

ESTUDIO DE LA CAPA DE BOWMAN EN DIFERENTES MODELOS ANIMALES Y SU PAPEL EN LA PROTECCIÓN A RADIACIONES SOLARES

Study of Bowman's layer in different animal models and its role in the sun radiation protection

Gisele C. GONÇALVES¹, María Carmen MARTÍNEZ-GARCÍA², Jesús MERAYO-LLOVES³, Roberto CANTALAPIEDRA RODRÍGUEZ⁴

Resumen:

En este artículo presentamos la respuesta del sistema ocular de distintas especies animales al estrés óptico generado por radiación ultravioleta de intensidad extrema. Centramos nuestra atención en la manera como queda afectada la capa de Bowman en la córnea de cada especie.

Palabras clave: córnea, cirugía refractiva, gallina, conejo, UV

Abstract:

In this paper we study the reaction of the vision system of different animal species to the optical stress produced by extreme UV radiation. We focus the attention in the Bowman's layer of the cornea.

Key Words: cornea, refractive surgery, chicken, rabbit, UV

¹ Licenciada en Veterinaria – UFMG - Brasil, Dep. Histología, Facultad de Medicina UVA –Valladolid

² Doctor en Medicina, Dep. Histología Facultad de Medicina UVA -Valladolid – España

³ Doctor en Medicina, Fundación de Investigación Oftalmológica Fernández-Vega- Oviedo – España

⁴ Técnico de Anatomía Patológica, Dep. Histología Facultad de Medicina UVA -Valladolid – España

Introducción

La cornea es el principal elemento refractivo del dioptrio ocular, ella corresponde al 1/6 de la superficie ocular, posee una forma ligeramente elíptica, es una estructura transparente, avascular, sin color y ricamente inervada.

La cornea presenta 5 capas en su conjunto: epitelio, capa de Bowman, estroma, capa de Descemet, endotelio (figura 1).

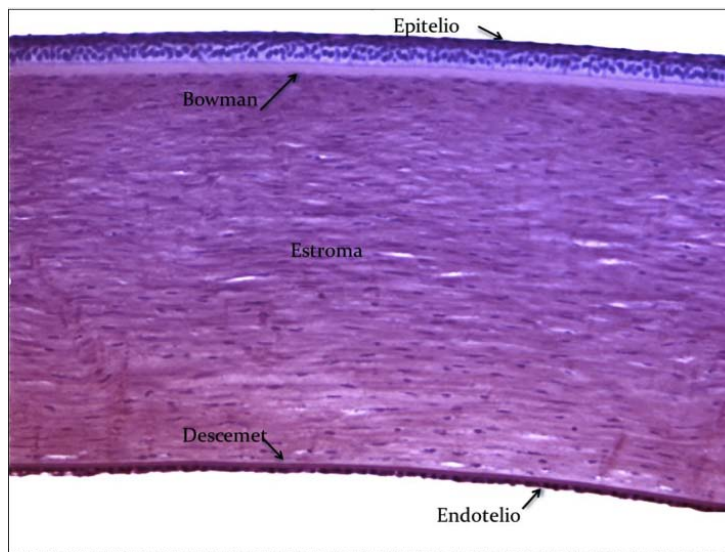


Figura 1: Corte histológico de córnea humana.

La radiación solar que alcanza la superficie del planeta esta formada por luz ultravioleta (UV), infrarrojo y luz visible, esta energía esta constituida de pequeños componentes llamados fotones y es medida en nanómetros(nm). Las longitudes de ondas pueden ser divididas en UV-A 330-400nm, UV-B 280-330nm, UV-C 240-280nm. Hay una serie de factores ambientales que interfieren en el nivel de radiación que recibimos: El ángulo del sol, cuanto más alto esté el sol en relación la Tierra, más corta será la trayectoria de los rayos UV para cruzar la atmósfera y como consecuencia mayor será la cantidad de rayos que llegarán a la superficie terrestre. Latitud, cuanto más cerca del Ecuador más altos serán los niveles de radiación. Altitud, en altitudes elevadas ocurre una disminución de la capa atmosférica y por consecuencia un aumento progresivo en los niveles de radiación. A cada 304,8 metros de altitud se eleva en 4% el nivel de exposición. Capa de ozono, la molécula de ozono está formada por tres moléculas de oxígeno, con una concentración máxima a una latitud de 10 a 35 Km. La capa de ozono tiene la capacidad de absorber

totalmente los UV-C y gran parte de los UV-B. Los niveles de ozono varían de acuerdo con la época del año, el día y patrones de circulación de la atmosfera. Nubes, un día nuboso no garantiza un menor nivel de radiación. Elevados niveles de radiación pueden ser encontrados debidos a la difusión de los rayos en moléculas de agua y finas partículas de la atmosfera. Reflexión especular, la radiación es reflejada y difundida en grado variables en diferentes superficies. Por ejemplo la reflexión del UV por el mar es 25%, nieve 80%, arena y nubes 17%. (Ministério de Ciência e Tecnologia/ BRA- Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais n.d.)

