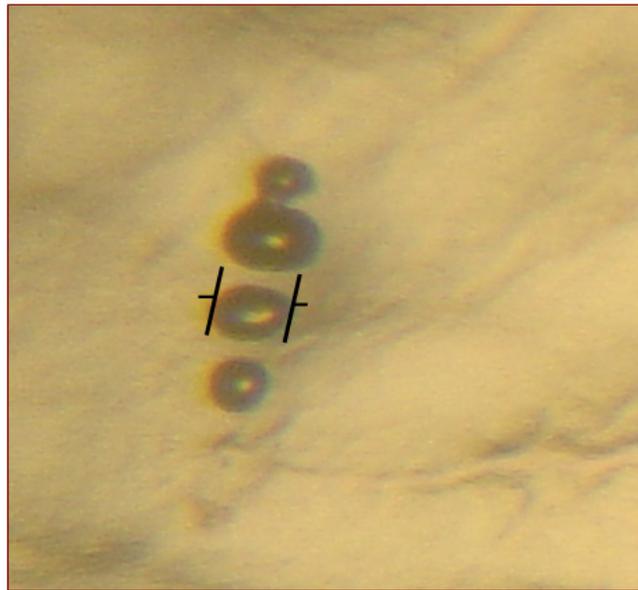


Figura 36. Burbujas generadas a la fluencia umbral irradiando a 100 μm de profundidad, dimensión de las burbujas $\sim 20 \mu\text{m}$. Frecuencia de repetición de 3 Hertz, velocidad de barrido 250 $\mu\text{m}/\text{seg}$.

Cuando se aplicaron fluencias muy grandes, se presentó la ruptura del tejido corneal en la superficie; la fluencia a la que se presenta este fenómeno la denominamos *fluencia umbral de daño catastrófico* (F_u^C). En nuestro caso F_u^C (100 μm de profundidad empleando pulsos de 5 ns) = 25 kJ/cm^2 .

Las figura 37 y 38, muestran el ancho del canal en función de la fluencia aplicada en el tejido corneal.

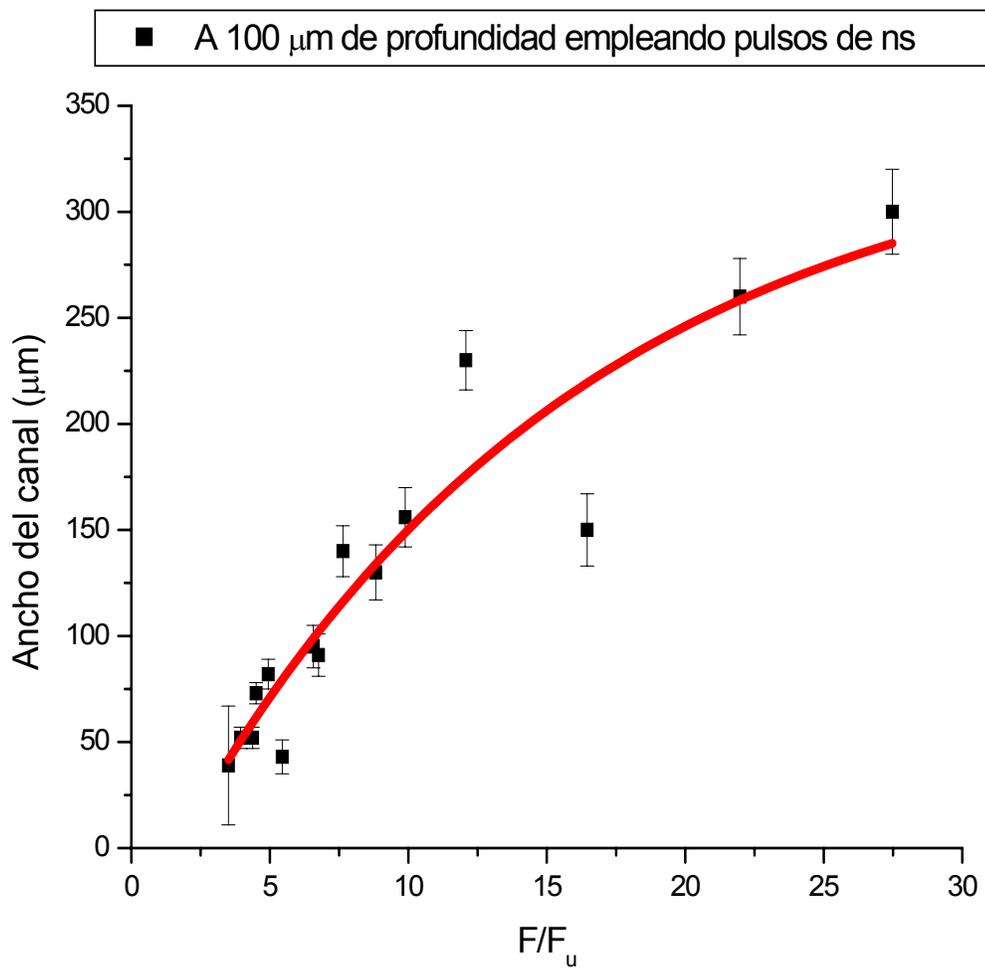


Figura 37. Canales permanentes a 100µm de profundidad, aplicando fluencias hasta 30 veces la F_u , empleando láser de 5ns.

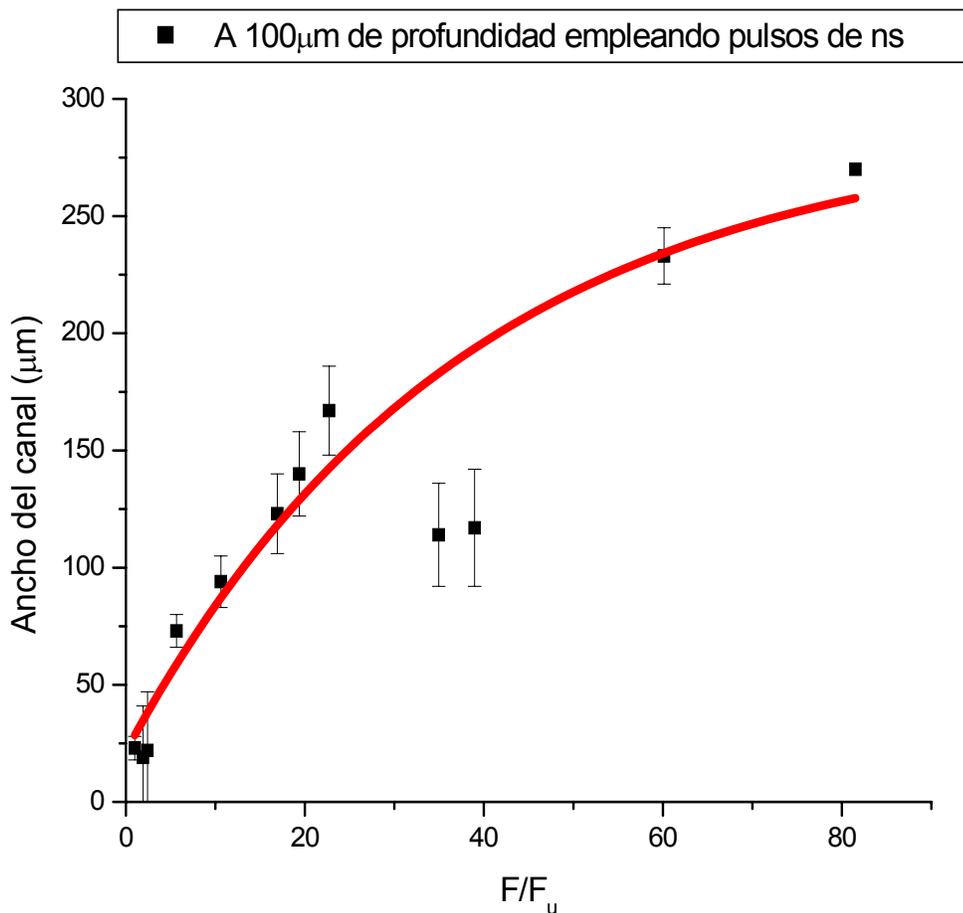


Figura 38. Canales permanentes a 100 μ m de profundidad aplicando fluencias hasta 80 veces la F_u , empleando láser de 5ns.

La curva continua mostrada en la gráfica solo muestra la tendencia del comportamiento de los puntos obtenidos experimentalmente, dicha curva no es resultado de algún modelo físico que explique el comportamiento mostrado por los datos experimentales.

Como se mencionó antes, si se realiza un barrido del tejido a una velocidad constante y con el suministro de pulsos al tejido a una cierta frecuencia de repetición se pueden formar canales. Las siguientes figuras muestran algunos resultados de formación de canales en la córnea, los cuales resultan de la irradiación del estroma con el láser enfocado a $100\ \mu\text{m}$ y realizando un barrido a una velocidad de $250\ \mu\text{m}/\text{seg}$, usando una frecuencia de repetición de $3\ \text{Hz}$.

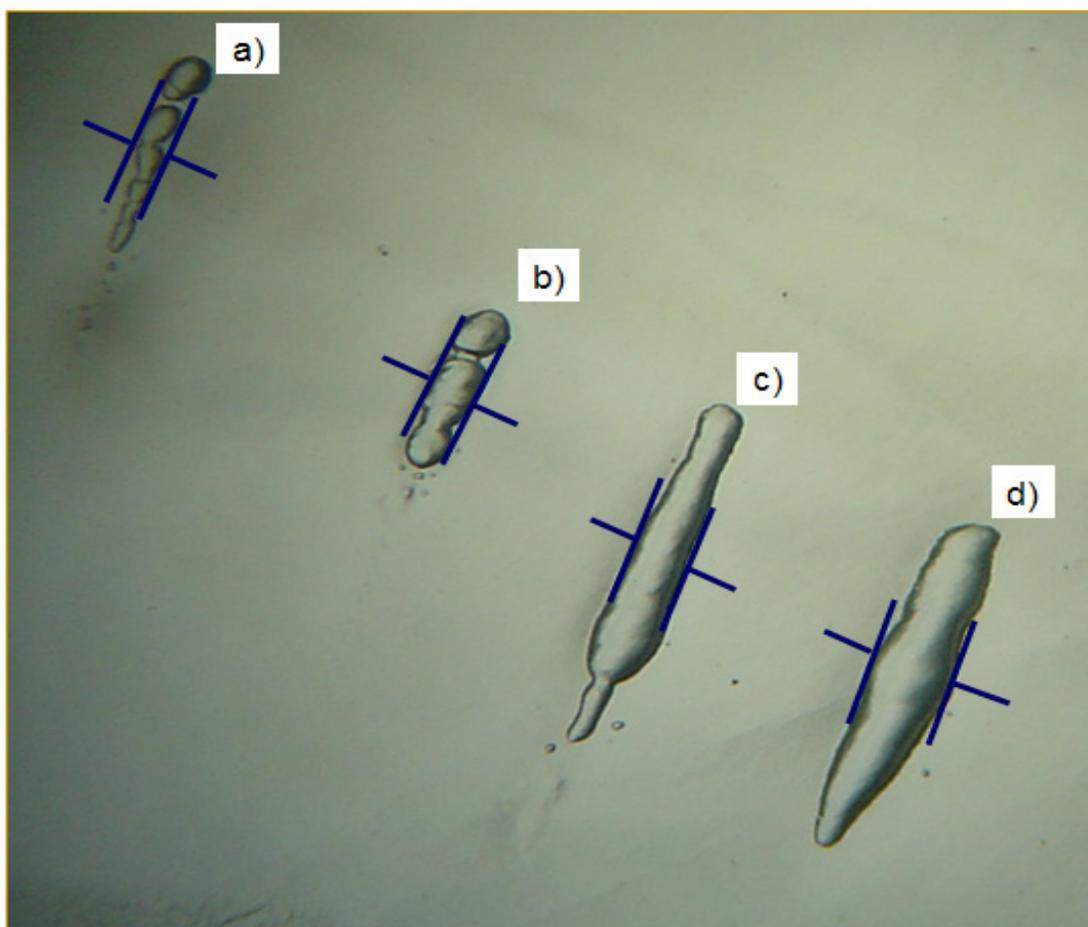


Figura 39. Canales de burbujas generadas a $100\ \mu\text{m}$ de profundidad, empleando pulsos de ns, con una frecuencia de suministro de pulsos de $3\ \text{Hz}$. a) Fluencia aplicada: $6.5\ F_u$, obteniendo un canal con ancho de $95\ \mu\text{m}$, b) Fluencia aplicada: $7.6\ F_u$, obteniendo un canal con ancho de $140\ \mu\text{m}$, c) Fluencia aplicada: $9.8\ F_u$, obteniendo un canal con ancho de $156\ \mu\text{m}$, d) Fluencia aplicada: $12\ F_u$, obteniendo un canal con ancho de $230\ \mu\text{m}$.

