

Efecto del láser de diodo (810nm) sobre el epitelio pigmentario de la retina

J. Colomé Campos
JM. Ruíz Moreno

Universidad Miguel
Hernández
Alicante

Resumen

Objetivos: Determinar la mínima energía de láser diodo (810 nm) capaz de generar cambios en el EPR respetando al resto de capas retinianas.

Métodos: Se fotocoagularon vía transpupilar 3 grupos de 10 conejos pigmentados. Se sacrificaron los días 1, 7 y 21 post láser. Realizamos un estudio de microscopia óptica tras su enucleación.

Resultados: Con impactos de 100 mW-0,2 seg. conseguimos alterar únicamente al EPR, predominando los días 1º y 7º fenómenos de necrosis coagulativa y el 21 de hipertrofia.

Conclusiones: El láser de diodo (810 nm) con potencias de 100 mW-0,2seg. genera cambios en el EPR respetando al resto de la retina.

Resum

Objectius: Determinar la mínima energia de làser diode (810nm) capaç de generar canvis sobre l'EPR respectant la resta de capes retinianes.

Mètodes: Es van utilitzar 3 grups de 10 conills pigmentats els quals foren fotocoagulats via transpupil·lar. Es sacrificaren els dies 1, 7 i 21 post làser.

Un estudi de microscopia òptica es va realitzar darrera la enucleació.

Resultats: Amb impactes de 100 mW i 0,2 seg. s'aconsegueix alterar únicament a l'EPR, predominant els dies 1 i 7 els fenòmens de necrosi coagulativa i el 21 d'hipertrofia.

Conclusions: El làser diode (810 nm) a una potència de 100 mW i 0,2 seg. genera canvis sobre l'EPR respectant la resta de la retina.

Summary

Objectives: Determinate minimal diode laser (810nm) energy capable to generate changes in the RPE sparing the remainder retinal layers.

Methods: Three groups of ten pigmented rabbits were photocoagulated in a transpupilar way. They were sacrificed the 1st, 7th and 21st post laser. We carried out a study of optic microscopy after their enucleation.

Results: We get with impacts of 100mW-0.2sec just altering the EPR, privailing the 1st and 7th phenomens of coagulative necrosis and the 21st of hypertrophy.

Conclusions: The diode laser (810nm) with powers of 100mW-0.2sec generates changes in the EPR sparing the remaining retina.

Introducción

La era de la fotocoagulación retiniana se inició hace unos 50 años cuando Meyer-Schwickerath¹ con la ayuda de un arco xenón consiguió generar unas lesiones que afectaban a todo el espesor coriorretiniano.

Pero la verdadera expansión del láser no se inició hasta 1971, cuando se comercializó el láser de argón que ya venía siendo utilizado por l'Esperance² desde 1965.

Años más tarde, la incorporación en la práctica médica de los láseres de emisión en el espectro del

Correspondencia:
Jordi Colomé Campos
Hospital Verge de la Cinta
Esplanetes, 144
43500 Tortosa
Tarragona

infrarrojo, además de poseer buenas propiedades como instrumento fotocoagulador, presentaron las ventajas de un reducido tamaño, fácil transporte, alta eficiencia, bajo coste y fácil mantenimiento.

Fueron Brancato, Patresi³ y Puliafito⁴, trabajando independientemente los primeros en utilizar el láser de diodo sobre animales de experimentación, y McHugh *et al.*⁵ los primeros en publicar su utilización sobre la retina humana.

Hasta la actualidad, el láser de diodo ha venido siendo utilizado entre otras cosas para el tratamiento de diversas patologías oculares como la retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, desgarros y desprendimiento de retina, oclusión de vena central y rama de la retina, glaucoma y membranas neovasculares, así como su profilaxis mediante la fotocoagulación de drusas blandas.