De la radiación solar que llega a la superficie terrestre un 92% es de UV-A y 7% de UV-B, 0% de UV-C, solamente cerca de un 10% de esta radiación llega al ojo. La exposición del ojo a la luz solar está asociada a enfermedades oculares atribuidas en gran medida a la luz ultravioleta (UV). Las distintas longitudes de ondas ultravioletas pueden afectar más o menos zonas distintas del ojo. En la córnea pasa lo mismo, su exposición a la luz UV puede provocar desordenes afectando capas distintas de la cornea como el epitelio, estroma o endotelio, que conllevan a queratopatias. Longitudes de ondas distintas son absorbidas de distintas maneras por las capas de la córnea. La córnea absorbe 92% del UV-B y un 60% del UV-A, pero es más sensible al daño causado por el UV-B. La absorbencia individual de cada fracción depende de la longitud de onda. Por ejemplo fracción insoluble (colágeno) absorbe 50% de los UV-A, mientras la fracción soluble en agua absorbe 60% del rango entre 290-300nm (Cejková, et al. 2004). Longitudes de ondas menores que 295nm son absorbidos por el epitelio y M. Bowman. El epitelio y la M. Bowman pueden tener el papel de proteger las estructuras que están por debajo. En contraste longitudes de ondas entre 300 -320nm son absorbidas por el estroma y el cristalino (A. Podskochy 2004).

La cirugía refractiva es una de las cirugías que mas crecen en el mundo hoy. Hay más de 2.000.000 de personas operadas por PRK sin membrana de Bowman.

Los animales tienen una distinta composición de las capas de la córnea de acuerdo con la especie. Los primates son los que tiene la córnea más parecida a la de los humanos, con las cinco capas. Las aves suelen tener todas cinco capas al igual que los humanos incluyendo la capa de Bowman. Entre los animales de experimentación las gallinas son las más utilizadas para los estudios de cirugía refractiva porque guardan las proporciones entre las capas de la córnea muy semejantes al humano y por tener la organiza-

ción de las fibras de colágenos similares también al humano. (Folwer W. C. 2004)(Merayo-Llives J. 2001) (Martínez-García, et al. 2006) (Boote and al 2008). Los ratones y los conejos también son animales utilizados como modelos de cirugía corneal pero tienen proporciones distintas entre las capas de córnea distanciándose más de la córnea humana.

En un estudio previo en 2008 comparamos la córnea de la gallina y la codorniz. (Figura 2).

