



TESIS DOCTORAL

**PROPIEDADES PROTECTORAS DEL SVS18 EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO
ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES**

**María D. García Manzanares
2004**

**Departamento de Patología y Cirugía
División de Oftalmología
Universidad Miguel Hernández**



**PROPIEDADES PROTECTORAS DEL SVS18 EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO
ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES**

Presentada por:

María D. García Manzanares

Directores:

Prof. Jorge L. Alió y Sanz

Dr. Alberto Artola Roig

Dr. José I. Belda Sanchis



El **Prof. Jorge L. Alió y Sanz**, catedrático de Oftalmología de la facultad de medicina de la Universidad Miguel Hernández; **Dr. Alberto Artola Roig**, profesor titular de Oftalmología de la facultad de medicina de la Universidad Miguel Hernández; **Dr. José I. Belda Sanchis**, doctor en medicina y profesor Colaborador honorífico de Oftalmología de la facultad de medicina de la Universidad Miguel Hernández.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “**Propiedades protectoras del SVS18 en un modelo experimental de daño endotelial por radicales libres**”, ha sido realizada bajo su dirección por la Licenciada en Medicina y Cirugía, **Dña. María D. García Manzanares**, y que dicho trabajo reúne los requisitos suficientes y condiciones necesarias para ser defendido en público y optar al grado de Doctor en Medicina.

Y, para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sant Joan d’Alacant, a siete de enero del dos mil cuatro.

Fdo: Prof. Jorge L. Alió y Sanz

Fdo: Prof. Alberto Artola Roig

Fdo:Dr. José I. Belda Sanchis



A Jose

A David y Pablo

A mi familia



AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Jorge L. Alió y Sanz, director y promotor de esta tesis, por haber puesto a mi disposición todos los recursos materiales y humanos necesarios para que esta tesis viera la luz. Su apoyo incondicional a la investigación básica y su ilusión porque nuevos doctorandos finalicen sus tesis doctorales demuestra su espíritu inquieto e infatigable, enriqueciendo así a la comunidad científica y a la Universidad.

Al Profesor Alberto Artola, compañero y amigo de las “sufridas” guardias de puertas, por poner a nuestra disposición sus conocimientos y habilidades quirúrgicas, así como por sus ideas y aportaciones en la elaboración de esta monografía.

A los Doctores Haroun y Hassanein por su indispensable y desinteresada colaboración en todo el proceso de obtención de muestras. Mi deseo es que esta simbiosis investigadora con la División de Oftalmología, tan fructífera hasta la fecha, pueda seguir funcionando en un futuro.

A D. José Antonio Pérez de Gracia, veterinario de la Universidad Miguel Hernández, por su gran pericia en el proceso de anestesiarse y eutanasiarse a nuestros “pacientes”, y por su eficaz y rápida ayuda en todo cuanto hemos precisado para concluir este estudio.

A la Dra. Consuelo Ferrer, por su valiosa e insustituible ayuda en la preparación de las tinciones y de la técnica de la espectrofotometría.

A la Dra. María Miranda por su eficaz y valiosa ayuda en la investigación “*in vitro*”, pues sin su desinteresada colaboración esta tesis no hubiera sido completada.

A los profesores Javier Romero y Paco Bosch, que me abrieron las puertas de su departamento introduciéndome en el apasionante mundo de la investigación básica y de los radicales libres, con los que espero seguir colaborando en proyectos futuros.

A D. Santiago Aniceto, ahora más que nunca nuestro “estadístico de cabecera”, por su ayuda en la revisión de los datos de esta monografía.

Al Dr. José Belda, compañero y amigo en mi camino, sin cuyo estímulo, capacidad de trabajo y sacrificio personal, esta monografía nunca habría visto la luz.

A Daniel Tornero, mi jefe e iniciador en mi vida de profesor Universitario, por su constante apoyo dentro y fuera del trabajo, y sobre todo, por ser una gran persona, faceta suya de la cual más he intentado aprender.

A mis padres, guía e incondicional apoyo en mi vida.





ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS

PRESENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN.....1

INTRODUCCIÓN.....6

I.- FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES.....6

I.1.- LA TOXICIDAD DEL OXÍGENO.....6

I.1.1.- Radicales libres6

I.2.- ESTRÉS OXIDATIVO7

I.3.- LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA7

I.3.1.- Productos de la peroxidación de lípidos8

I.4.- DEFENSA ANTIOXIDANTE11

I.4.1.- Sistemas antioxidantes de importancia biológica11

I.4.2.- El sistema glutatión11

I.5.- OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ANTIOXIDANTES16

I.5.1.- Catalasas de los peroxisomas16

I.5.2.- Actividad DT-diaforasa17

I.5.3.- Actividad superóxido dismutasa.....17

I.6.- OTROS ANTIOXIDANTES NATURALES.....17

I.7.- ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS19

I.8.-APOPTOSIS.....20

I.8.1.- Apoptosis y estrés oxidativo.....21

I.8.2.- Las proteínas de la familia bcl-2.....21

II.- BASES MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DEL ESTUDIO24

II.1.- LA Córnea.....24

II.1.1.- Anatomía de la córnea.....24

II.1.2.- Fisiología de la córnea.....28

II.1.3.- Composición de la cornea.....29

II.1.4.- Envejecimiento de la córnea.....30

II.2.- EL CRISTALINO.....	31
II.2.1.- Anatomía del cristalino	31
II.2.2.- Fisiología del cristalino	33
II.2.3.- Composición del cristalino	34
II.2.4.- Envejecimiento del cristalino	35
II.3.- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DIFERENCIALES DE LA CÓRNEA Y DEL CRISTALINO DEL CONEJO.....	36
II.3.1.- La córnea del conejo.....	37
II.3.2.- El cristalino del conejo.....	38
III.- FISIOPATOLOGÍA Y TRATAMIENTO DE LA CATARATA	39
III.1.- LA CATARATA: CONCEPTO.....	39
III.2.- CATARATAS Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	39
III.3.- ETIOLOGÍA DE LA CATARATA.....	41
III.4.- TIPOS DE CATARATA.....	43
III.5.- CLÍNICA DE LA CATARATA.....	46
III.6.- TRATAMIENTO DE LA CATARATA.....	47
III.6.1.- Tratamiento médico.....	47
III.6.2.- Tratamiento quirúrgico.....	47
III.6.3.- Agentes viscoelásticos.....	61
III.6.4.- Expectativas futuras.....	67
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	69
MATERIAL Y MÉTODOS	71
<i>I.- ESTUDIO IN VITRO DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENADOS DE RETINA BOVINA.....</i>	<i>71</i>
I.1.- APARATOS	71
I.2.- PRODUCTOS ESTUDIADOS	71

I.3.- DISEÑO DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	72
I.3.1.- Objetivo.....	72
I.3.2.- Grupos experimentales	72
I.3.3.- Diseño del estudio.....	73
I.3.4.- Obtención y preparación de la muestra de retina bovina.....	73
I.3.5.- Determinación de Malondialdehído.....	73
II.-ESTUDIO IN VIVO DE LAS PROPIEDADES PROTECTORAS DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES.....	77
II.1.-APARATOS	77
II.2.- PRODUCTOS ESTUDIADOS	78
II.3.- DISEÑO DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	78
II.3.1.- Objetivos.....	78
II.3.2.- Grupos experimentales	79
II.3.3.- Diseño del estudio.....	79
II.3.4.- Medidas tomadas para minimizar sesgos.....	86
II.4.- TÉCNICAS UTILIZADAS.....	87
II.4.1.- Descripción de productos de investigación.....	88
II.4.2.- Instrumentos para manejar los materiales.....	89
II.4.3.- Animales, agricultura, dieta, anestesia y eutanasia.....	89
II.4.4.- Evaluación intra-quirúrgica	92
II.4.5.- Preparación de la solución de peróxido de hidrógeno.....	92
II.4.6.- Técnica de fotometría de absorción de Janus Green.....	95
III.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	102

RESULTADOS.....103

I.- ESTUDIO IN VITRO DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENADOS DE RETINA BOVINA.....103

II.- ESTUDIO IN VIVO DE LAS PROPIEDADES PROTECTORAS DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES.....105

DISCUSIÓN.....133

I.- ESTUDIO IN VITRO DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENADOS DE RETINA BOVINA.....133

II.- ESTUDIO IN VIVO DE LAS PROPIEDADES PROTECTORAS DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES.....135

CONCLUSIONES.....143

BIBLIOGRAFÍA144



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADP: Adenosín difosfato.

AH: Ácido hialurónico.

AV: Agudeza visual.

BSS: Balanced Saline Solution (Solución salina balanceada).

CA: Cámara anterior

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno.

CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

CS: Condroitín Sulfato.

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad.

DR: Desprendimiento de retina.

EECC: Extracción extracapsular de cristalino

EICC: Extracción intracapsular de cristalino.

EPR: Epitelio pigmentario de la retina.