Se han publicado algunos estudios sobre estos tratamientos donde se han obtenido los mismos resultados a niveles infraumbrales de fotocoagulación que a intensidades mayores, con la finalidad de respetar en la mayor medida la integridad anatómica y por tanto funcional de la retina^{6,7}. Parece que la afectación directa de la energía del láser sobre el EPR y su consecuente respuesta es la principal responsable de la actividad terapéutica⁸. Conocido el hecho de que la afectación retiniana tras fotocoagulación con láser diodo se genera en los estratos más profundos a diferencia del láser argón que afecta a todas las capas⁹, pretendemos estudiar bajo microscopia óptica aquella energía de láser mínima capaz de generar cambios sobre el epitelio pigmentario sin afectar el resto de las capas con la finalidad de conseguir un mismo efecto terapéutico sin desarrollar ninguna alteración funcional.

Material y métodos

Se utilizaron 30 ojos de 30 conejos macho pigmentados de raza Dutch y de peso aproximado de 2 Kg en el momento de la experimentación. Toda manipulación de los animales se realizó bajo la ley de protección de animales utilizados para experimentos y otros fines científicos vigente por el Real decreto 223/88 y la directiva de la CEE 86/609.

Para la realización de este estudio utilizamos un láser de diodo de 810nm marca Oculite SL, IRIS Medical Instruments Inc, Mountain View, Calif que fue acoplado a una lámpara de hendidura Topcon SL 8Z mediante el adaptador Iris Slit Lamp Adapter.

Realizamos el experimento sobre 3 grupos de 10 conejos elegidos aleatoriamente.

Los grupos fueron distribuidos del siguiente modo:

- Un primer grupo de 10 conejos, que serían sacrificados a las 24 horas de la fotocoagulación.
- Un segundo grupo de 10 conejos, que serían sacrificados el día 7 tras la fotocoagulación.
- Un tercer grupo de 10 conejos que serían sacrificados el día 21 postláser.

Los animales fueron sedados con una inyección intramuscular de medetomidina 0,25 mg/Kg. Seguidamente procedimos a instilar una gota de fenilefrina 1% y de tropicamida 2% para conseguir una midriasis máxima. Posteriormente fueron introducidos en una jaula o cepo (Tecniplast 160012) que nos permitió reducir el cuerpo del animal manteniendo la cabeza expuesta.

Seleccionamos un diámetro constante de spot de 125 micras.

Sobre el primer grupo se eligieron 5 conejos de manera aleatoria para realizar fotocoagulaciones a una potencia fija de 100 mW. Los tiempos de exposición fueron de 0,05 seg., para el primer conejo, 0,1 seg. para el segundo, 0,2 seg. para el tercero, 0,5 seg. para el cuarto y 1 seg. para el quinto.

Para los cinco conejos restantes del primer grupo predeterminamos un tiempo de exposición 0,2 seg., variando únicamente las potencias, siendo de 50 mW para el primer conejo, 100 mW para el segundo, 200 mW para el tercero, 400 mW para el cuarto y 800 mW para el quinto.

Posteriormente procedimos del mismo modo para el segundo y tercer grupo de conejos.

Se fotocoaguló la retina del ojo derecho, dejando el ojo izquierdo como control.

La fotocoagulación la realizamos vía transpupilar a través de una lente tipo Goldman (Ocular Instruments, Bellevue, USA), que aplicamos sobre el ojo del conejo tras la instilación de una gota de anestésico de oxibuprocaina y tetracaína clorhidrato (colircusí anestésico doble).

El número medio de impactos fue de 50 por ojo, estando separados entre ellos una distancia media de un spot.

La localización de la fotocoagulación fue a nivel de la hemirretina inferior, simulando así las zonas avasculares de la retina y evitando con ello la zona de los radios medulares.

El sistema de clasificación de la fotocoagulación utilizada fue el descrito por Tso, *et al.*¹⁰ donde las lesión

nes suaves, consideradas como la apreciación de una decoloración retiniana blanco-grisácea, fueron clasificadas como lesiones de intensidad grado I.

Las lesiones caracterizadas por la transformación del color de la retina a un color blanco rodeado de un anillo gris fueron clasificadas como lesiones de intensidad grado II.

Las lesiones que presentaron una tonalidad completamente blanca tras la realización de los impactos fueron consideradas como lesiones grado III.