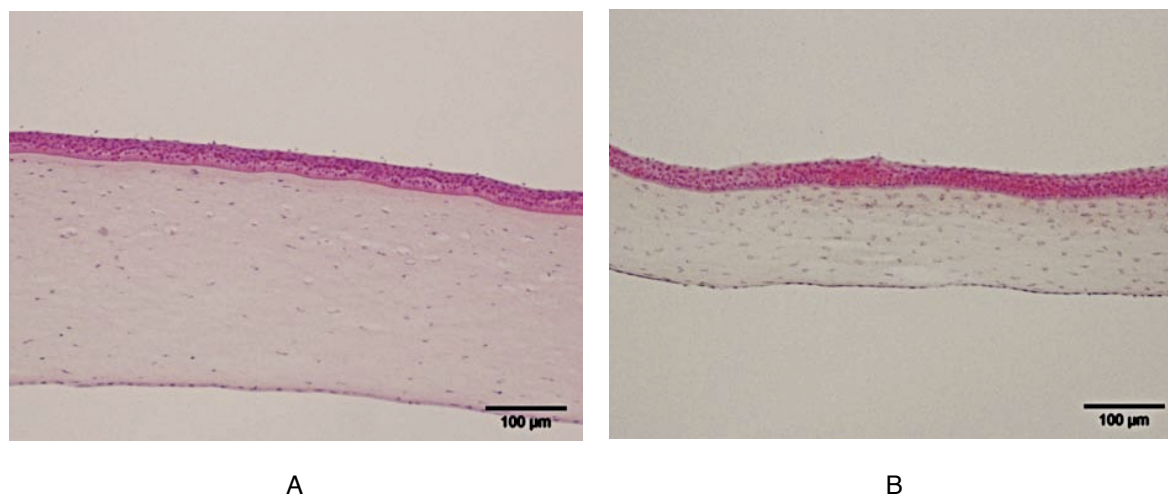


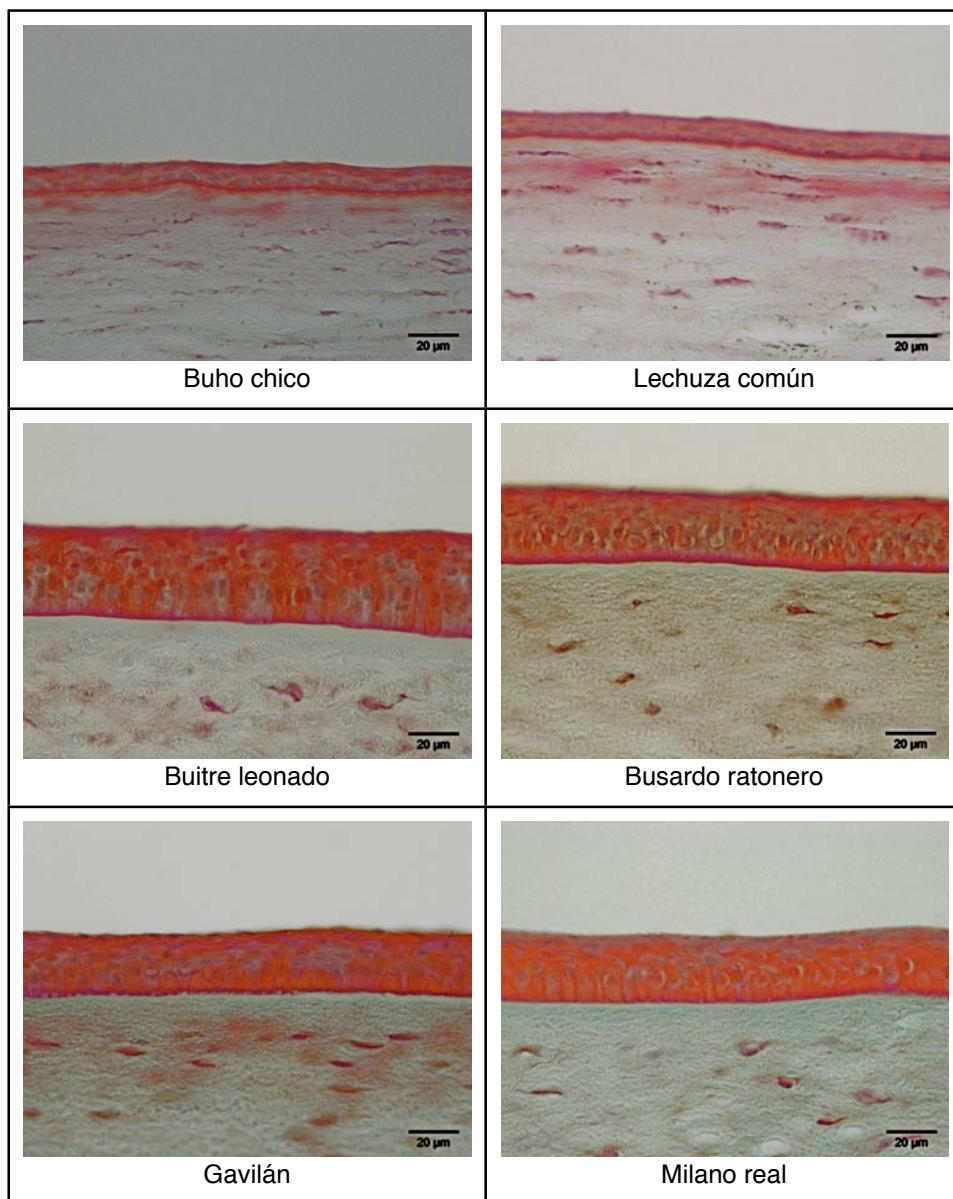
Figura 2: Comparativo histológico en HE de la córnea de gallina(A) y codorniz (B).