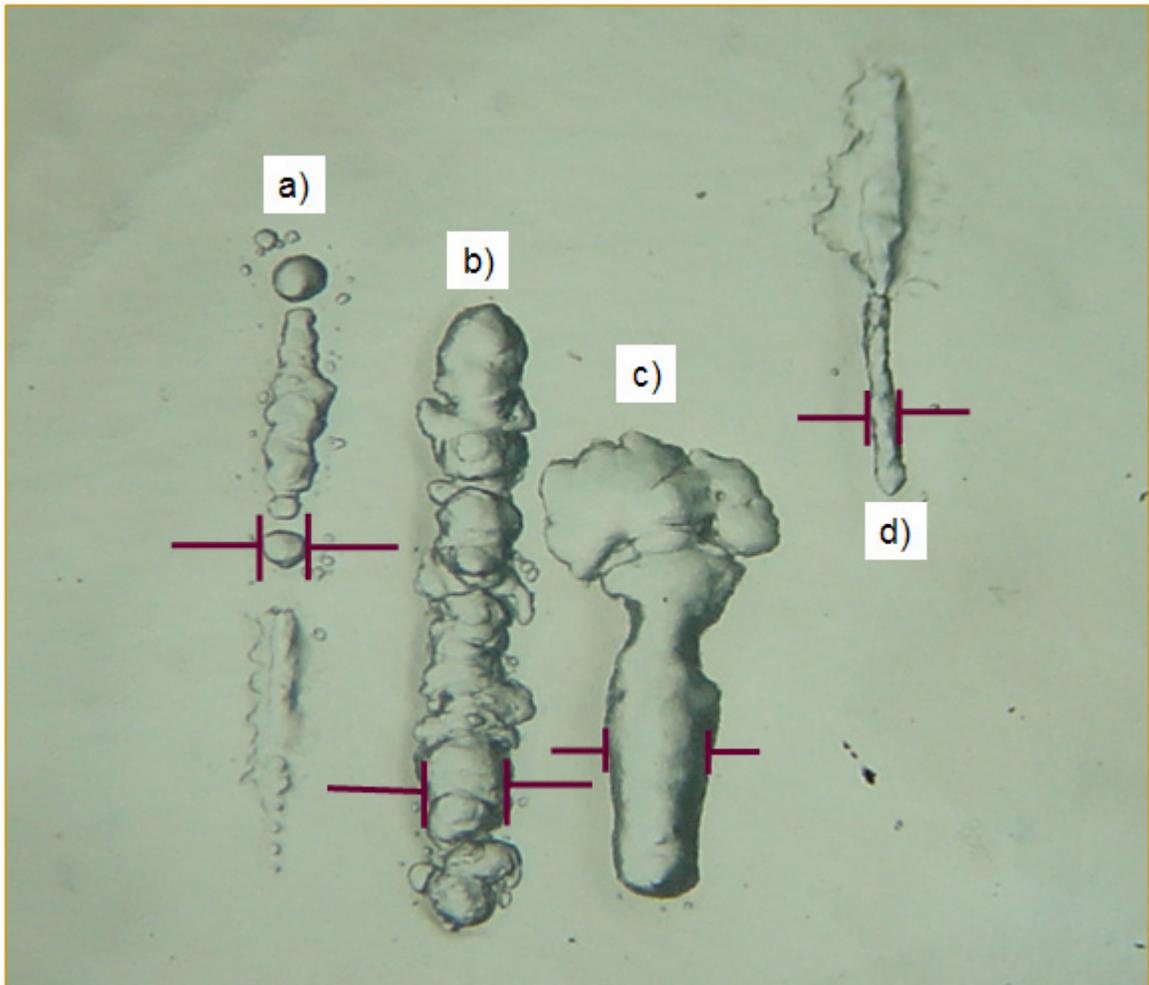


Figura 40. Canales de burbujas generadas en tejido corneal a 100 μm de profundidad, aplicando pulsos de ns, con una frecuencia de suministro de pulsos de 3 Hertz. a) Fluencia aplicada: 16.4 F_u , obteniendo un canal con ancho de 150 μm , b) Fluencia aplicada: 22 F_u , obteniendo un canal con ancho de 260 μm , c) Fluencia aplicada: , obteniendo un canal con ancho de 300 μm ; e) Ablación generada en la superficie, con un suministro de pulsos de 3 Hertz, aplicando una fluencia de 27.5 F_u (la fluencia aplicada para este caso es la misma que se aplicó en el caso d), diferenciándolos solo por la profundidad a la cual se realiza la irradiación).

IV.3.3. Resultados obtenidos a 400µm de profundidad empleando pulsos de nanosegundos

La metodología que se empleó tanto para los experimentos realizados a 100 µm como para los realizados a 400 µm de profundidad es la misma y se explica con detalle en la sección III.6.2.

De la misma manera que el caso anterior se identificó la fluencia umbral de formación de burbujas F_u , así como la dependencia del tamaño de la burbuja en función de la fluencia aplicada.

La F_u^C no se presenta a esta profundidad. La fluencia umbral (F_u) para la formación de una burbuja permanente, a 400µm de profundidad fue de: $F_u (400\mu m \text{ de profundidad empleando pulsos de } 5 \text{ ns}) = 0.96 \text{ kJ/cm}^2$

En el caso en el que se aplica una fluencia de 0.96 kJ/cm² por pulso y se realiza un barrido se presenta la formación de un canal con un ancho aproximado de 30 µm, dicho canal se observa en la siguiente figura.



Figura 41. Burbujas generadas a la fluencia umbral irradiando a 400 µm de profundidad, dimensión de las burbujas ~ 30 µm. Frecuencia de repetición de 3 Hertz, velocidad de barrido 250 µm/seg.

En las siguientes figuras mostramos la dependencia del tamaño de la burbuja como función de la fluencia.

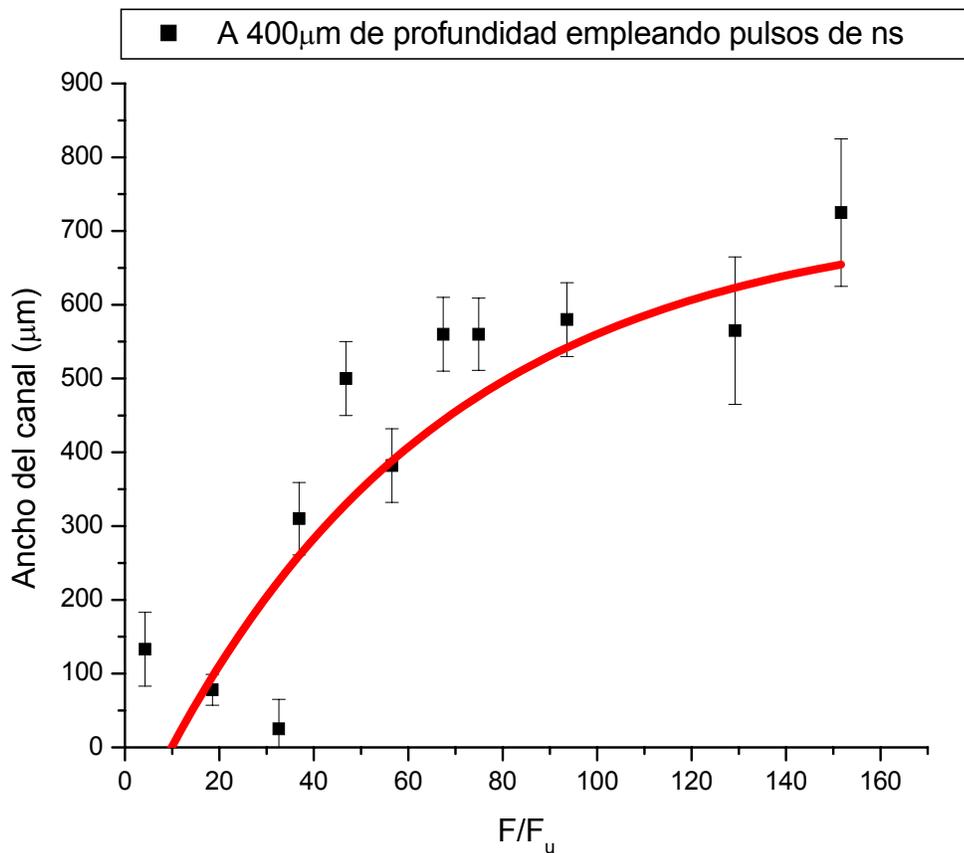


Figura 42. Canales permanentes a 400 μ m de profundidad, aplicando hasta 160 F_u, empleando láser de 5ns.

La respuesta que se observa en las gráficas mostradas en las figuras 42, 43 es la respuesta que se genera al irradiar el tejido corneal a una profundidad de 400 μ m de profundidad; un fenómeno importante y que cabría esperar es que el

comportamiento que presentan en estas curvas es el mismo que se observa al realizar irradiaciones a una profundidad de 100 μm por debajo de la superficie.

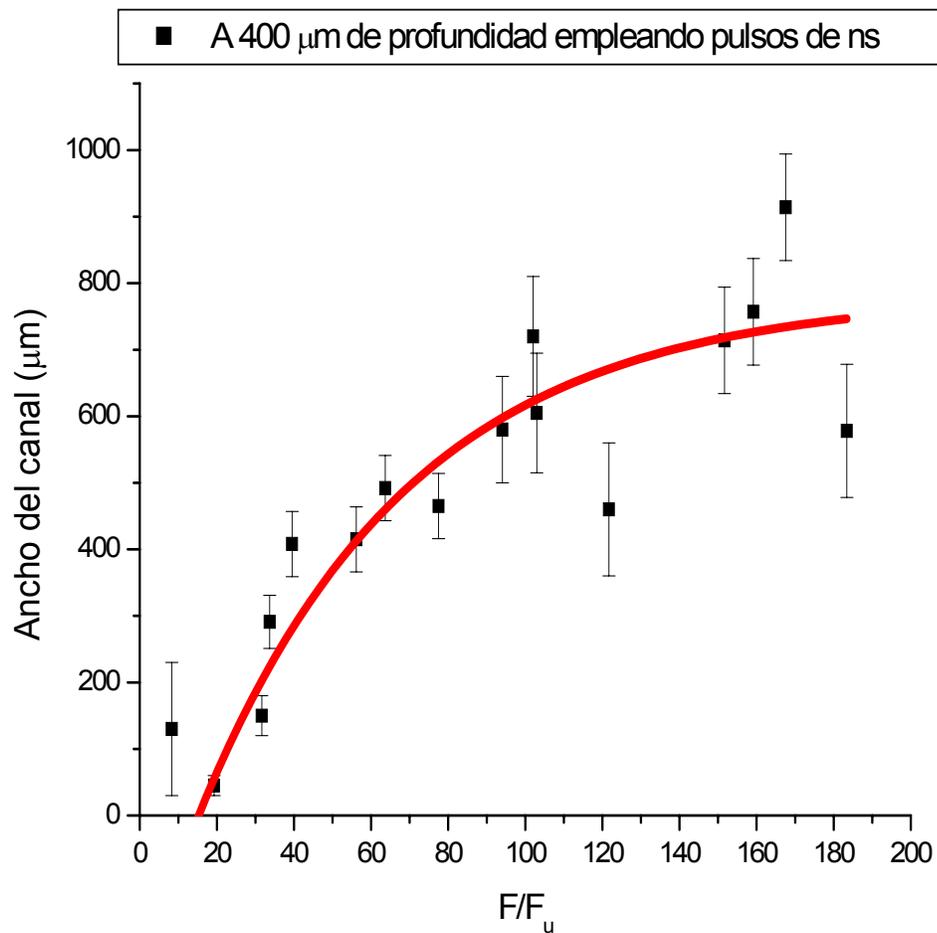


Figura 43. Canales permanentes a 400 μm de profundidad, aplicando hasta 180 F_u , empleando láser de 5ns.

En este caso también documentamos la formación de burbujas en el tejido, las cuales se observan en las siguientes figuras.

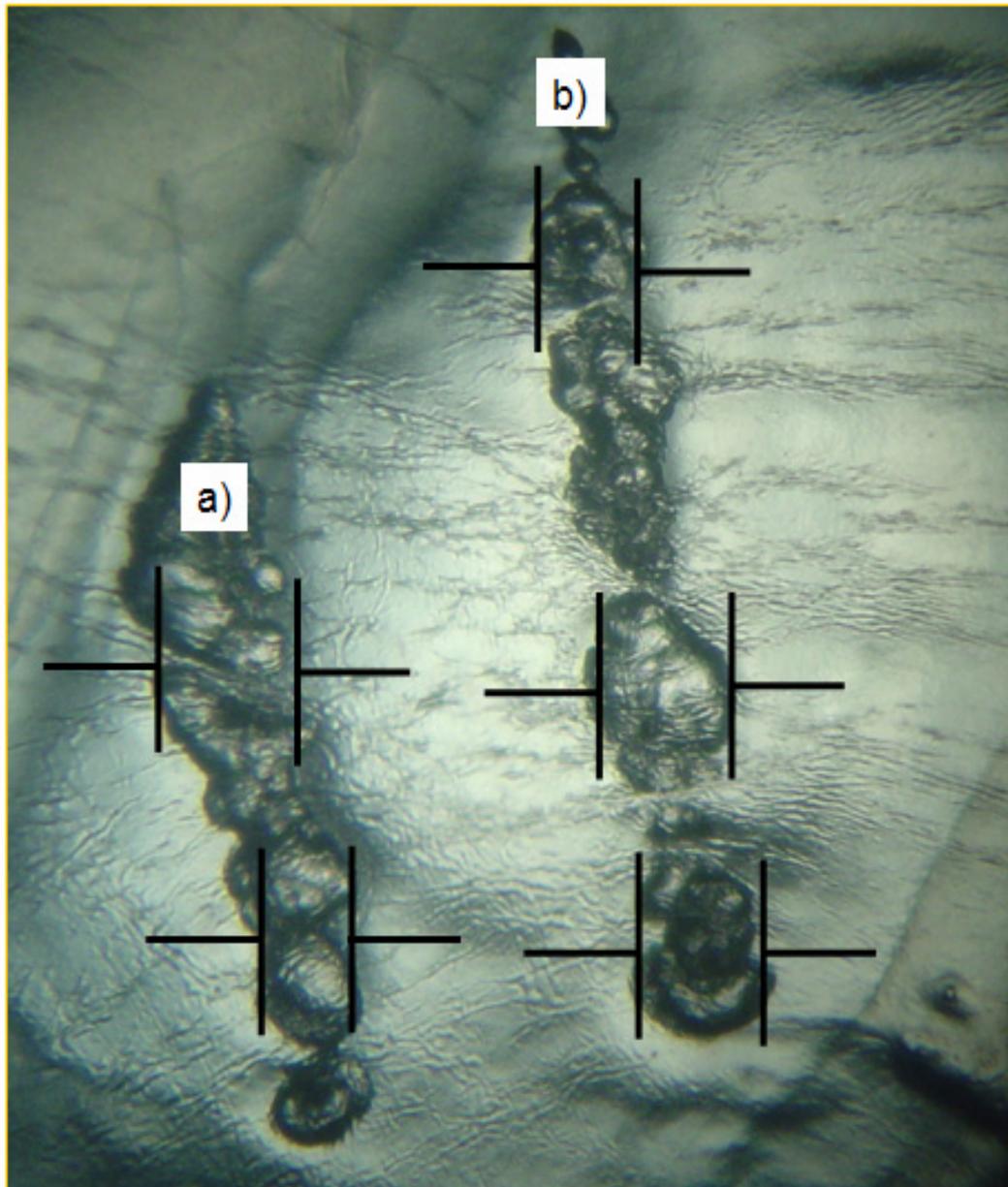


Figura 44. Burbujas generadas en tejido corneal a $400\ \mu\text{m}$ de profundidad, empleando pulsos de ns, usando una frecuencia de repetición de 15 Hz, a) Fluencia aplicada: $9.4\ F_u$, obteniendo un canal con ancho de $270\ \mu\text{m}$ (variación entre medidas del canal de $\pm 80\ \mu\text{m}$); b) Fluencia aplicada: $6.5\ F_u$, obteniendo un canal con ancho de $240\ \mu\text{m}$ (variación entre medidas del canal de $\pm 50\ \mu\text{m}$).