Los animales fueron sacrificados tras la inyección de un sedante vía intramuscular de medetomidina 0,25 mg/Kg con un compuesto de embutramida -mebezonio yoduro -tetracaína clorhidrato (T - 61 Hoechst Roussel Vet) inyectado por vía intravenosa (2ml/animal).

Los globos oculares se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M. Posteriormente realizamos cortes seriados de 2-4 micras de espesor con un microqueratomo sobre el área de la retina correspondiente a la zona de los impactos y que consistía en un área circular de tejido de unas 3000 micras de diámetro medio. Se tiñeron con hematoxilina-eosina una media de 80 muestras por ojo bajo la técnica de Harris, correspondientes a las muestras seriadas del tejido obtenidas cada 50 micras.

Resultados

Macroscópicos

Para una misma muestra, en algunas de las extensiones no observamos ningún impacto, mientras que

en otras los localizamos en un número de hasta tres.

Oftalmoscópicamente los impactos generados fueron clínicamente similares a los que se observan tras una fotocoagulación con el láser de argón.

La lesión generada se objetivó inicialmente sobre el centro del impacto para extenderse posteriormente de forma centrífuga y ocupar todo el tejido afectado.

En el transcurso de los minutos la tonalidad de la lesión se fue transformando en un color más blanquecino, incrementando el aspecto heterogéneo de unas mismas lesiones, hasta el punto de que algunos impactos infraumbrales que en un inicio se presentaron como macroscópicamente inapreciables, se convirtieron en impactos claramente bien definidos pasados unos minutos.

Encontramos lesiones de grado I (Figura 1) para intensidades de 100 mW y tiempo de exposición de 0,2 seg. y 0,5 seg.

Encontramos lesiones de grado II (Figura 2) para potencia de 100 mW y 1 seg. de exposición. También para potencias de 200 mW y tiempo de exposición de 0,2 seg.

Lesiones grado III (Figura 3) para potencia de 400 mW y 800 mW y tiempo de exposición de 0,2 seg. respectivamente.

Los impactos de una intensidad de 800 mW se asociaron en 1/3 de los casos con un componente hemorrágico.

La potencia mínima necesaria para objetivar las lesiones fue de 100 mW para un tiempo mínimo de exposición de 0,2 seg.

Figura 1.
100 MW; 0,2 seg.
Intensidad umbral a la que pudimos observar el blanqueamiento de los impactos

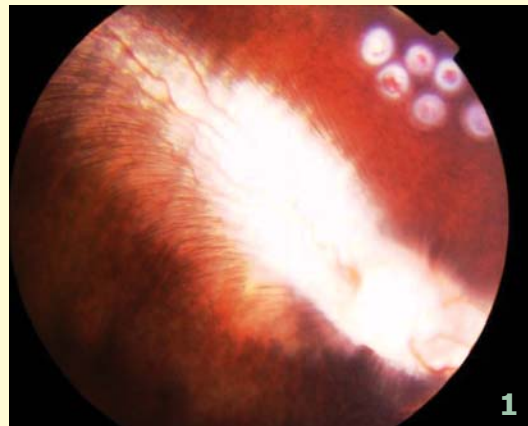
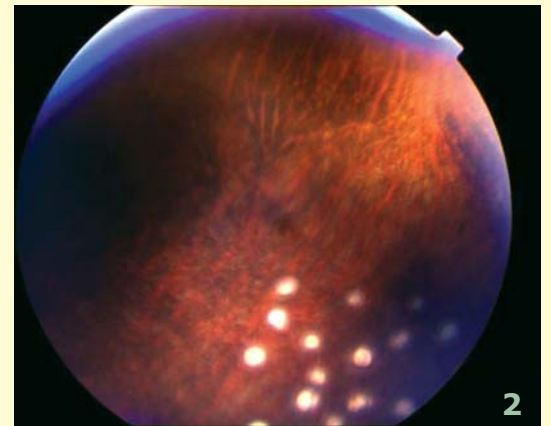


Figura 2.
200 MW; 0,2 seg.
Los impactos en el transcurso del tiempo van incrementando en tamaño y en su tonalidad blanquecina



Microscopia óptica

En la mayoría de los casos la localización de la agresión se produjo en las capas más profundas de la retina, respetando los estratos más internos y afectando en alguno de los casos a la coriocalipar a modo de oclusiones vasculares.