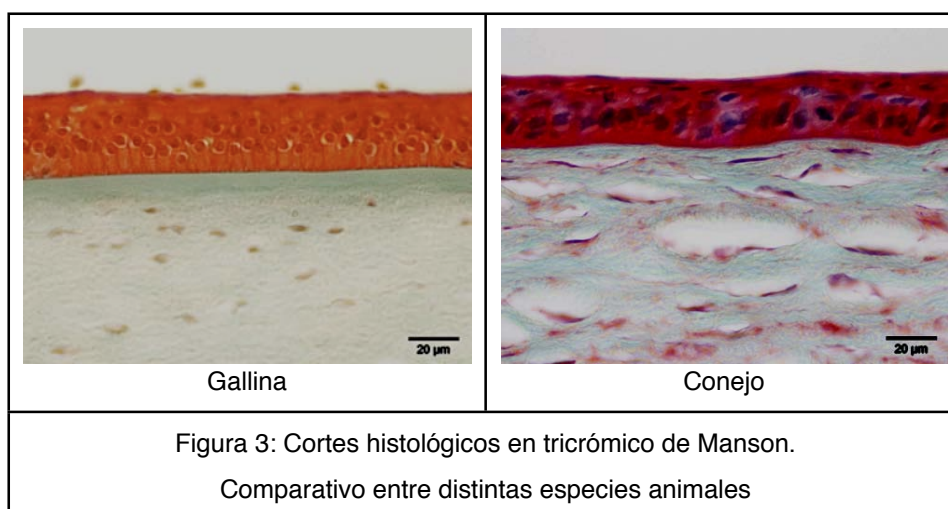
La gallina no es un modelo experimental, representado en el Anexo VII del Real Decreto 1201/2005, en el que si que está incluida la codorniz como única ave aceptada para la experimentación animal, lo que obliga a solicitar autorización previa y expresa para su utilización en investigación.

El objetivo de este estudio fue, por lo tanto, analizar y comparar desde el punto de vista histológico, morfológico y biofísico las medidas de las características corneales de la gallina Lohman Classic y la codorniz, para determinar qué modelo experimental animal es el más adecuado para la realización de estudios de investigación en cirugía corneal

Las diferencias encontradas entre las dos especies sobre todo con respecto al grosor corneal, y la proporción que cada una guarda entre sus capas nos llevó a buscar otras especies de aves para hacer un estudio comparativo. Hemos recibido muestras de ojos de aves del CRAS (Centro de Recuperación de Animales Silvestres) –para realizar un estudio. Las muestras son de distintas rapaces, algunas de hábitos nocturnos como la Lechuza común y el Búho chico y otras de hábitos diurnos como Buzardo ratonero,

Gavilán, Milano real y el Buitre Leonado. Utilizando como herramienta la histología en un primer comparativo se nota diferencias significativas en el grosor de la membrana de Bowman. Las especies diurnas las tienen destacadamente más gruesa que las nocturnas, sobretodo las que alcanzan vuelo muy alto como es el caso de Buitre Leonado que suele volar a una altitud de 1800 – 3500 metros durante horas en busca de animales muertos, recorriendo de 50 a 300km dependiendo de la potencialidad convectiva del día (Gyps fulvus 2011).





Los roedores que son animales herbívoros y tienen como parte de sus hábitos meterse en tocas en el suelo. Ya las aves están todo el tiempo en la superficie terrestre y tienen distintos hábitos de caza de acuerdo con la especie. Por lo tanto, justificaría por su mayor exposición a los rayos UV tener la membrana Bowman más desarrollada como ocurre en otras especies animales y con el humano. Es posible que la membrana de Bowman sea una adaptación evolutiva en los animales y por lo tanto tenga un importante papel en la protección de la cornea contra los efectos de los rayos UV. Pensando en esto hemos diseñado un estudio que compara aves en este caso la gallina que es un animal de hábito de vida diurno, o sea esta expuesta al sol, y es un modelo de cirugía refractiva, por poseer las 5 capas de la córnea al igual que el hombre y guardar las mismas proporciones entre ellas, además tiene la disposición de las fibras de colágeno muy semejantes al humano. (Folwer, et al. 2004) (Boote and al 2008) Con conejos que son animales que tienen hábitos de vida más nocturnos, se meten en madrigueras por el día y están menos expuestos al sol, pero que también son modelos de experimentación para cirugía refractiva y que poseen una membrana de Bowman rudimentaria y muy delgada (Hayashi, Osawa and Tohyama 2002).

Objetivos:

1. Evaluar las diferencias entre las corneas de distintas especies animales caracterizando el aspecto morfológico, óptico e histológico.
2. Comparar los resultados obtenidos de las distintas especies y el hombre.