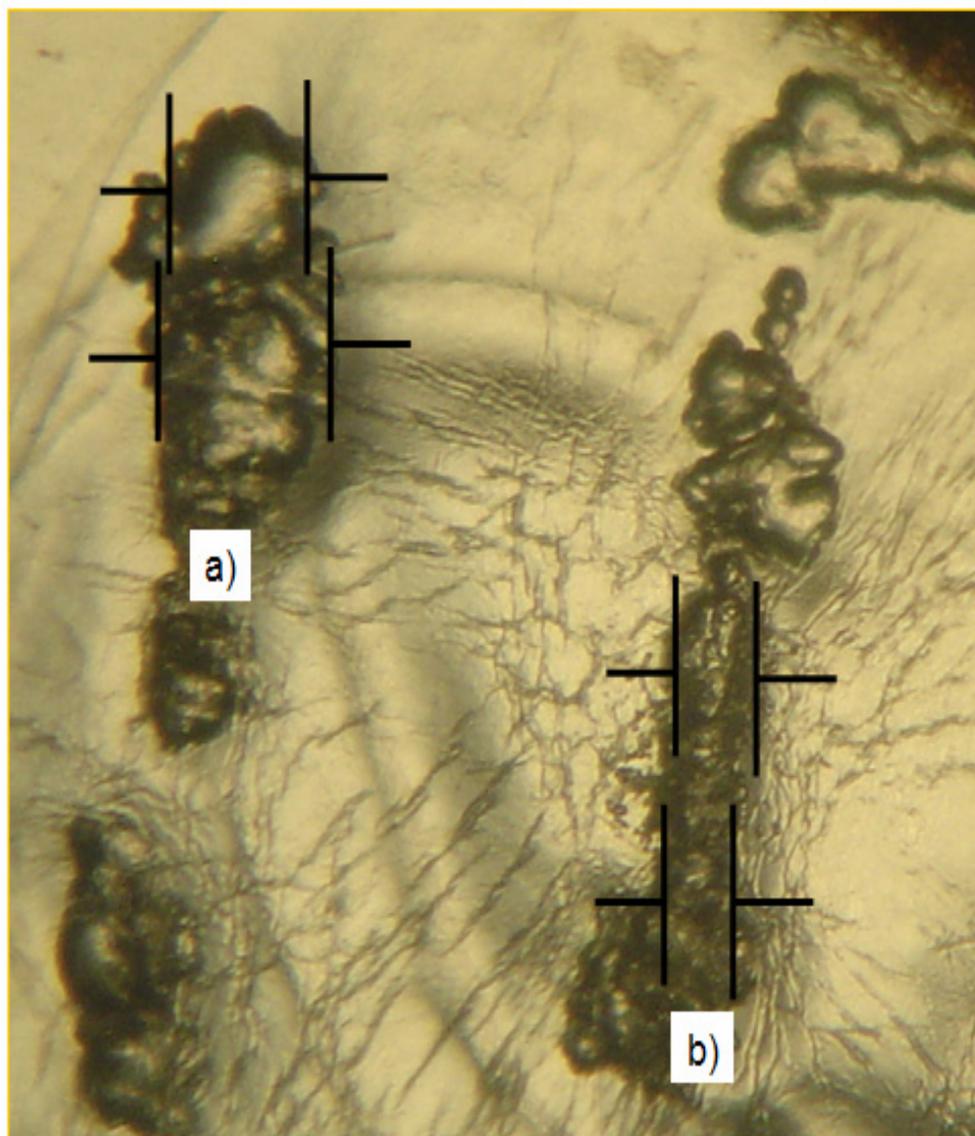


Figura 45. Burbujas generadas en tejido corneal a 400 μm de profundidad, empleando pulsos de ns, usando una frecuencia de repetición de 15 Hz . a) Fluencia aplicada: 38 F_u , obteniendo un canal con ancho de 310 μm (variación entre medidas del canal de $\pm 50 \mu\text{m}$); b) Fluencia aplicada: 18.4 F_u , obteniendo un canal con ancho de 80 μm (variación entre medidas del canal de $\pm 10 \mu\text{m}$).

Otro de los experimentos que se realizó, a una profundidad de 400 μm , fue el generar canales en una córnea sin desprenderla del globo ocular, es decir simulando la irradiación sobre un ojo en condiciones normales. Se obtuvo un

resultado interesante; una vez generados algunos canales en el estroma se mantuvo el ojo en observación por una hora y media. Se capturaron varias imágenes de la región de la córnea donde se produjeron los canales; se tomaron fotografías cada 15 minutos. Se pudo observar que algunos canales que se habían logrado trazar en el tejido, con un ancho menor a $50\ \mu\text{m}$ se colapsaron hasta cerrarse totalmente, mientras que algunos cuyo ancho es mayor a $50\ \mu\text{m}$, disminuyó notablemente el ancho pero sin llegar a cerrarse totalmente. Un efecto muy importante de destacar aquí es que durante el periodo de observación los canales que desaparecieron no dejan daño óptico visible en la córnea. Las figuras 46, 47 y 48 muestran una secuencia del colapso de los canales podemos observar tres imágenes tomadas a 1, 45, y 90 minutos después de aplicar las irradiaciones.



Figura 46. Canales de burbujas obtenidas en la córnea de un globo ocular completo capturada 1 minuto después de llevar a cabo barridos con pulsos de 5ns, a una frecuencia de repetición de 15 Hz.

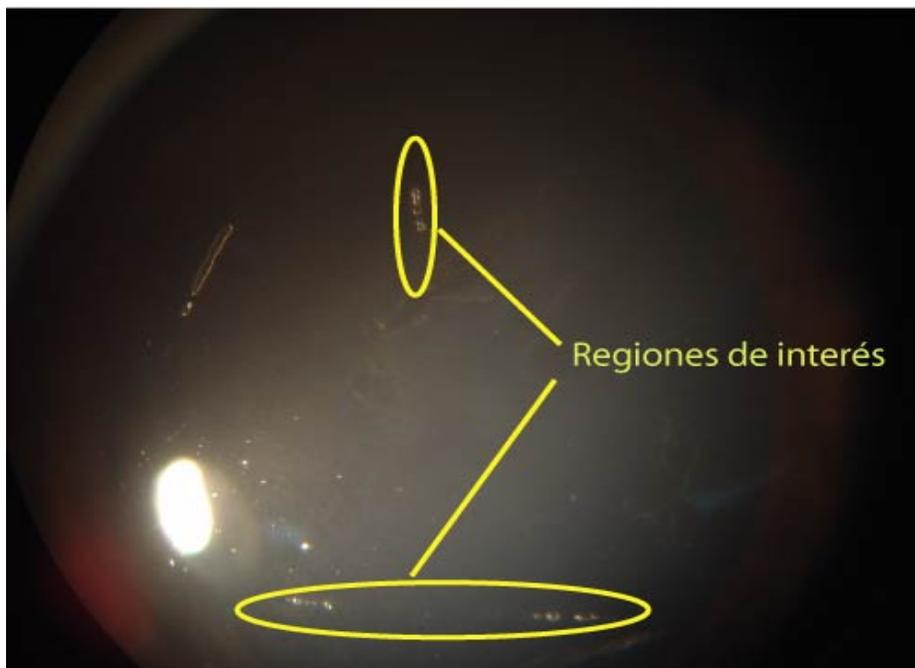


Figura 47. Canales de burbujas obtenidas en la córnea de un globo ocular completo capturado 45 minutos después de llevar a cabo los barridos.

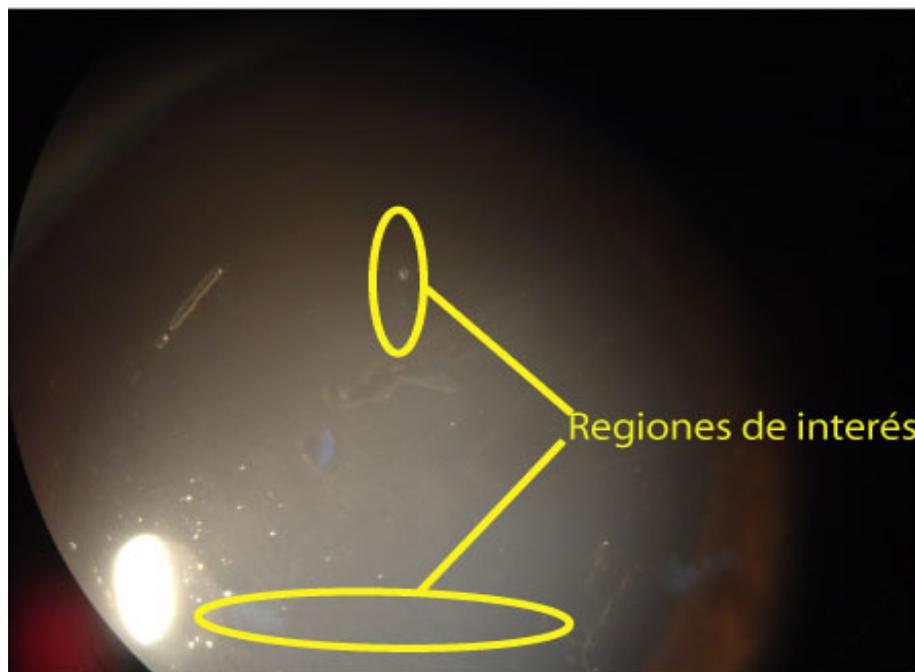


Figura 48. Canales de burbujas obtenidas en la córnea de un globo ocular completo 90 minutos después de llevar a cabo los barridos.

IV.4. Cambios de temperatura inducidos por la irradiación con pulsos láser de nanosegundos en tejido corneal

La sección que a continuación presentamos se enfoca en la adquisición de la respuesta obtenida a través de un termopar (resolución 0.5°C) el cual se inserta en el tejido corneal. Se realizaron irradiaciones con el láser de nanosegundos en el tejido a las profundidades de $100\ \mu\text{m}$ y $400\ \mu\text{m}$. A éstas dos profundidades ya conocemos el efecto de formación de burbujas y canales al aplicar distintas fluencias; es importante complementar dicha información cuantificando el cambio de temperatura que se produce como resultado de la irradiación láser. La frecuencia de repetición para el suministro de pulsos en esta serie de experimentos fue de 10 Hertz.

IV.4.1. Cambios de temperatura a $100\ \mu\text{m}$ de profundidad empleando pulsos de nanosegundos

Los resultados obtenidos en ésta sección son de gran relevancia, pues nos permite establecer los efectos del calentamiento láser de la córnea. Es importante poder determinar de qué manera influye la temperatura en los cambios físicos observados en el tejido después de la irradiación. Nos interesa saber el cambio de temperatura que se lleva a cabo cuando aplicamos una fluencia por encima de la fluencia umbral de formación de burbuja a ésta profundidad, esto nos permitirá establecer los posibles mecanismos involucrados en la formación de

burbujas. Como se muestra en los resultados siguientes la temperatura del tejido tiene una dependencia clara con la fluencia aplicada.

La metodología que se llevó a cabo para realizar este tipo de experimentos es aquella mencionada en la sección III.6.3. Se introduce un termopar en el tejido, y se lleva a cabo la irradiación en la posición seleccionada a 100 μm de profundidad. La irradiación consiste una exposición en una misma posición en el tejido por $\sim 45\text{-}55$ segundos a una fluencia por pulso fija, la frecuencia de suministro de los pulsos es de 10 Hertz, la irradiación se interrumpe a los 60 segundos de exposición; sin embargo, la adquisición de datos de temperatura se continua hasta que el tejido (se enfría) vuelve a la temperatura original (ambiente).

Los resultados obtenidos registran el cambio de la temperatura que se presenta a una distancia cercana al punto de irradiación, por lo tanto el cambio de la temperatura registrado no es el que presenta el tejido en el punto de irradiación. Este último debe inferirse usando un modelo teórico de difusión y usando los resultados aquí presentados.

La figura 49, muestra varias curvas de temperatura para diferentes valores de fluencia aplicados, los cuales están expresados en función de la fluencia umbral (F_u), en todas las mediciones la distancia entre el punto donde está colocado el termopar y el punto de irradiación es de $\sim 600 \mu\text{m}$.