Para una intensidad mínima de 100 mW y 0,1 seg. de tiempo de exposición (Figura 4), las alteraciones observadas se generaron exclusivamente en el epitelio pigmentario, mientras que para intensidades de 800 mW (Figura 5) la lesión se localizó a lo largo de todas las capas retinianas afectando a la coriocalipar y coroides y a estratos más internos de la esclera.

El primer día tras el láser encontramos áreas de vacuolización y tumefacción celular, con áreas de picnosis celular y zonas de necrosis coagulativa. Para intensidades elevadas también se evidenció oclusión de vasos capilares, con trombosis y cúmulos plaquetarios.

Para intensidades de 800 mW se observan numerosos cúmulos de hematíes y una importante disrupción de la arquitectura habitual celular de la retina.

El epitelio pigmentario se presentó en algunas áreas con un aspecto desestructurado con zonas de dispersión pigmentaria.

El séptimo día tras láser nos encontramos con la aparición de un importante número de macrófagos con cúmulos de pigmento intracelular. También hallamos una moderada vacuolización y células con necrosis coagulativa (Figura 6).

El epitelio pigmentario se encontró más organizado pero con evidencias de desarrollo celular.

Los vasos de la coriocalipar presentaron zonas de dilatación adyacentes a áreas de recanalización.

El vigésimo primer día tras láser las capas retinianas presentaron un aspecto más organizado, persistien-

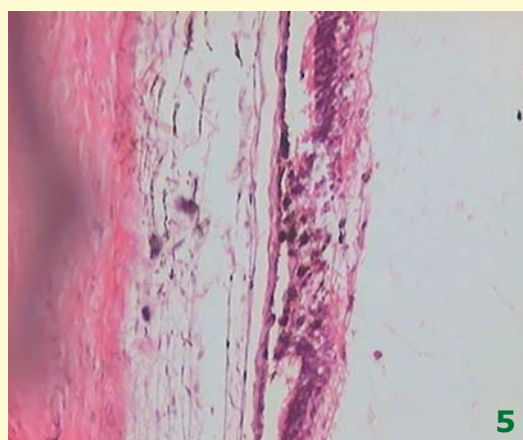
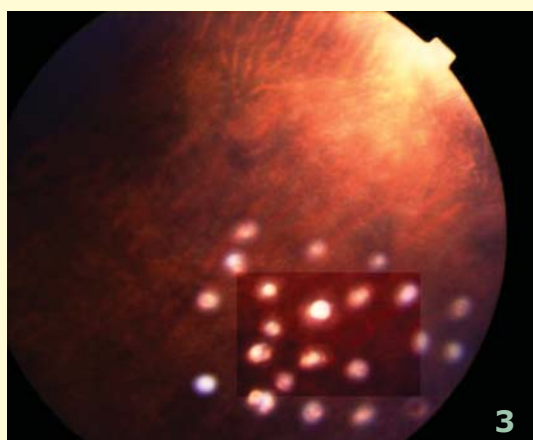


Figura 3.
800 mW; 0,2 seg.
Impactos de láser muy marcados con componente hemorrágico en gran número de ellos

Figura 4.
10X. H&E
100 mW; 0,2 seg.
21 días láser. Imagen del EPR donde se observa una marcada hiper celularidad. Los parámetros representan los valores umbrales