3. Evaluar el daño corneal de los rayos UVA y UVB en modelos experimentales de cirugía corneal.

Material y métodos:

Grupos de animales: gallinas y conejos.

Se someterán los animales a dosis de radiación UVA, UVA y UVB, UVB con una lámpara (Super-Quiet Xenon Lamp). (Figura 4) Con filtros interpuestos que nos dan cada tipo de radiación por separado. Las dosis serán dadas en días alternados un total de 3 días.

Evaluaremos el daño provocado por cada una de ellas y posibles diferencias. Tanto en el seguimiento clínico como en MO., a través de técnicas de histología.



Figura 4: Diseño de la lámpara que emite la radiación UV.

Resultados preliminares

Hemos realizado dos ensayos preliminares con conejos y gallinas. En el ensayo primero los animales recibieron UV total durante 6 min /día lo que equivaldría aproximadamente a 2 h. 44 min. de exposición al sol/día durante 3 días alternos. En el segundo ensayo los animales recibieron radiación UV-A + UV-B durante 52 min. /día lo que equivaldría a cerca de 17h 36 min. de exposición solar/día por 3 días alternos.

En los análisis histológicos se encontraron signos de inflamación, muerte celular y proliferación como señal de reparación del tejido dañado.

Estas primeras pruebas realizadas en gallinas y conejos expuestos a la misma dosis de UVA y UVB demuestran que hay un daño mucho mayor y en un mayor número de capas en el conejo que en la gallina. Estas diferencias en la respuesta pueden ser debidas, a la lágrima, que parece ser un factor importante en la respuesta, y las diferencias histológicas entre las dos especies. Todavía en estos resultados preliminares el equipamiento no se encontraba en su mejor ajuste y no teníamos totalmente definida la dosis que pretendemos dar en el experimento.

Futuros estudios

Para los futuros estudios queremos tratar cada grupo con un tipo de radiación por separado o en conjunto, ajustar mejor la dosis y el tiempo, así como buscar métodos más conclusivos para verificar si hay cambios en la estructura de la membrana de Bowman como la microscopía electrónica y el Fenton segundo diagnóstico como herramientas de mayor precisión.

Colaboradores:

Adrián Romairone Duarte, Veterinario responsable del Centro de Recuperación de Animales Silvestres de Valladolid, Fundación del Patrimonio Natural de Castilla y León.

Ángel Barcia, Veterinario Responsable del Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid.

Bibliografía

1. A, Bayon, Almela RM, and Talavera J. "Avian Ophthalmology." *EJCAP*, Dec 2007: 253-265.
2. Boote, C, and et al. "Collagen organization in the chicken corneal and structural alterations in the retinopathy, globe enlarged (rge) phenotype -- X-ray diffraction study." *Journal Structural Biology* 161, no. 1 (2008): 1-8.
3. Cejka, Cestmír, et al. "Light Absorption Properties of Rabbit Cornea Repeatedly Irradiated with UVB Rays." *Photochemistry and Photobiology*, 2007: 652-657.
4. Cejková, J, et al. "UV Rays, the Prooxidant/Antioxidant Imbalance in the Cornea and Oxidative Eye Damage." *Physiological Research*, 2004: 1-10.
5. Connon, CJ, Meet K, and Kinoshita S. "Spatial and temporal alterations in the collagen fibrillar array during the onset of transparency in the avian cornea." *Experimental Eye Research*, May 2004: 909-915.
6. De la Cera, EG, Rodriguez G, de Castro A, Merayo J, and Marcos S. "Emmetropization and optical aberrations in a myopic corneal refractive surgery chick model." *Vision Research*, 2007: 2465-2472.
7. Del Pero, RA, et al. "A refractive and histopathologic study of excimer laser keratectomy in primates." *Am Journal Ophthalmology*, 1990: 419-429.
8. Dyce, KM, WO Sack, and CJG Wensing. "Os órgãos dos sentidos; Anatomia das aves." In *Tratado de Anatomia Veterinária*, by KM Dyce, WO Sack and CJG Wensing, 225-235; 537-554. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan S.A., 1990.
9. Folwer W. C., Chang D. H., Roberts B. C., Zarovnyaya E. L., Proia A. D. "A new paradigm for corneal wound healing research: The white leghorn chicken(Gallus gallus domesticus)." *Current Eye Research*, 2004: 28, 4, 241-250.
10. Folwer, WC, DH Chang, BC Roberts, EL Zarovnyaya, and AD Proia. "A new paradigm for corneal wound healing research; The white leghorn chicken (Gallus gallus domesticus)." *Current Eye Research*, 2004: 241-250.
11. Fris, Miroslav, May-Britt Tesem, Jitka Cejková, and Anna Midelfart. "The effect of the single and repeated UVB radiation on rabbit cornea." *Laboratory Investigation*, April 5, 2006: 1680-1687.