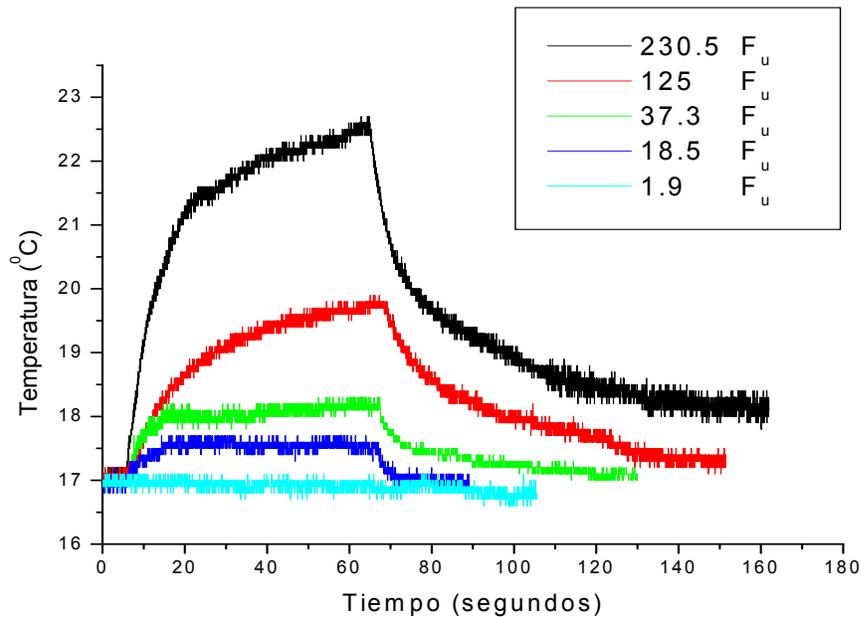


Figura 49. Cambio de temperatura registrado por el termopar en función de la fluencia aplicada, la separación entre el termopar y el punto irradiado es aproximadamente de 600 μ m. Pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.

La figura 49 muestra que para una fluencia aplicada de 1.9 kJ/cm² no existe cambio de temperatura apreciable (en el límite de resolución del termopar ~ 0.5 °C) en el tejido; sin embargo, es muy importante hacer notar que a ésta fluencia ya existe la generación de una burbuja de cavitación en el tejido corneal.

Para la figura 50, mostrada a continuación las lecturas de temperatura que se capturaron fueron llevadas a cabo para una distancia de separación entre el termopar y el punto de irradiación de $\sim 800\mu$ m.

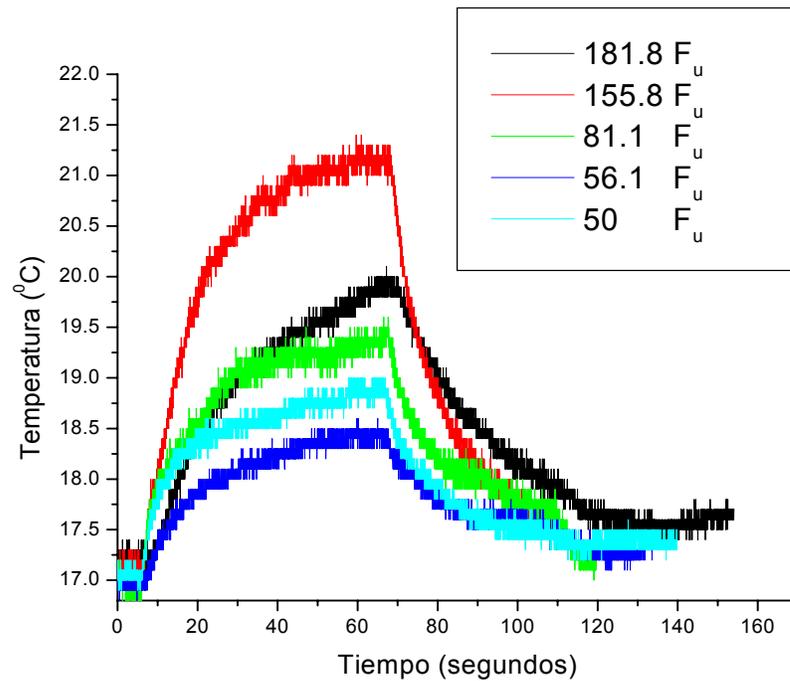


Figura 50. Lectura del cambio de temperatura registrado por el termopar a distintas fluencias. La separación entre el termopar y el punto irradiado es aproximadamente de $800\mu\text{m}$. pulsos empleando láser de 5ns , a una frecuencia de repetición de 10 Hz .

IV.4.2. Cambios de temperatura a $400\mu\text{m}$ de profundidad empleando pulsos de nanosegundos

Los resultados obtenidos en este caso son similares a los obtenidos para el caso de irradiaciones aplicadas a $100\mu\text{m}$ de profundidad.

La figura 51 muestra distintas curvas aplicando diferentes fluencias en unidades de fluencia umbral (F_u), las mediciones fueron llevadas a cabo a una distancia de separación entre el termopar y el punto de irradiación de $\sim 550\mu\text{m}$.

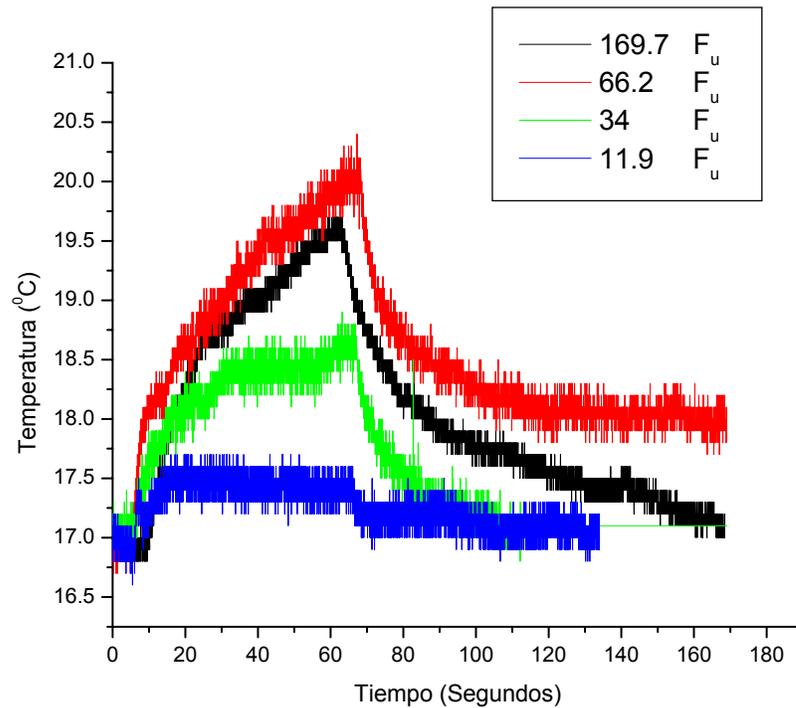


Figura 51. Cambio de temperatura registrado por el termopar a distintas fluencias, la separación entre el termopar y el punto irradiado es de aproximadamente $550\mu\text{m}$. pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.

Otro de los experimentos que se llevó a cabo a la profundidad de $400\mu\text{m}$ fue el irradiar el tejido corneal en un punto fijo iniciando con una fluencia por pulso muy grande ($52 \text{ kJ/cm}^2 = 54 F_u$), posteriormente cada 25 segundos se fue disminuyendo paulatinamente el valor de la fluencia hasta llegar a una fluencia un poco por debajo de la F_u ($0.57 \text{ kJ/cm}^2 = 0.6 F_u$). Las fluencias aplicadas en cada periodo de 25 segundos fueron: $54 F_u$, $44 F_u$, $34 F_u$, $22 F_u$, $14 F_u$, $4 F_u$, $2 F_u$, $1.2 F_u$, $0.6 F_u$, dando como resultado la curva de temperatura mostrada en la figura 51.

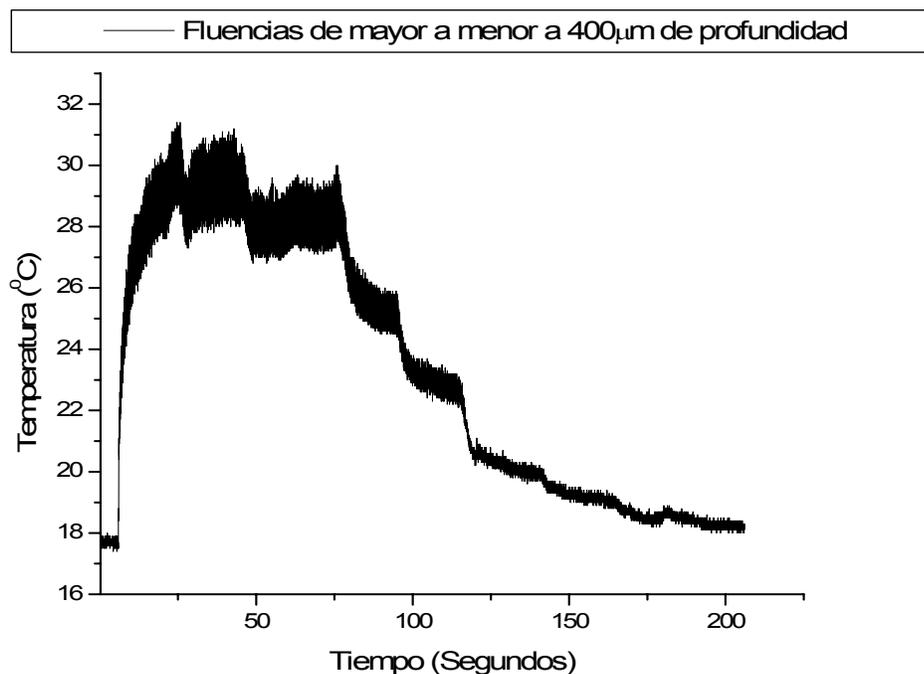


Figura 52. Irradiaciones aplicadas a 400 μm de profundidad, la distancia entre el termopar y el punto irradiado $\sim 500 \mu\text{m}$. pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.

En la figura 53 se observa el comportamiento de la temperatura del tejido que se presenta al realizar el proceso inverso al descrito en la figura 52, en éste caso se comenzó a irradiar con fluencias por pulso pequeñas ($3.8 \text{ kJ/cm}^2 = 4 F_u$) y se fue aumentando la fluencia igualmente cada 25 segundos aproximadamente, hasta alcanzar un valor de $50 F_u$, las fluencias aplicadas para cada periodo de tiempo fueron: $4 F_u$, $9 F_u$, $14 F_u$, $18 F_u$, $24 F_u$, $28 F_u$, $34 F_u$, $38 F_u$, $42 F_u$, $46 F_u$, $50 F_u$.

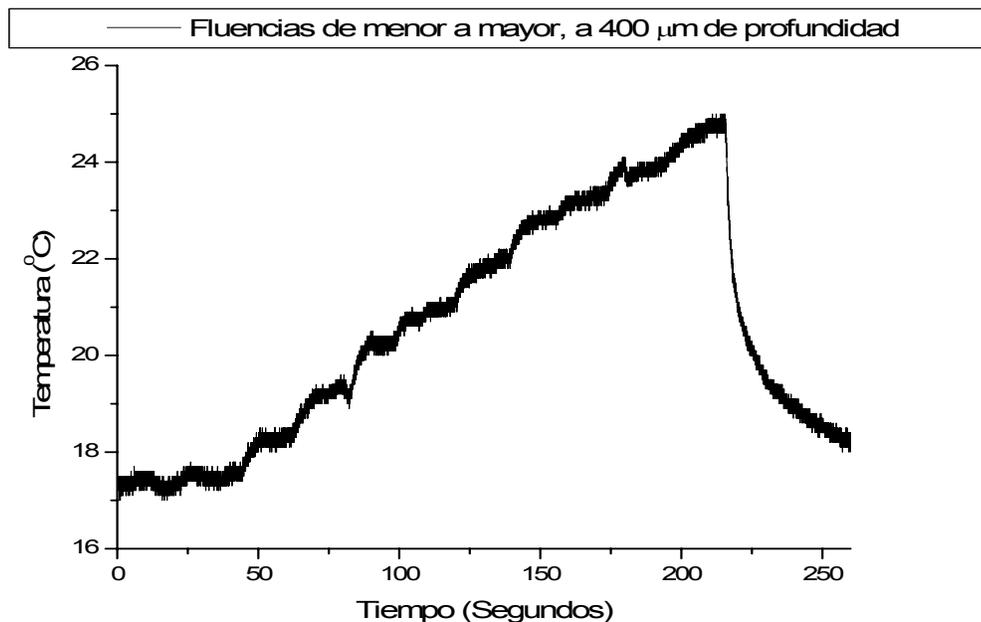


Figura 53. Irradiaciones aplicadas a 400 μm de profundidad, la distancia entre el termopar y el punto irradiado $\sim 500 \mu\text{m}$. Pulsos láser de 5ns, a una frecuencia de repetición de 10 Hz.

IV.5. Generación de burbujas de cavitación en tejido corneal porcino con un láser de pulsos de femtosegundos

La información sobre formación de burbujas que obtuvimos aplicando irradiaciones en la córnea empleando un láser de Ti:Zafiro (fs), es de carácter preliminar, pero nos permite poder comparar estos resultados con aquellos obtenidos aplicando pulsos de ns.

Para la medición de la burbuja se empleó la misma metodología descrita a detalle en la sección III. 7.