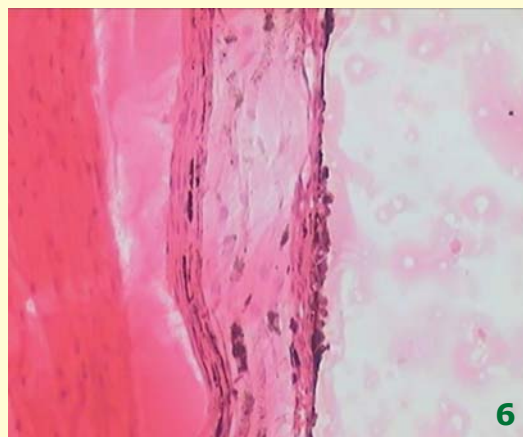
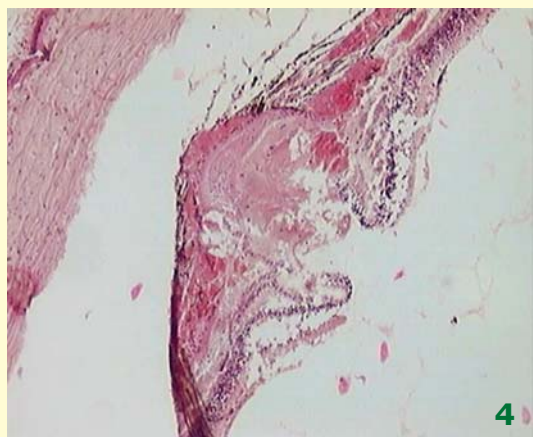


Figura 5.
5X. H&E
800 mW; 0,2 seg.
1 día láser.
Desestructuración masiva de la arquitectura tisular con un gran componente hemorrágico central asociado. El EPR no es apreciable en dicha zona, pero en zonas adyacentes se observa en forma de dispersión pigmentaria

Figura 6.
5X. H&E, 200mW;
0,2 seg.
7 días láser. En esta imagen destaca la invasión celular en las capas más profundas de la retina de macrófagos y células de Müller

do los cúmulos de macrófagos cargados de pigmento. Las capas más profundas presentaron cúmulo de tejido glial y edema intercelular con cúmulo de material eosinófilo (Figura 7).

El epitelio pigmentario presentó un aspecto más regular pero con áreas de hipertrofia celular.

Discusión

Walow, *et al.*¹¹, en sus estudios realizados sobre animales de experimentación, demostraron que la fotocoagulación retiniana, para intensidades elevadas de potencia y utilizando los láseres de argón y diodo, afectaba a todos los estratos retinianos, mientras que para intensidades moderadas el láser diodo a diferencia del de argón respetaba los estratos más internos.

Años más tarde Ulbig, *et al.*¹², realizando estudios electrorretinográficos en pacientes diabéticos, demostraron un mayor descenso de los valores P 50 y N95 pattern electrorretinograma tras la aplicación del láser de argón que tras el de diodo.

Es por esta menor alteración estructural y por tanto funcional que utilizamos el láser de diodo para el estudio en lugar del tradicional láser de argón.

El láser rojo de kriptón se caracteriza por afectar a los estratos más profundos del tejido retiniano e incluso a la capa coroidea. De este modo McHugh, *et al.*⁵ demostraron sobre conejos que la repercusión microscópica sobre la retina tras la fotocoagulación con el láser de diodo o de kriptón era muy similar. Posiblemente hubiéramos obtenido unos resultados similares utilizando el láser de kriptón, pero la versa-

tilidad del láser de diodo en cuanto al tamaño, eficiencia y funcionamiento nos facilitó substancialmente la realización del trabajo.

La utilización de un láser de diodo de emisión a pulsos, de una frecuencia menor al tiempo de relajación térmica que la melanina del epitelio pigmentario, produciría teóricamente según Berger¹³ y Roider, *et al.*¹⁴ un incremento de la temperatura del epitelio pigmentario capaz de generar un efecto terapéutico, sin provocar alteraciones colaterales no deseadas. Sin embargo, Pollack, *et al.*¹⁵ obtuvieron unos resultados microscópicos similares al utilizar el láser de diodo a modo continuo que micropulsado. Dadas estas características utilizamos la emisión continua del láser en aras a simplificar el estudio.