12. Gipson, IK, NC Joyce, and JD Zieske. *The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus conjunctiva, and adnexa*. Vol. 4, in *The cornea: Scientific Foundations & Clinical Practice*, by CS Foster, Dt Azar and CH Dohlman, 3-24. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
13. Gumpenberger, M, and G Kolm. "Ultrasonographic and computed tomographic examinations of the avian eye: physiologic appearance, pathologic findings, and comparative biometric measurement." *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 2006: 492-502.
14. Hall, HI, and Ross CF. "Eye shape and active pattern in birds." *Journal of Zoology* 271 (2007): 437-444.
15. Hayashi, S, T Osawa, and K Tohyama. "Comparative Observations on Corneas, With Special Reference to Bowman's Layer and Descemet's Membrane in Mammals and Amphibians." *Journal of Morphology*, 2002: 254:254-247.
16. Karfarnik, C, J Fritsche, and S Reese. "I vivo confocal microscopy in the normal corneas of cats and birds." *Veterinary Ophthalmology*, 2007: 222-230.
17. kolozsvári, Lajos, Antal Nógrádi, Béla Hopp, and Zsolt Bor. "UV absorbance of the Human Cornea in the 240- to 400nm Range." *IOVS*, July 2002: 2165-2168.
18. Martínez-García, MC, J Merayo-Llodes, T Blanco-Mezquita, and S Mar-Sardaña. "Wound healing following refractive surgery in hens." *Experimental Eye Research*, 2006: 728-735.
19. Merayo-Llodes, J, B Yanes, A Mayo, R Martin, and JC Pastor. "Experimental model of corneal haze in chickens." *Journal Refractive Surgery* 17 (2001): 696-699.
20. *Ministério de Ciência e Tecnologia/ BRA- Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais.satelite@cptec.inpe.br. http://satelite.cptec.inpe.br/uv/O_que_e_IUV.html.*
21. Mohan, RR, et al. "Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK." *Experimental Eye Research*, 2003: 71-87.
22. Ott, M, and F Schaeffel. "A negatively powered lens in the chameleon (Letter)." *Nature*, 1995: 692-694.
23. Podskochy, A, L Gan, and P Fagerholm. "Apoptosis in UV- exposed Rabbit Corneas." *Cornea*, 2000: 99-103.

24. Podskochy, Alexander. "Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage." *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 2004: 714-717.
25. Power, WJ, AH Kaufman, J Merayo-Llolves, V Arrunategui-Correa, and CS Foster. "Expression of collagens I, III, IV and V mRNA in excimer wounded rat cornea: analysis by semi-quantitative PCR." *Current Eye Research*, 1995: 879-886.
26. Quantoch, AJ, C Boote, V Siegler, and KM Meek. "Collagen Organization in the Secondary Chick Cornea during Development." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003: 130-136.
27. Ralf, Michael, and Brismar Hjalmar. "Growth and Protein Density in the Rat lens after in vivo exposure to Ultraviolet Radiation." February 2001: 402-408.
28. Rogers, Christian S., Lai-Man Chan, Yolanda S. Sims, Krashod D. Byrd, Danielle L. Hinton, and Sally S. Twining. "The effects of sub-solar levels of UV-A and UV-B on rabbit corneal lens epithelial cells." *Experimental Eye Research*, 2004: 1007-1014.
29. Ross, HM, IG Kayle, and W Pawlina. "El Ojo." In *Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular*, by HM Ross, IG Kayle and W Pawlina, 790-821. Madrid, Madrid: Ed. Médica Panamericana, 2005.
30. Spencer, WH. "Cornea." In *Ophthalmic Pathology: An Atlas and Textbook*, by WH Spencer, 157-333. Philadelphia: W B Saunders Company, 1996.
31. Zigman, Seymour, Thurma McDaniel, Joanne B. Schultz, John Reddan, and Mohsen Meydani. "Damage to cultural lens epithelial cells of squirrels and rabbits by UV-A (99,9%) plus UV-B (0,1%) radiation and alpha tocopherol protection." *Molecular and cellular Biochemistry*, 1995: 33-46.