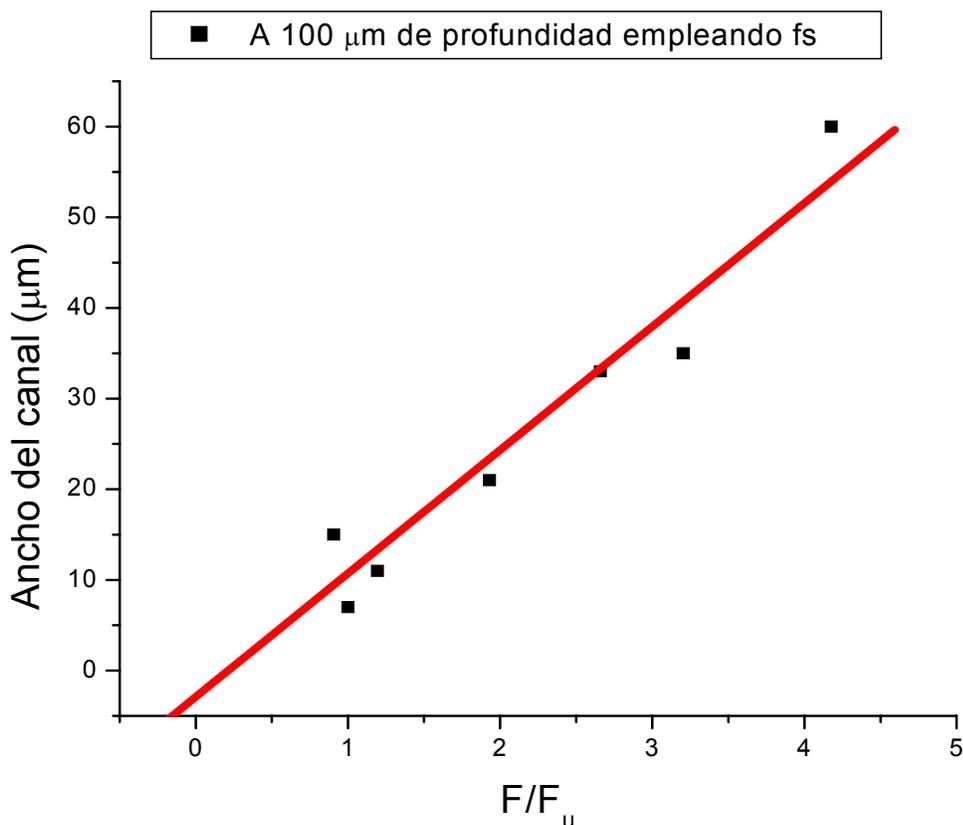


Figura 54. Tamaño de las burbujas como función de la fluencia aplicada empleando fs

La fluencia umbral (F_u) para la formación de una burbuja permanente, fue de: F_u (100 μm de profundidad empleando fs) = 44 J/cm^2 .

En el caso en el que se usa la fluencia F_u por pulso y se realiza un barrido con una velocidad de 250 $\mu\text{m}/\text{segundos}$ a una frecuencia de repetición de 10 Hz., se presenta la formación de un canal de burbujas de ancho aproximado de 7 μm ., los canales formados en el tejido se presentan en la figura 55.

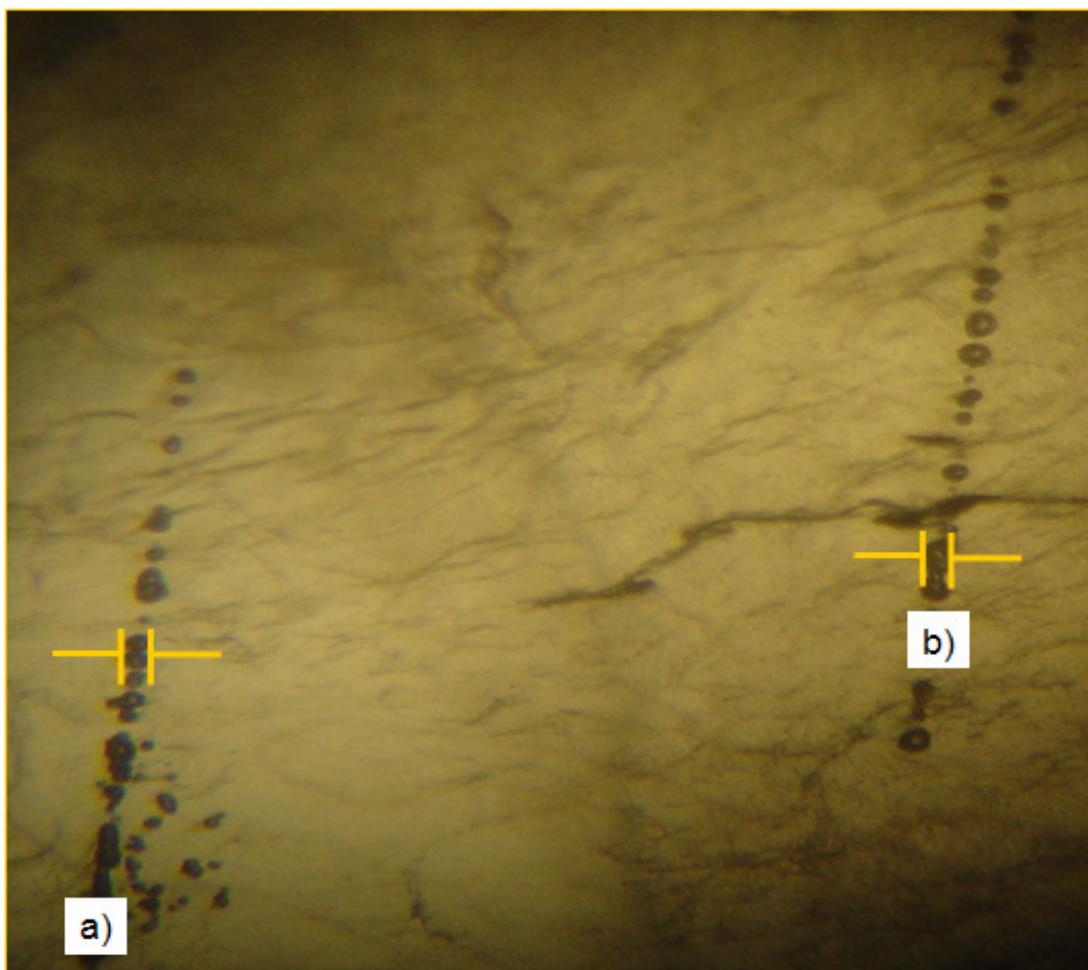


Figura 55. Canales de burbujas generadas a 100 μm de profundidad, empleando pulsos de fs, a) Fluencia aplicada: $2.8 F_u$, obteniendo un canal con ancho de 33 μm , b) Fluencia aplicada: $2 F_u$, obteniendo un canal con ancho de 21 μm .

Al realizar los experimentos empleando el láser de femtosegundos (Ti:Zafiro) nos pudimos percatar de un fenómeno importante, al aplicar éste tipo de pulsos láser podemos generar canales de burbujas con dimensiones significativamente más pequeñas que los generados por el láser de Nd:YAG (ns).

Es importante mencionar un efecto importante que se presenta al generar las burbujas sobre el tejido, si entre dos burbujas vecinas existe una distancia de separación de unos cuantos micrómetros las burbujas tienden a migrar aproximándose una a otra con una alta probabilidad de coalescencia entre dichas burbujas y de esta manera es posible generar un canal continuo mediante la coalescencia de un número grande de burbujas formadas consecutivamente.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

V.1. Introducción

En éste penúltimo capítulo nos enfocaremos en la discusión de los resultados obtenidos en los experimentos al irradiar el tejido corneal a dos distintas profundidades (100 μm y 400 μm) tanto para el caso de pulsos de nanosegundos como el caso de femtosegundos. La discusión de resultados se centrará en el análisis los canales generados a distintas profundidades empleando los dos tipos de láseres. También se llevará a cabo una discusión del efecto de temperatura que se registra en el tejido al ser expuesto a la irradiación láser.

V.2. Análisis de los canales generados en el tejido corneal.

Los resultados experimentales presentados en el capítulo anterior nos permiten elaborar un análisis en términos de la formación de burbujas y/o canales

en el tejido bajo dos escenarios de interés práctico. Esto es, en el terreno de las *aplicaciones oftálmicas* es importante conocer con exactitud las dimensiones de las burbujas y/o canales, además de la *fluencia láser* necesaria para obtener burbujas o canales con determinadas características.

En la siguiente tabla se muestran los casos experimentales que se llevaron a cabo con el fin de conocer y comprender con mayor detalle los efectos que se producen dentro del tejido al ser irradiado con un láser de pulsos cortos.

Tabla IV. Experimentos realizados para el estudio de las burbujas de cavitación.

EXPERIMENTOS REALIZADOS		
Duración del pulso del láser empleado	Profundidad de irradiación (μm)	Características estudiadas
5 ns	100	F_u , Ancho del canal (μm) como función de la fluencia aplicada
5 ns	100	F_u
5 ns	400	F_u^C , Ancho del canal (μm) como función de la fluencia aplicada
80 fs	100	F_u , Ancho del canal (μm) como función de la fluencia aplicada

Iniciamos nuestro análisis con la discusión de los experimentos realizados empleando el láser de nanosegundos, para irradiaciones a 100 μm y a 400 μm de profundidad. Como se muestra en la figura 5, cuando realizamos irradiaciones a estas profundidades estamos trabajando dentro de la capa de la córnea llamada estroma; como comentamos en el capítulo II, el estroma se divide a su vez en dos

capas conocidas como estroma anterior y estroma posterior, la estructura del tejido estromal está constituido a base de fibrillas de colágeno. Es importante hacer notar que el acomodamiento que presentan dichas fibrillas es distinto para cada subdivisión del estroma; ya que en el estroma anterior se presenta un acomodamiento aleatorio de fibrillas, lo cual nos lleva a considerar a esta capa como un material *amorfo*, es decir carece de un ordenamiento periódico; *isotrópico*, debido a que el acomodamiento de sus fibrillas es aleatorio en todas las direcciones y *homogéneo*, ya que el ordenamiento aleatorio de las fibrillas se da en cualquier posición dentro de la capa. La capa del estroma posterior cuenta con la propiedad de poseer un acomodamiento laminar puesto que las fibrillas presentan una superposición paralela entre sí, esto le confiere a esta capa las propiedades de un material "*cristalino*"; *anisotrópico*, ya que la geometría y acomodamiento de las fibrillas es diferente en uno y otro sentido dentro de la misma capa debido al acomodamiento que presentan las fibras de colágeno; y *homogéneo*, ya que en la propia capa cuenta con las mismas propiedades en cualquier posición; es importante mencionar que el ensamble entre una capa paralela a otra, vistas de manera transversal presenta un entrelazamiento cruzado a una cierta inclinación.

Las propiedades estructurales con las que cuenta cada una de las capas del estroma producen que la respuesta física sea distinta al irradiar cada una de dichas capas del tejido estromal. El tejido estromal anterior cuenta con la propiedad de ser un material estructuralmente isotrópico, lo cual genera que al irradiar, la expansión de la burbuja sea muy similar en todas las direcciones, y por

lo tanto sea posible la generación de un canal (de burbujas) con ancho constante a lo largo de todo el barrido. Para el caso donde se irradia el tejido estromal posterior el proceso que se lleva a cabo es distinto, debido a las propiedades de anisotropía estructural, por lo que la expansión de burbujas dentro de dicha capa tiende a producirse también anisotropicamente, y por lo tanto, los canales generados producto de la coalescencia de las burbujas adquieran un ancho no uniforme a lo largo del barrido. En la siguiente tabla se presentan algunos parámetros importantes que se obtuvieron al realizar las irradiaciones de la córnea con el láser de nanosegundos.

Tabla V. Comparación de valores obtenidos para irradiaciones aplicadas a 100µm y 400µm, empleando el láser de ns.

	Valores para irradiación aplicada a 100 µm	Valores para irradiación aplicada a 400 µm
Fluencia Umbral de formación de burbuja	0.30 kJ/cm ²	0.96 kJ/cm ²
Tamaño de burbuja a fluencia umbral	20 µm	30 µm
Fluencia umbral de daño permanente	25 kJ/cm ²	no se presenta
Fluencia Máxima que se aplicó	25 kJ/cm ²	176 kJ/cm ²
Tamaño de burbuja a fluencia máxima que se aplicó	300 µm	900 µm
Frecuencia de suministro de los pulsos	3 Hz	15 Hz

De los parámetros presentados en la tabla V podemos observar que al realizar irradiaciones en ambas profundidades la dimensión de la burbuja

generada a la fluencia umbral de formación de burbuja es muy similar, sin embargo la fluencia aplicada en ambos casos es distinta. Para poder generar burbujas a la profundidad de 400 μm se requiere aplicar aproximadamente tres veces la fluencia aplicada para el caso de la generación de burbujas a 100 μm de profundidad. Otra de las observaciones que es importante hacer notar es que en las irradiaciones aplicadas a 100 μm de profundidad se presenta el fenómeno de rompimiento de tejido a fluencias altas, el cual no se observa para el caso a 400 μm incluso a fluencias muy altas. El ancho máximo del canal que se pudo obtener al irradiar a 400 μm tiene un diámetro tres veces mayor que el generado a 100 μm de profundidad; es importante destacar que la fluencia máxima aplicada a 400 μm de profundidad fue de 176 kJ/cm^2 , fluencia a la cual cabe esperar una producción significativa de calor que se presentaría justo en el punto de irradiación.

Como se mencionó en el capítulo II, la córnea tiene un espesor de entre 550 y 600 μm y nosotros medimos anchos de canal o burbujas de hasta 900 μm , una de las suposiciones que se considera viable es que al realizar irradiaciones a 400 μm dado que estamos dentro del estroma posterior, y debido a la estructura propia que el tejido presenta, de laminillas superpuestas de forma paralela, al realizar las irradiaciones en dicha capa las burbujas inducidas por los pulsos láser tienden a expandirse paralelas a la fibrillas. Esto genera canales de sección transversal alargada.