La fotocoagulación retiniana a una intensidad de 100mw y 0,1 seg. de tiempo de exposición produjo en nuestro estudio una afectación del epitelio pigmentario respetando el resto de capas tisulares de la retina. Sin embargo, Pollack¹⁵ *et al.* publicaron que a intensidades muy bajas de láser siempre se encontraba afectada además de la capa del epitelio pigmentario, la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores. Puesto que su estudio se realizó bajo microscopía óptica y electrónica pensamos que la aportación del microscopio electrónico nos hubiera permitido ampliar las conclusiones de nuestro trabajo.

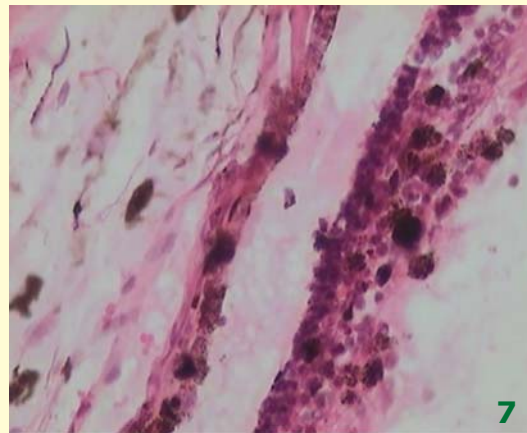
El aspecto del color inicial que adoptan los impactos con el láser de diodo sobre la retina es de una tonalidad débilmente grisácea que se transforma a un color intensamente blanquecino en el transcurso de los minutos, recordando al láser de argón.

McHugh, *et al.*⁵ encontraron sobre conejos unos hallazgos similares a los nuestros, sospechando que el blanqueamiento inicial del láser de argón era debido a una mayor área de tejido coagulada, mientras que el blanqueamiento tardío del láser de diodo era debido a una amplificación de la lesión, consecuencia de la necrosis celular y edema del epitelio pigmentario.

Nosotros encontramos una leve afectación escleral a diferencia de otros estudios publicados como los de Peyman, *et al.*¹⁶ y Haller, *et al.*¹⁷ que encontraron una afectación escleral considerable aplicando el láser vía transescleral.

La energía que absorbe la esclera es únicamente la de un 6% de toda la energía que emite el láser de diodo, por lo que la lesión que se produce se supone que se debe a la conducción generada a partir de la energía absorbida primariamente sobre el epitelio pigmentario. Puesto que la coroides absorbe un 38% de la energía del láser y el epitelio pigmentario un

Figura 7.
20X. H&E
400 mW; 0,2 seg.
21 días láser.
La organización celular se encuentra al 21 días tras láser marcadamente reestructurada. Las células fagocíticas se observan repletas de restos celulares pigmentados



12%, pensamos que se debe esta discrepancia en los resultados a la diferente vía de aplicación del láser, como sugirieron Nanda y Han¹⁸, puesto que en la vía transescleral la energía primaria absorbida se generaría más próxima a la esclera que por vía endopupilar donde la energía absorbida por la coroides se generaría secundariamente a la absorción por el epitelio pigmentario.

Desconocemos en la actualidad cuál es el motivo de que niveles infraumbrales de fotocoagulación puedan ser igual de eficaces para el tratamiento de diversas patologías retinianas que intensidades mayores. También desconocemos el mecanismo de acción que se genera a distancia del impacto y que puede hacer que encontremos los mismos hallazgos macroscópicos que en la zona del impacto. Parece ser que las células del EPR pueden jugar un papel fundamental y, si esto es así, la destrucción de otras capas de la retina sin actividad regenerativa no presenta ninguna utilidad, justo todo lo contrario. Una de las teorías que ha pretendido explicar los cambios sobre el EPR es la de Gass, *et al.*¹⁹, que afirmaron que se producía un recambio del EPR en la zona del impacto que le permitía recuperar su actividad funcional. Del mismo modo Yamamoto, *et al.*²⁰ años más tarde demostraron la existencia de actividad mitótica en las células del EPR tras la fotocoagulación, al igual que Campochiaro, *et al.*²¹.