GSH: Glutación.

GSH-Px: Glutación peroxidasa.

GSSG: Glutación disulfuro.

GST: Glutación S transferasa.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno (agua oxigenada).

HDL: Lipoproteínas de alta densidad.

HE: Healon®

4-HNE: 4-hidroxinonal.

HPMC: Hidroxipropil metilcelulosa.

HS: Hialuronato de sodio.

IC: Intervalo de confianza.

LDL: Lipoproteínas de baja densidad,

LIO: Lente intraocular.

LSR: Líquido subretiniano.

MDA: Malondialdehído.

MICS: Cirugía de catarata de microincisión (Micro-Incision Cataract Surgery).

NADPH: Fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido.

NS: No significativo.

·OH: Radical hidroxilo.

O₂⁻: Anión Superóxido.

OD: Ojo derecho.

OI: Ojo izquierdo.

OVSD: Instrumentos Oftálmicos viscoquirúrgicos (Ophthalmic Visco-Surgical Device).

PG: Proteoglicanos.

PIO: Presión Intraocular.

PPL: Productos de peroxidación lipídica.

TBA: Ácido tiobarbitúrico.

TBARS: Sustancias reactivas con el ácido tiobarbitúrico.

UGH: Uveítis, Glaucoma e Hifema.

VC: Viscoat[®]

VES: Sustancia viscoelástica.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.



PRESENTACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

I.- IMPORTANCIA DEL PROBLEMA ABORDADO

La inflamación corneal es un fenómeno complejo en el que participan múltiples agentes que coordinadamente y por vías fisiopatológicas diferentes van a producir una alteración en el estroma, epitelio o endotelio corneal, provocando la aparición de un gran número de secuelas que en su conjunto van a afectar la transparencia de la córnea y a alterar por tanto su función.

Entre los mecanismos por los cuales la inflamación causa sus efectos, uno de los que presenta mayor interés es la acción tóxica que produce la aparición de radicales libres derivados del oxígeno sobre la córnea.

Los radicales libres se producen como consecuencia de la activación de las cadenas respiratorias y fundamentalmente, aunque no exclusivamente, vienen a producirse en los leucocitos polimorfonucleares cuando en estos ocurre la denominada "explosión respiratoria". Así mismo, los radicales libres aparecen en la activación de la cascada del ácido araquidónico, tanto como productos de su metabolismo, como agentes necesarios para generar endoperóxidos cíclicos. Igualmente aparecen en otros pasos del proceso inflamatorio y en otras situaciones como en la necrosis tisular ocasionada por la microcirugía ocular (Dorey *et al.*, 1989).

La explosión respiratoria conduce a la aparición de radicales libres O_2^- , $\cdot OH$, en la córnea, que van a tener una acción lítica tanto sobre la membrana celular -por mecanismos de peroxidación lipídica-, como también sobre estructuras colágenas del estroma corneal (Nirankar *et al.*, 1981).

De acuerdo con lo mencionado, los radicales libres van a ejercer por tanto una acción tóxica sobre la córnea. No obstante, aún no se conoce ni la importancia ni la trascendencia que tiene la aparición de estos radicales libres en la cornea, tanto en el papel que estos juegan en la inflamación como en cuanto a las secuelas que aparecen tras la misma.

Hoy en día la operación de cataratas es el procedimiento quirúrgico más frecuente. Una de las condiciones más importantes para el éxito de la intervención de catarata, a juicio de los cirujanos es mantener una cámara anterior profunda, sobre todo para facilitar la inserción de la lente intraocular. Esta condición es esencial para la manipulación microquirúrgica en el segmento anterior del ojo, espacialmente limitado, y finalmente sirve para proteger las células del endotelio corneal. (Dick y Schwenn, 2000).

Durante la facoemulsificación, la punta de la sonda oscila a una frecuencia ultrasónica. Estas longitudes de onda ultrasónicas atraviesan el humor acuoso que genera una cavitación con burbujas diminutas que se extienden y condensan liberando energía y calor (Holst *et al.*, 1993). La energía y calor liberados originan la formación de radicales libres sumamente reactivos que pueden dañar las células del endotelio corneal (Dick y Schwenn, 2000; Cameron *et al.*, 2001; Artola *et al.*, 1993). El peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) normalmente se encuentra a niveles sumamente bajos en el humor acuoso (0.025 mM). Sin embargo, se ha demostrado que niveles de peróxido superiores a 0.3- 0.5 mM son tóxicos para el endotelio y producen edema corneal (Artola *et al.*, 1993).