Como se mencionó en la sección II.2. El uso de láseres de pulsos ultracortos, especialmente en el régimen de femtosegundos representa una novedosa manera de llevar a cabo procesamiento de materiales. Por lo tanto,

además de las irradiaciones con el láser de nanosegundos realizamos irradiaciones a 100 μm usando un láser de 80 fs (Ti: Zafiro, 800nm)

La comparación de los resultados obtenidos empleando estos dos láseres es importante.

Si observamos la figura 33, se presenta el coeficiente de absorción en el tejido corneal para las dos longitudes de onda que se emplearon, las cuales fueron 532 nm para el láser con duración del pulso de 5n, y 800 nm para el láser con duración de pulso de 80fs.

Para el caso de la longitud de onda de 532 nm el coeficiente de absorción es de $\alpha = 5.13 \text{ cm}^{-1}$; por su parte al trabajar con la longitud de onda de 800 nm el tejido corneal presenta un coeficiente de absorción ligeramente menor de $\alpha = 3.61 \text{ cm}^{-1}$. El conocer la magnitud del coeficiente de absorción lineal que presenta el tejido a las dos longitudes de onda con las que se trabajó, ayudó en la comprensión de los fenómenos físicos que se observan en el tejido al generarse las burbujas inducidas por el láser.

La energía absorbida por el tejido se transforma en calor, y puede dar lugar a cambios en la constitución de la estructura del material como: vaporización rápida de los componentes del tejido y así generar burbujas.

Es importante mencionar que el valor de la fluencia umbral para la formación de las burbujas (F_u) en el tejido aplicando pulsos de nanosegundos, fue *siete veces mayor* al valor registrado de F_u aplicando pulsos de femtosegundos.

La tabla VI muestra algunos resultados experimentales obtenidos empleando ambos tipos de láseres. En los resultados mostrados podemos

comparar algunos aspectos de las burbujas que fueron generadas a la misma profundidad solamente aplicando pulsos de nanosegundos ó de femtosegundos. Podemos observar que para generar una burbuja con diámetros muy similares, la fluencia que se requirió para producir la burbuja empleando un pulso de 5 ns fue notablemente mayor a la requerida empleando un pulso de 80 fs.

Tabla VI. Comparación de fluencias similares aplicadas a 100µm de profundidad para obtener canales de ancho similar empleando dos láseres distintos (ns, fs).

Ancho del canal: 56 ± 4 µm	
Fluencia aplicada empleando láser de 5 ns	Fluencia aplicada empleando láser de 80 fs
<i>8.46 kJ/cm²</i>	<i>150 J/cm²</i>
Ancho del canal: 35 ± 3 µm	
Fluencia aplicada empleando láser de 5 ns	Fluencia aplicada empleando láser de 80 fs
<i>1.07 kJ/cm²</i>	<i>116 J/cm²</i>
Ancho del canal : 20 ± 5 µm	
Fluencia aplicada empleando láser de 5 ns	Fluencia aplicada empleando láser de 80 fs
<i>0.30 kJ/cm²</i>	<i>75 J/cm²</i>

Con la finalidad de comprender mejor el comportamiento que se presenta al emplear uno u otro láser, se graficaron los datos mostrados en la tabla 6, donde presentamos la formación de canales con dimensiones de anchura similares, pero empleando en un caso pulsos de nanosegundos y en otro caso pulsos de femtosegundos; en la figura 56 podemos observar el comportamiento que se presenta en ambos casos (ns, y fs). Mientras que al aplicar pulsos de nanosegundos se requirió un suministro de fluencia que crece exponencialmente

para generar canales con dimensiones cada vez más grandes, al aplicar pulsos de femtosegundos para obtener canales con dimensiones similares, la variación en la cantidad de fluencia suministrada crece linealmente con una pendiente muy pequeña. Esto tiene la implicación directa de que la producción de calor, durante la formación de un canal en el estroma, será mucho menor si se utiliza para tal propósito pulsos de femtosegundos.

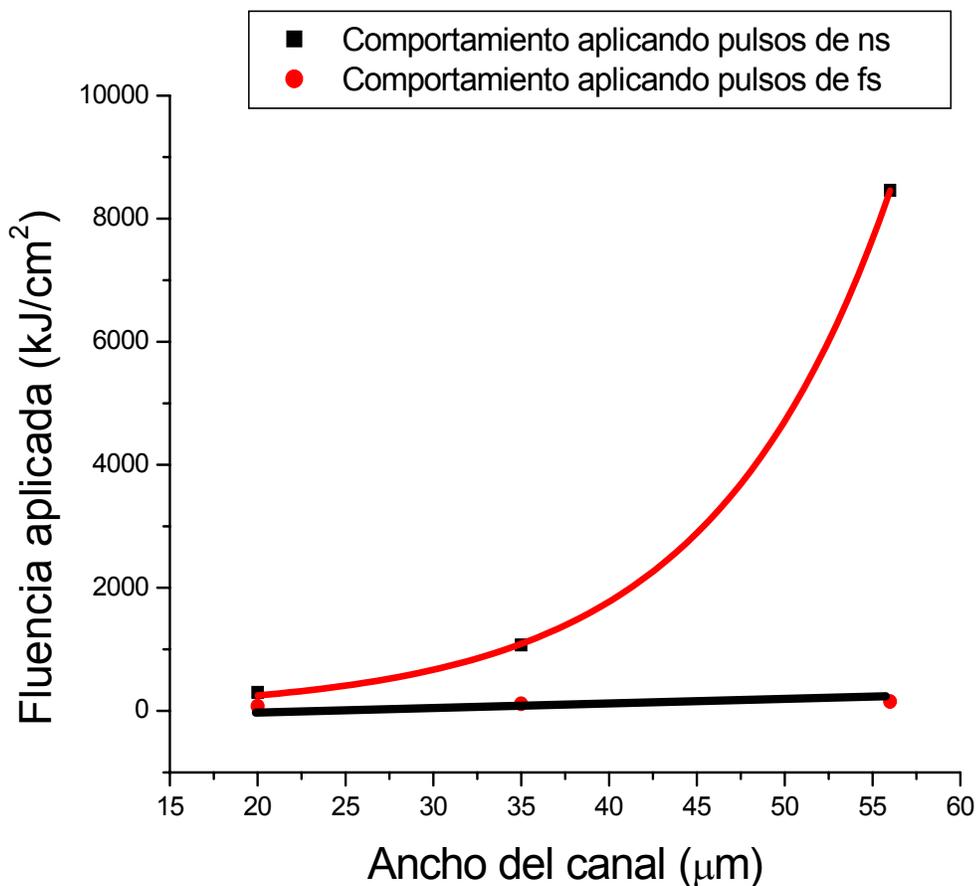


Figura 56. Requerimientos de fluencia para formar canales con dimensiones similares usando pulsos de ns y fs.

Los resultados que se obtuvieron experimentalmente en nuestra experimentación pudieron ser parcialmente comparados con los publicados por: [Juhasz T., *et al.*, 2002], en dicha comparación se puede observar en la tabla VII. La información proporcionada por el artículo no cuenta con datos acerca de la profundidad a la cual se realiza la irradiación, la dimensión de la cintura del haz y la situación en la que se encontraba el tejido (ya sea desprendido del globo ocular o sobre el globo ocular), por tal motivo la comparación de información no es discutida a detalle; sin embargo es importante notar que los valores obtenidos en nuestra investigación no se alejan excesivamente por los obtenidos en investigaciones avanzadas en esta área.

Tabla VII. Comparación de valores publicados y los obtenidos en nuestra investigación.

Datos publicados por Juhasz Tibor, et al. 2002		
Duración del pulso	Fluencia umbral (J/cm ²)	Diámetro de la burbuja
10 ns	185	300-1200
150fs	1.5	3-15
Datos obtenidos en nuestra experimentación		
Duración del pulso	Fluencia umbral (J/cm ²)	Diámetro de la burbuja
5ns	308 (a 100 de prof.)	20
5 ns	960 (a 400 de prof.)	30
80 fs	44 (a 100 de prof.)	7

V.3. Cambio de temperatura aplicando pulsos láser de ns a dos distintas profundidades (100 μm , 400 μm).

Cuando se aplica irradiación láser a un tejido biológico debemos procurar la máxima atención a éste, con la finalidad de producirle la menor invasión posible. Por este motivo cobra gran relevancia una adecuada caracterización del cambio de temperatura que sufre el tejido al ser irradiado con una cierta cantidad de energía láser. En el capítulo anterior se presentaron las mediciones de temperatura que se efectuaron durante la irradiación del tejido con el láser de ns a las profundidades de 100 μm y 400 μm .

En los experimentos, el capturar directamente la medición del cambio de temperatura en el punto exacto de irradiación no es factible, por lo cual se realizó la medición de temperatura en una zona en la vecindad del punto de irradiación.

Las trazas que se muestran en la figura 57 muestran el comportamiento que presenta el tejido cuando se irradia a dos distintas profundidades (100 μm y 400 μm). Se registro en ambos casos el cambio de temperatura que se genera en el tejido aplicando una fluencia mayor que la fluencia umbral de formación de burbuja, para la irradiación a 100 μm de profundidad se aplicó una fluencia de 3.3 F_u y para 400 μm se aplicó una fluencia de 4.4 F_u . En ambos casos observamos que el cambio de temperatura que se produce en el tejido a 550 μm del punto de irradiación es despreciable. Es importante destacar que aplicando esta cantidad

de fluencia sobre el tejido siempre ocurre la formación de una burbuja, como ya se mencionó estamos usando $F > F_u$.

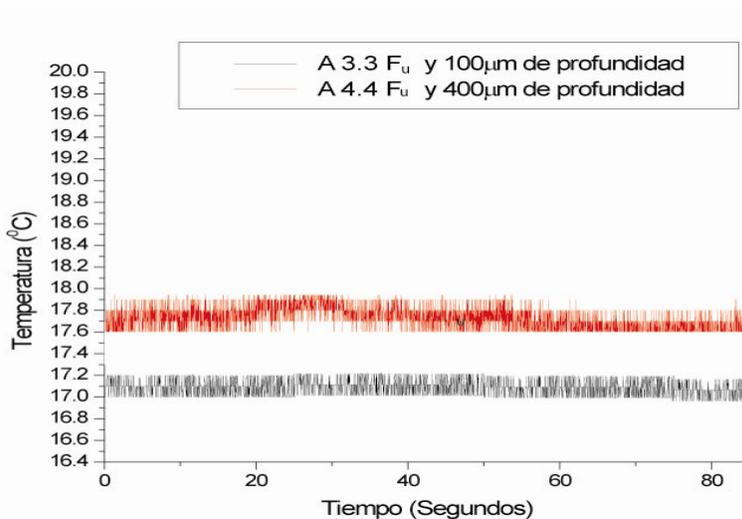


Figura 57. Comparación del cambio de temperatura a dos distintas profundidades.

Es importante mencionar que las trazas de los resultados acerca de experimentos donde se observó el comportamiento térmico colocando un termopar a $\sim 550 \mu\text{m}$ de distancia entre el punto de irradiación y la ubicación del termopar e irradiando el tejido con distintas fluencias, mostradas en las figuras 49 y 51 revelan que el cambio de temperatura que se presenta sobre una zona vecina ($\sim 550 \mu\text{m}$) al punto de irradiación no presenta un cambio de temperatura capaz de alterar la composición natural de las células contenidas sobre el tejido.

Otro resultado experimental interesante que se obtuvo fue el mostrado en la sección IV.4.2. (Figura 52 y 53). En ambos casos las condiciones con las que se llevó a cabo el experimento fueron las mismas, excepto la manera en la cual se efectuó la irradiación.

En un caso la córnea se irradió aplicando inicialmente una fluencia grande para posteriormente ir disminuyendo la fluencia por pasos, hasta finalizar con una fluencia muy pequeña (figura 52). Podemos observar que en los primeros tres segmentos ($F_1 > F_2 > F_3$) la temperatura siempre crece acumulándose el efecto de cada pulso aplicado. Sin embargo para las fluencias ($F_4 > F_5 > F_6 > F_7 > F_8 > F_9$) la temperatura promedio siempre es decreciente, e incluso se observa un cambio en el ritmo de decremento de la temperatura promedio entre los segmentos que comprenden las fluencias F_4 , a F_6 y el segmento de fluencias de F_7 y F_{10} (figura 58). Dichos segmentos fueron marcados dichos segmentos fueron marcados con una línea continua para apreciar mejor el efecto.

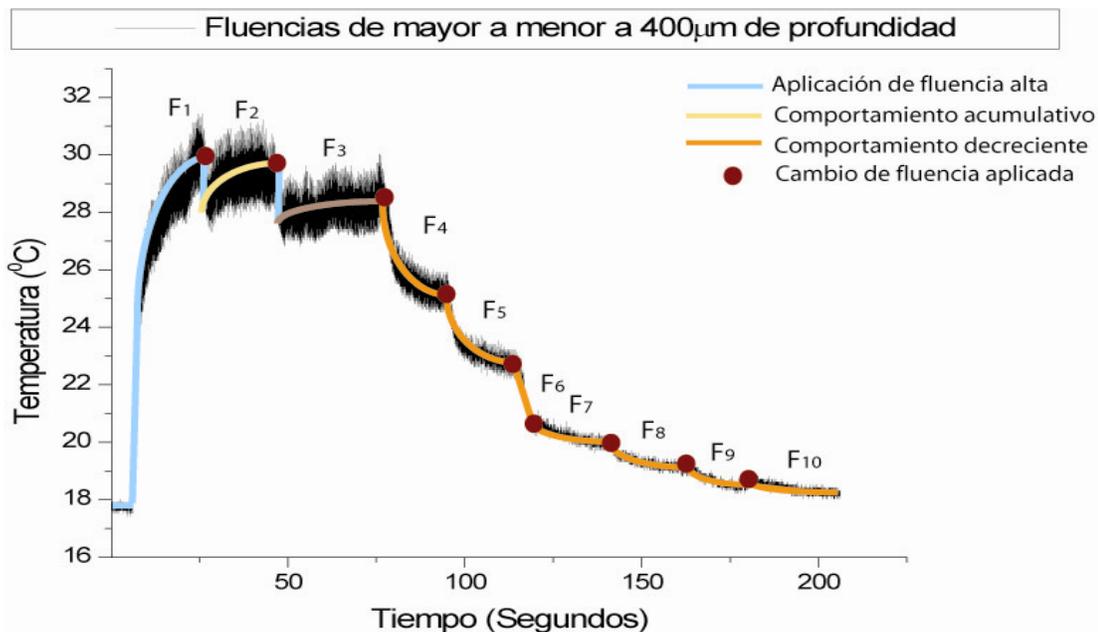


Figura 58. Temperatura promedio del tejido para irradiación por pasos, de fluencias altas a fluencias bajas.