Nosotros hemos encontrado proliferación del EPR a bajas intensidades bajo microscopía óptica, respetando la integridad de las diferentes capas retinianas. Por tanto, considerando al EPR como partícipe teórico importante en la función de regulación metabólica de la retina, hemos obtenido una energía mínima capaz de generar proliferación celular sin alterar el resto de capas retinianas y consideramos que esta regeneración puede jugar un papel fundamental en el tratamiento de diversas patologías de la retina.

Bibliografía

- Meyer - Schwickerath G. Koagulation der Netzhaut mit Sonnenlicht. *Ver Dtsch Ophthal Ges* 1949;55:256-9.
- L'Esperance FA Jr. An Ophthalmic argon laser photocoagulation system: design, construction and laboratory investigations. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1968;66:827-904.
- Brancato R, Patresi R. Applications of diode lasers in ophthalmology. *Lasers Ophthalmol* 1987;1:119-29.
- Puliafto CA, Deutsch TF, Boll J, *et al.* Semiconductor laser endophotocoagulation of the retina. *Arch Ophthalmol* 1987;105:424-7.
- Mc Hugh JDA, Marshall J, Capon M, *et al.* Transpupillary retinal photocoagulation in the eyes of rabbit and human using a diode laser. *Lasers Light Ophthalmol* 1988;2:125-43.
- Roider J, Brinkmann R, Wirbelauer C, *et al.* Subthreshold (retinal pigment epithelium) photocoagulation in macular diseases: a pilot study. *Br J Ophthalmol* 2000;84(1):40-47.
- Akduman L, Olk RJ. Subthreshold (invisible) modified grid diode laser photocoagulation in diffuse diabetic macular edema. *Ophthalmic Surg Lasers* 1999;30(9): 706-14.
- Abdelsalam A, Del Priore L, Zarbin MA. Drusen in age-related macular degeneration: pathogenesis, natural course, and laser photocoagulation-induced regression. *Surv Ophthalmol* 1999;106(7):1367-72.
- Benner JD, Huang M, Morse LS, *et al.* Comparison of photocoagulation with the argon, krypton, and diode laser indirect ophthalmoscopes in rabbit eyes. *Ophthalmology* 1992;99(10):1554-63.
- Tso MOM, Wallow IHL, Elgin S. Experimental photocoagulation of the human retina. Correlation of physical, clinical, and pathologic data. *Arch Ophthalmol* 1977; 95:1035-40.
- Wallow IHL, Sponsel WE, Stevens TS. Clinicopathologic correlation of diode laser burns in monkeys. *Arch Ophthalmol* 1991;109:648-53.
- Ulbig MRW, Arden GB, Hamilton AMP. Color contrast sensitivity and pattern electroretinographic findings after diode and argon laser photocoagulation in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;117:583-8.
- Berger JW. Thermal modelling of micropulsed diode laser retinal photocoagulation. *Lasers Surg Med* 1997; 20:409-15.
- Roider J, Wirbelauer L, Brinkmann R, *et al.* Control and detection of subthreshold effects in the first clinical microphotocoagulation trial of macular diseases. *Invest Ophthalmol Visc Sci* 1998;39:104.
- Pollack JS, Judy EK, Pulido Js, *et al.* Tissue effects of subclinical diode laser treatment of the retina. *Arch Ophthalmol* 1998;116:1633-9.
- Peyman GA, Naguib K, Gaasterland DE. Transscleral application of semiconductor diode laser. *Laser Surg Med* 1990;10:569-75.
- Haller JA, Lim JL, Goldberg MF. Pilot trial of transscleral diode laser retinopexy in retinal detachment surgery. *Arch Ophthalmol* 1993;111:952-6.
- Nanda SK, Han DP. Experimental transconjunctival diode laser retinal photocoagulation through silicone scleral explants. *Arch Ophthalmol* 1995;113:926-31.
- Gass JDM. Photocoagulation of macular lesions. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1971;75:580-608.

20. Yamamoto Ch, Ogata N, Yi X, *et al.* Immunolocalization of basic fibroblast growth factor during wound repair in rat retina after laser photocoagulation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234:695-702.
21. Campochiaro PA, Hackett, Vinoses SA, *et al.* Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci* 1994; 107:2459-69.