Ya ha sido demostrado el efecto anti-radical libre de los productos con ácido hialurónico (AH). Sin embargo, el efecto anti-radical libre del AH va seguido de una rotura de moléculas, reduciendo así el efecto protector del AH sobre el endotelio corneal (Greenwald RA y Moy WW, 1980; Deguine *et al.*, 1998). Para implementar el efecto antioxidante del AH, se ha postulado que la adición de sustancias aceptoras de radicales libres podría mejorar la acción protectora del viscoelástico. Existe pues, una nueva generación de VES (SVS18 en nuestro estudio) que contiene manitol -un aceptor de radicales libres-, que protegería al endotelio frente al estrés oxidativo producido durante la facoemulsificación del núcleo (Riesz y Kondo, 1992; Shimmura *et al.*, 1992). De esta forma unimos las propiedades antioxidantes y de barrera mecánica del AH a una doble protección antioxidante, manteniendo las características físico-químicas del AH a lo largo de la cirugía. El uso de estos VES puede estar justificado en aquellos pacientes que presentan cataratas hiper maduras, con núcleos muy duros, y que requieren un tiempo de facoemulsificación muy prolongado con abundante producción de radicales libres, así como

en pacientes que de por sí presentan una patología endotelial (p.e. una distrofia endotelial de Fuchs) que necesiten de una protección endotelial mayor.

El objetivo de este estudio es evaluar las propiedades protectoras endoteliales del SVS18 frente a dos productos existentes y clínicamente probados (Healon[®] y Viscoat[®]), en presencia de estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Este estudio se llevará a cabo según modelo experimental descrito en la literatura (Artola *et al.*, 1993).

II.- CONOCIMIENTOS PREVIOS DEL TEMA

II.1.- Resultados de estudios no-clínicos que son pertinentes al ensayo

II.1.1.- Efecto Protector después de la exposición a los radicales libres en el endotelio corneal.

Artola y colaboradores (Artola *et al.*, 1993) investigaron la protección de células del endotelio con Hialuronato Sódico (HS) en un modelo experimental de daño al endotelio corneal del conejo, después de la inyección intracamerular de diferentes concentraciones de H₂O₂ (0.1, 1, 10 y 100 mM), en tres grupos: BSS (control), HS (Healon[®]) y una solución de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 2%. Los autores observaron un daño al endotelio dosis-dependiente en los grupos control. Los grupos experimentales protegidos con HS o HPMC mostraron significativamente menor daño endotelial corneal (p<0.001) que el grupo control para todas las concentraciones de H₂O₂ usadas. El producto HS mostró propiedades protectoras superiores que HPMC a concentraciones de H₂O₂ de hasta 100mM. Estos resultados sugerían que el HS podía ser más eficaz que la HPMC protegiendo el endotelio frente a los radicales libres en " la facoemulsificación traumática ".

En otros estudios similares se demostró que concentraciones de HS al 1% y 1.4% son suficientemente eficaces para proteger a las células del endotelio del daño oxidativo causado por radicales libres (Holst *et al.*, 1993; Alpar, 1986). Para prevenir el daño ultrasónico, la concentración (número de moléculas/ unidad de volumen) de hialuronato de sodio es más importante que el peso molecular (Presti y Scott, 1994).

II.1.2.- *Estudio de toxicidad aguda después de la inyección intra-ocular.*

Se llevó a cabo un estudio intraocular con SVS18 en 10 conejos albinos tipo Nueva-Zelanda. Este estudio consistió en sustituir 200 μ L de humor acuoso del ojo derecho por 200 μ L de SVS18. El ojo izquierdo se usó como control y se trató de acuerdo al mismo protocolo, sólo que se re-inyectó los 200 μ L del humor acuoso quitados del mismo ojo. Los parámetros siguientes se evaluaron al inicio, 2, 12, 24 y 72h después de la re-inyección:

- Examen en lámpara de hendidura para valorar el estado de los siguientes tejidos oculares: conjuntiva palpebral, conjuntiva bulbar, iris y córnea.
- Efecto Tyndall .
- Examen del fondo de saco conjuntival.
- Estado general y reacción a los estímulos
- Tonometría ocular.