En otro caso se irradió a la misma profundidad pero aplicando la fluencia de manera inversa al caso mostrado en la figura 58, es decir, se comenzó irradiando el tejido corneal con valores de fluencia bajos y posteriormente aumentamos paulatinamente el valor de la fluencia; en este caso se registra el comportamiento presentado en la figura 59. Es claro que aquí la temperatura promedio a lo largo de todo el periodo de irradiación es siempre creciente. Una vez concluida la irradiación se observa como el tejido comienza a enfriarse.

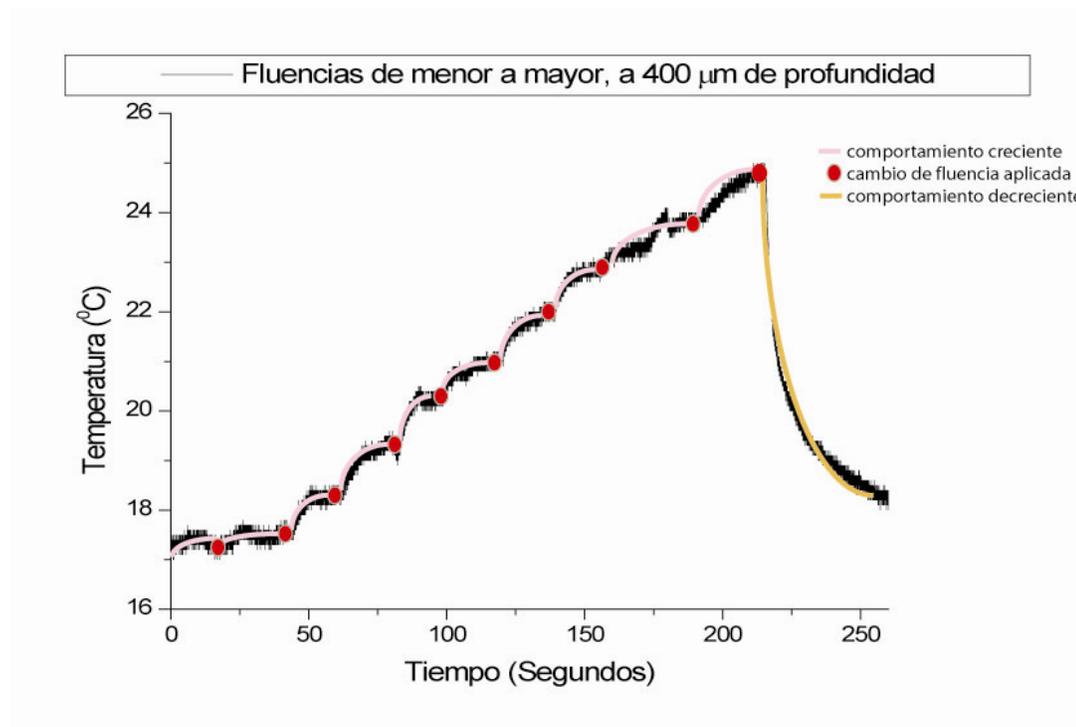


Figura 59. Temperatura promedio del tejido para irradiación por pasos de fluencia bajas a fluencias altas.

Debido a que el comportamiento de temperatura registrado sobre el tejido al irradiarlo con los dos métodos mencionados anteriormente es distinto para cada caso es importante discutirlo a detalle. En la figura 58 observamos que se inició el

proceso aplicando una fluencia muy grande (por lo tanto generando una burbuja de diámetro aproximado de 400 μm); debido a que la irradiación posterior aplicando menor fluencia incide en una zona donde ya se produjo una burbuja, el coeficiente de absorción que la luz experimenta ya no es el mismo que se presentaba en los primeros pulsos de la irradiación, sino presumiblemente menor. El comportamiento que caracteriza la curva de calentamiento en el tejido puede ser consecuencia del cambio en el coeficiente de absorción. Es importante hacer notar que después de los primeros tres periodos de irradiación, el tejido libera más calor que el producido por cada pulso aplicado, provocando un decremento en la curva del comportamiento térmico, dicho comportamiento no se presenta en la curva al irradiar el tejido comenzando con una fluencia baja y posteriormente aumentando ésta (figura 59), en dicho proceso el comportamiento creciente en la temperatura es igual en todos los segmentos ante el aumento de fluencia. Esto muy probablemente es debido a que se comienza generando una burbuja muy pequeña, que posteriormente va aumentando paulatinamente de tamaño, así el coeficiente de absorción del tejido que el pulso aplicado “ve” no disminuye abruptamente, manteniéndose una producción de calor por encima de la cantidad de calor disipado en el tejido.

En la revisión bibliográfica encontramos que [Savas, 2002] propone una expresión para el cambio de temperatura ΔT , en la cual supone que el pulso láser suministra energía térmica al material. Dicha expresión para ΔT es aplicable cuando se trabaja con pulsos con duración del orden de ns a fs; considerando las propiedades térmicas del propio material y las características del pulso se puede

calcular teóricamente el cambio de temperatura inducido por pulsos (temperatura pico) que se registra a la profundidad exacta donde se realiza la irradiación y por lo tanto en la posición donde se genera la burbuja. De acuerdo a Savas el cambio de temperatura inducido por un pulso a cierta profundidad en el tejido está dado por la ecuación 31 (ver sección III.6.3.).

Al sustituir en la ecuación 31 los valores de ρ_c , α , y C del tejido corneal así como los valores de la fluencia y profundidad empleados en nuestros experimentos, obtenemos los valores para ΔT asociados a nuestros experimentos de acuerdo al modelo de Savas. El tejido inicialmente tiene una temperatura de 17°C y empleando la ecuación 31 obtenemos la temperatura pico (teórica) que se presenta en el tejido. Así para una fluencia aplicable $F=F_u$ tendremos los resultados mostrados en la tabla siguiente.

Tabla VIII. Valores teóricos de la temperatura que adquiere el tejido en el punto de irradiación.

VALORES TEÓRICOS DE LA TEMPERATURA PICO QUE PRESENTA EL TEJIDO EN EL PUNTO DE IRRADIACIÓN			
Duración del pulso láser empleado	Profundidad de irradiación (μm)	fluencia aplicada	temperatura pico en el punto irradiado ($^\circ\text{C}$)
5 ns	100	F_u (100 μm de profundidad empleando ns)	402
5 ns	400	F_u (400 μm de profundidad empleando ns)	1046
80 fs	100	F_u (100 μm de profundidad empleando fs)	58

En la tabla anterior se puede observar un notorio cambio en la temperatura que se registra teóricamente justo en el punto de irradiación al aplicar un pulso de nanosegundos ó un pulso de femtosegundos. Mientras que para los pulsos de nanosegundos se presenta un cambio de temperatura grande, el cual es capaz de generar daños irreversibles al tejido, al aplicar pulsos de femtosegundos el cambio de temperatura es significativamente menor, el cual no es capaz de generar sobre el tejido un fenómeno de daño irreversible. La duración del pulso es un parámetro de gran relevancia en el análisis; aplicando irradiaciones a la fluencia F_u empleando pulsos de femtosegundos no observamos un cambio de temperatura muy significativo, sin embargo, a este valor de fluencia ya observamos la presencia de una burbuja en el tejido, esto nos lleva a un escenario donde los efectos de intensidad de pulso, es decir, efectos ópticos no lineales cobran relevancia en el proceso de formación de burbujas en el tejido. Por ejemplo, la absorción multifotón puede dar origen a un proceso de ionización del material en la cintura del haz, produciendo una interacción donde se experimenta una rápida expansión del material ionizado liberando energía en forma de ondas de sonido (supersónicas seguidas de una onda de choque) y generando cantidades reducidas de calor disipado, esto último debido a la velocidad de la interacción [Voguel A. *et al.*, 2005; Oraevsky A. *et al.*, 1996].

VI. CONCLUSIONES

Logramos establecer una metodología adecuada para el estudio de algunos fenómenos físicos, que resultan de la interacción de pulsos láser de nanosegundos y femtosegundos con tejido corneal. Los resultados obtenidos nos permiten sugerir potenciales aplicaciones novedosas de estos láseres en la práctica de cirugías refractivas, es decir, en el área médica que comprende la oftalmología.

Pudimos demostrar que es factible la formación de burbujas y canales en el tejido corneal, al ser irradiado a dos distintas profundidades, las cuales fueron de 100 μm y 400 μm . Debido a que a dichas profundidades el tejido cuenta con propiedades distintas, identificamos algunas diferencias en la formación de burbujas tanto para una profundidad muy cercana a la superficie frontal (100 μm), como para el caso en el que el haz es introducido a una profundidad mayor con respecto a la superficie (400 μm).

Caracterizamos dos efectos distintos que se presentan al irradiar el tejido corneal con el láser, la formación de burbujas y el comportamiento térmico. Ambos se presentan en el material biológico al ser sometido a irradiación láser. Demostramos características distintivas de formación de burbuja y calentamiento láser para cada uno de los láseres empleados, pues los mecanismos de interacción que se presentan en cada caso son distintos.

Identificamos que las burbujas tienen una dependencia directa con respecto a la cantidad de fluencia aplicada sobre el tejido, en todos los casos experimentales que se realizaron dentro de este trabajo, se observó que a mayor fluencia, mayor es el tamaño de la burbuja generada. Observamos que al realizar la irradiación láser en forma de barridos rectilíneos y generando burbujas con diámetro mayor a la distancia de separación entre pulso y pulso, es posible formar canales continuos en el tejido. Identificamos que la formación de las burbujas, y por ende los canales, muestra una fuerte dependencia con respecto a la profundidad en la cual se lleva a cabo la irradiación. Esto debido a que las propiedades del tejido estromal son distintas dependiendo de la profundidad a la cual se trabaje.

Observamos que las burbujas y canales en el tejido tienen un tiempo de vida media de varios minutos, en el caso de muestras de córnea separadas del globo ocular, y de más de una hora, en el caso donde la córnea se mantiene en el

globo ocular completo. Cabe destacar que las burbujas o canales que se colapsan completamente no dejan daño óptico visible en la estructura del tejido corneal.

Caracterizamos el cambio de temperatura promedio inducido por los pulsos láser en la vecindad al área de irradiación; el cambio de temperatura que se registró está en el rango de 5-10 °C por arriba de la temperatura inicial del tejido. Este es un cambio poco significativo con respecto a la temperatura que se requiere para inducir daño térmico irreversible en tejido biológico (60 °C). El método empleado en los experimentos no nos proporciona información del cambio de temperatura en el punto exacto de la irradiación, sin embargo éste fue estimado de una forma teórica mediante un modelo térmico aplicable a las condiciones experimentales en nuestro trabajo.

Observamos un comportamiento distinto en el cambio de temperatura registrado al irradiar el tejido corneal (400 µm) cuando llevamos a cabo la irradiación en dos modos distintos. En un caso irradiando inicialmente con una fluencia muy alta para posteriormente ir disminuyendo la fluencia paulatinamente y en un segundo caso irradiando el tejido con una fluencia muy baja y posteriormente ir aumentando la fluencia hasta una fluencia alta. Los resultados obtenidos nos llevan a concluir que es muy relevante de la manera en que se suministra la fluencia al tejido.

Identificamos claras diferencias en las características que presenta el tejido al ser irradiado con pulsos de distinta duración (nanosegundos y femtosegundos). Las diferencias más notables al trabajar con ambos láseres fueron: la fluencia que se requiere para generar una burbuja con dimensiones muy similares es significativamente menor al emplear pulsos de femtosegundos que aplicando pulsos de nanosegundos. El cambio de temperatura que el tejido experimenta como resultado de la irradiación (calculada teóricamente) es significativamente menor al emplear pulsos de femtosegundos. Dicho fenómeno nos permite apreciar las ventajas de usar pulsos láser de femtosegundos en la interacción con tejido biológico.

Identificamos que el tamaño mínimo de las burbujas obtenidas con pulsos de nanosegundos fue de 20 μm de diámetro, mientras que el tamaño de burbuja generado con pulsos de femtosegundos fue de 7 μm de diámetro.

Llevamos a cabo un estudio sistemático de la interacción de láseres pulsados con tejido biológico con la finalidad de observar y analizar algunos efectos físicos que se producen en el tejido corneal.

Durante la investigación de los fenómenos que acompañan la interacción de láseres pulsados con tejido biológico obtuvimos experiencia en un área interdisciplinaria, tanto en el estudio de los efectos físicos producidos al irradiar

tejido corneal porcino, como en el manejo y cuidado adecuado de este tipo de material,

VI.1. Trabajo futuro

Lograr mediante un método de implementación experimental mediciones resueltas en el tiempo de la inicialización y evolución de los fenómenos físicos que se desarrollan en la formación de una burbuja en el tejido biológico. Dichos fenómenos incluyen la excitación de ondas de sonido y ondas de choque. Proponemos un método interferométrico o bien basado en la técnica de fotografía de Schlieren [Haley R y Smy P.R., 1988].

Dentro de los experimentos planeados está contemplado la implementación de un sensor (piezoeléctrico) para monitorear la onda de choque que probablemente se genera al irradiar el tejido. Es importante caracterizar la magnitud de la presión alcanzada durante la generación de una onda de choque en el tejido, ya que este fenómeno puede dañar el tejido ya sea a través del rompimiento de fibras de colágeno (soporte mecánico del tejido) o bien rompiendo las membranas de las células que constituyen el tejido.

Es deseable llevar a cabo un estudio más extenso de irradiaciones aplicadas a una cierta profundidad directamente sobre el tejido corneal sin

desprenderlo del globo ocular, empleando pulsos de femtosegundos, con la finalidad de caracterizar el comportamiento de las burbujas y canales inducidos por el láser mientras la córnea se mantiene en su soporte natural. Se pretende llevar a cabo este tipo de estudios con la finalidad de lograr generar burbujas con diámetros mínimos (1-5 micrómetros) que abarquen toda el área de la cornea, con el objetivo de proponer una nueva metodología con respecto al trasplante corneal.

Es de interés en el corto plazo extender algunos aspectos de nuestra metodología experimental y resultados reportados en esta tesis a otro tipo de tejido en el globo ocular, como es el caso de la esclera. La motivación es el estudiar la ablación de este tejido con el fin de perforar orificios de entre 100 y 300 μm de diámetro y 500 y 1000 μm de profundidad. Su aplicación esta contemplada en el área de tratamientos de glaucoma. El reto desde el punto de vista óptico y de interacción con el tejido es el alto coeficiente de esparcimiento del tejido escleral, lo cual puede limitar la capacidad de ablación láser.

Finalmente, es también de gran interés el estudio de daño celular inducido por pulsos láser de alta intensidad pico. Proponemos estudiar este fenómeno implementando ensayos de conteo de células (vivas y muertas) a base de tintes fluorescentes y microscopia confocal. Una de las áreas de interés en este aspecto son las células epiteliales y endoteliales en la córnea.

LITERATURA CITADA

Anisimov S.I. y Luk'yachuk B.S. 2002. "Selected problems of laser ablation theory. Phys". Uspekhi, 45 (3) : 293-324 p.

Bado P., Clark W. y Said A., 2001. "Introduction to Micromachining Handbook". Versión 2.2. Tauné DeBolt, Clark MXR Inc.

Da Silva L.B., Beop-Min Kim, Feit, M.D., Rubenchik, A.M.. 1998. "Use of Ultrashort Pulse Lasers in Medicine". IEEE. 7803-4947(4) : 443-444 p.

Djotyan G. P., Kurtz R. M., Cabrera F. D., Juhasz T., 2001. "An Analytically Solvable Model for Biomechanical Response of the Cornea to Refractive Surgery". ASME. 123. 440-445 p.

Fowles G. R. 1989. "Introduction to modern optics". Segunda edición, New York. USA: 328p.

Gibbon P. y Forster E. 1996. "Short-Pulse laser-plasma interactions". Plasma phys. Control Fusion. 38 : 769-793 p.

Guillen Rentería F., 1999, "Mediciones de las funciones de autocorrelación de pulsos de láser de femtosegundos usando diodos emisores de luz". Tesis de maestría. CICESE, Ensenada BC. México : 63 p.

Goldberg D. J. Md, Jon G. M. Md, 1998. "Treatment of Facial Telangiectases with the Diode-pumped Frequency-doubled Q-switched Nd:YAG Laser". Published by Elsevier Science Inc., Inc. 24: 828–832 p.

Haley R. y Smy P.R. 1988. "An inexpensive light source for high-speed schlieren photography". J. Phys. E: Sci. Instrum. 21 :1172-1174p.

Hetch E. 2000. "Óptica". Addison Wesley Iberoamericana. Tercer edición, Madrid: 722 p.

Holmes-Higgin D., Baker P.C., Burris T., Schanzlin D., Ruckhofer J., 1999. "Characterization of Aspheric Corneal Surface with Intrastromal Cornea Ring Segments". J.Refract. Surg. 15: 520-528 p.

Jones R., Dowling K., Cole M.J., Parson-Karavassilis D., French P.M.W., Lever M.J., Hares J.D., Dymoke-Bradshaw A.K.L. 1999. "Fluorescence lifetime imaging for biomedicine using all-solid state ultrafast laser technology". SPIE: 2615. 86-91 p.

Juhasz T., Loesel F.H., Kurtz R.M., Horvath C., Bille J.F., Mourou G. 1999. "Corneal Refractive Surgery with Femtosecond Laser". IEEE Journal of selected topics in quantum electronics. 5. (4): 902-910 p.

Juhasz T., Kurtz R., Raksi F., Suarez C., Horvath C. y Spooner G. 2002. "The femtosecond blade: Applications in corneal surgery". Optics and Photonics News. Optical Society of America 24:25 p.

Kampmeier J., Radt B., Birngruber R., Brinkmann R. 2000. "Thermal and Biomechanical Parameters of Porcine Cornea". Lippincott Williams & Wilkins, Inc. *Cornea* 19(3): 355-363 p.

Loesel F.H., Fischer J.P., Götz M.H., Horvath C., Juhasz T., Noack F., Suhm N., Bille J.F.. 1998. "Non-thermal ablation of neural tissue with femtosecond laser pulses". *Appl. Phys. B* 66: 121-128p.

Neims H. M. 1996. "Laser- Tissue Interactions". Tercera edición. Germany: 305 p.

Maisterrena Epstein Rodrigo J. 2006. "Características de ablación láser de metales y PMMA usando pulsos de 5ns y 80fs". Tesis de Maestría. CICESE. México: 115 p.

Momma C., Chichkov B.N., Nolte S. Von Alvensleben F., Tunnermann A., Wellegehausen B., 1996. "Short- Pulse ablation of solid target". *Opt. Com.* 129: 143-142 p.

Moseley H., Allen JW., Ibbotson S., Lesar A. McNeil A., Camacho-López M.A., Samuel I.D., Sibbett W., Ferguson J. 2006. "Ambulatory photodynamic therapy: a new concept in delivering photodynamic therapy". *British Journal of Dermatology.* 134. 747-750p.

Oraevsky Alexander A, Jacques Steven L., Frank K.T., 1995. "Mechanism of laser ablation for aqueous media irradiated under confined-stress conditions". *J. Appl. Phys.* 78 (2): 1281-1290 p.

Oraevsky A. A., Da Silva L. B., Rubenchik A. M., Feit M. D., Glinsky M. E., Perry M. D., Mammini B. M., Small W., Stuart B. C., 1996. "Plasma mediated ablation of biological tissues nanosecond- to- femtoseconds laser pulses: relative role of linear and nonlinear absorption". *IEEE Journal of selected topics in quantum electronics.* 2(4): 801-809p.

Paltauf Günther y Dyer Peter E., 2003. "Photomechanical processes and effects in ablation". *Chemical Reviews*, 103 (2): 487-518 p.

Roundy C., 1999. "Propagation factor quantifiers laser beam performance". *J. Laser focused world, PennWell Corp.*, 35 (12): 119-122 p.

Ruiz-de-la-Cruz A., 2006. "Construcción y caracterización de varios diseños de amplificador multi-paso en un sistema CPA". Tesis de doctorado. CICESE, Ensenada B.C. México: 81 p.

Ruiz-de-la-Cruz A. y Rangel Rojo R., 2005. "Multi-pass confocal ultra-short pulse amplifier". *Rev. Mex. Fis.* 51 (5): 488-493 p.

Savas G. y Koubenakis A., 2002. "Laser- Induced material ejection from model molecular solid and liquids: mechanisms, implications, and applications". *Chem. Rev.* 103: 349-393 p.

Schanzlin, D., Asbell P., Burris T., y Durrice, D.S., 1997. "The Intrastromal Cornea Ring Segment: Phase II Results for the Correction of Myopia". *Ophthalmology*. 104: 1067-1078 p.

Silfvast W.T. 1999. "Laser Fundamentals". Cambridge Univ. Press, Primera edición, Cambridge UK: 630 p.

Smausz T., Hopp B., Huszár H., Tóth Z. y Kecskeméti G., 2004. "Pulsed laser deposition of bioceramic thin films from human tooth". *Appl. Phys. A* 79: 1101–1103 p.

Spooner G. J., Juhasz T., Ratkay-Traub I., Djotyan G. P., Horvath C., Sacks Z. S., Marre G., Miller D. L., Williams A. R., Kurtz R. M., 2000. "New Developments in Ophthalmic Applications of Ultrafast Lasers". *SPIE*. 3934: 62-72 p.

Streeter Victor L. 1962. "Fluid Mechanics". University Michigan. Tercera edición. Michigan: 555 p.

Takamizawa A., Kajimoto S., Hopley J., Hatanaka K., Ohta K. y Fukumura H., 2003. "Explosive boiling of water after pulsed IR laser Heating". *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5: 888-895 p.

Tortora J. G., y Anagnostakos P. N., 1993. "Principios de anatomía y fisiología". Harla. Sexta edición. México: 1206 p.

Voguel A., Noack J., Hüttman G. y Paltauf G., 2005. "Mechanism of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues". *Appl. Phys. B* 81: 1015-1047p.

Von Der Linde, Sokolowski- Tinten K., Bialkowski J., 1997. "Laser- solid interaction in the femtosecond regime". *Appl. Surf. Sci.* 109/110: 1-10 p.

Wray W.O., Aida T., Dyer R.B., 2002. "Photoacoustic cavitation and heat transfer effects in the laser-induced temperature jump in water". *Appl. Phys. B* 74: 57-66 p.

Xiaoyan Ma., Jun Qing Lu, Huafeng Ding, y Xin-Hua Hu, 2005. "Bulk optical parameters of porcine skin dermis at eight wavelengths from 325 to 1557 nm". *Optics letters.* 30. No. 4: 412-414 p.

Información obtenida de Internet:

Fotografía del globo ocular:

www.ocularweb.com

Instituto médico láser, 2004 (Aplicaciones de interacción fotoquímica):

www.iml.es/web2/informacion/terapia_fotodinamica.shtml

Anatomofisiología de la córnea:

www.oftalmo.com/publicaciones/lentes/cap1.htm (Juan A. Durán de la Colina)

APENDICE A

Características del equipo empleado para la realización de experimentos

FOTODIODO	
Compañía	ThorLabs
Material	Silicio
Tiempo de respuesta	1ns
Área activa	13mm ²
I _{dark}	20nA
Rango espectral	350-1100nm

MEDIDOR DE ENERGÍA	
Compañía	Ophir Optronics
Respuesta espectral	metálico 0.15-12µm
Reflectividad	50% aprox.
Máx. ancho de pulso	20µs
Máx. frecuencia de pulso	4 kHz
Escala energía	10 mJ-20 µJ
Min. Energía detectada	2 µJ
Umbral de daño	< 100ns 0.1 J/cm ²

	1 μ s 0.2 J/cm ²
Apertura	12 mm
Máx. pot. prom.	2 W
Máx. densidad pot. Prom.	50 W/cm ²

CÁMARA CCD HDCS- 1020 (PEB)	
Compañía	Agilent Technologies
Número de pixeles	352 X 288
Tamaño por pixel	7.4 X 7.4 mm
Área de captura	2.6 X 2.13 mm
Sensitividad	1.1 V/Lux/seg
Resolución ADC	8 bit
Rango Dinámico	61 dB
consumo de energía	90 mW
	150 mW (stanby)
Temperatura de operación	
Voltaje de operación	3.3 V
Gama	variable

LENTE DE TRABAJO	
Compañía	Thorlabs
Modelo	C240TME-B
Tipo de lente	Asférica
Abertura Numérica	0.5
Abertura libre	8mm
Distancia focal efectiva	8mm
Abertura libre con montura	6mm

LÁSER DE NANOSEGUNDOS: MINILITE II, Q SWITCHED, ND: YAG LÁSER	
longitud de onda	532nm
Energía	25 mJ
Potencia pico	6.3 MW
Potencia promedio	375 mW
Ancho de pulso	3-5 ns
Estabilidad	3%
Polarización	Vertical
Tamaño del haz	<3 mm
Devergente	<3 mrad
Frecuencia de repetición	1-15 Hz

CAMARA DIGITAL	
Marca	sony
Modelo	Cyber-Shot
Lente	3x
f	8-24 mm
Definición	5 Mega Pixeles

TARJETA DE ADQUISICIÓN DE DATOS INSTRUNET 200 PCI	
Número de entradas análogas	16 terminales/ 8 diferenciales
Resolución	14 bits
Tiempo de conversión	4 μ s min
Rango de señal ruido	8 dB
linealidad	diferencial \pm 1.5 LSB
	integral \pm 2 LSB
Protección de salida de sobre-voltaje	\pm 15 V

Impedancia de salida	> 22 MΩ, 3pf
Voltaje común	± 5 V min (CMR ± 80 dB)

PROGRAMA IMAGE J	
Aplicaciones	Medición de Area, promedio, desviación estandar, medida de la longitu y ángulos en imágenes, densidad estándar, generación de histogramas y muestreo de perfiles
Procesamiento de colores	32 bits en RGB o HSV
Tipo de datos	8 bit en escala de grises 16 bits

- **TERMOPARES**

tipo K, 127μm de diámetro, marca Omega, resolución ~0.5 °C

- **Microscopio de disección:**

1. Edmund Industrial Optics

Aumento de ocular 10 X, aumento en objetivo 1X, 4X

2. Olympus SZH

Aumento de ocular 10 X, aumento en objetivo hasta 60 X