Al final de la fase *in vivo*, se sacrificaron los conejos y se llevó a cabo la histología en los tejidos siguientes: conjuntiva, membrana nictitante, córnea, iris, cuerpo ciliar y retina. No hubo ninguna diferencia significativa en los parámetros evaluados al inicio. El SVS18 no provocó ningún cambio en los parámetros evaluados para la tolerancia del producto. No se encontró ninguna diferencia significativa ($p < 0.05$) en la toxicidad comparado con los ojos control. No se observó edema en ninguno de los tejidos examinados y no hubo ninguna diferencia significativa ($p < 0.05$) en los cambios en el iris de los ojos examinados. No se observó daño corneal en ningún grupo y no se observó ninguna diferencia significativa ($p < 0.05$) en el efecto de Tyndall entre ambos grupos.

Se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la presión intraocular (PIO) al inicio comparado con en el grupo SVS18 a las 2h (15.2 ± 0.24 y 25.7 ± 0.57 mmHg, respectivamente), así como en el grupo control (15.3 ± 0.21 y 24.3 ± 0.21 mmHg, respectivamente), y los valores volvieron a la línea basal a las 12h. No se observó ninguna diferencia significativa ($p < 0.05$) en la PIO entre los grupos en ningún momento.

Los trabajos anteriores relacionan el efecto de los radicales libres aparecidos durante la cirugía del segmento anterior (especialmente en la extracción de cataratas) con las complicaciones que pueden aparecer durante la misma, o bien en el postoperatorio inmediato o tardío (secuelas), como es el edema corneal.

Estas complicaciones, que hasta el momento se atribuían a procesos inflamatorios o al mismo traumatismo quirúrgico, posiblemente pueden deberse a la acción directa de los radicales libres sobre el endotelio corneal y el iris al encontrarse presentes en concentraciones supraumbrales en la cámara anterior del ojo durante y después del acto quirúrgico.

El presente trabajo, tiene pues su justificación en los escasos conocimientos específicos, existentes hasta el presente, sobre la toxicidad corneal que producen los radicales libres aparecidos en el contexto de procesos oxidativos y/o inflamatorios tanto de la córnea como en la cirugía del segmento anterior del ojo. Además, pretende demostrar el efecto protector de determinadas sustancias antioxidantes en el acto quirúrgico de la facoemulsificación de la catarata. Las importantes implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas que tiene la intervención de los radicales libres en la agresión corneal convierten este tema, además de novedoso, en un argumento de potencial importancia en cuanto a sus posibles implicaciones clínicas.



INTRODUCCIÓN

I.- FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES

I.1.- LA TOXICIDAD DEL OXÍGENO

Tras años de anaerobiosis, en los cuales los primeros organismos utilizaban la luz como único medio de obtener la energía, la aparición del oxígeno en la atmósfera constituyó un importante avance en la evolución en cuanto a economía energética y material, siendo de hecho un prerrequisito para el desarrollo de las especies animales, entre las cuales se incluye la especie humana. Sin embargo, actualmente se conocen muchos estados patológicos que pueden relacionarse con efectos tóxicos del oxígeno: la lesión radioactiva (Kosower y Kosower, 1978), la hiperoxia (Jamieson *et al.*, 1986), la inflamación (McCord, 1987), enfermedades como la diabetes (Hermenegildo *et al.*, 1993) y lesiones tisulares debidas a isquemia y reperusión (Flaherty y Weisfeldt, 1988), junto con otras muchas enfermedades (Cadenas, 1989; Sies, 1985).

I.1.1.- RADICALES LIBRES

Algunas células están expuestas a sufrir alteraciones oxidativas dependiendo de sus necesidades de oxígeno (Ernster, 1986), siendo el daño biológico infringido sobre compuestos químicos de cualquier clase, ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos libres, lípidos y carbohidratos (Sies, 1985).

Existe un gran número de reacciones, enzimáticas o no, que tienen lugar durante la vida celular aeróbica, capaces de generar radicales libres.

Llamamos radicales libres a aquellas moléculas que poseen en su órbita externa un electrón desapareado. Los radicales libres son generados por la reducción monoelectrónica u oxidación de moléculas que inicialmente contienen pares de electrones con espines opuestos (Flaherty y Weisfeldt, 1988). A menudo, la partícula es un átomo de oxígeno, por la facilidad que tiene éste para transformarse en radical (Miquel *et al.*, 1989), formándose entonces radicales libres derivados del oxígeno, como son, el anión superóxido ($O_2\cdot^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Ernster, 1986; Flaherty y Weisfeldt, 1988).

Los radicales libres en virtud de ese electrón desapareado son muy inestables y altamente reactivos (Flaherty y Weisfeldt, 1988), pudiendo interaccionar rápidamente con macromoléculas biológicas, muchas de ellas vitales para los seres vivos (e.g. proteínas, oxidándolas y formando agregados moleculares mayores; ácidos nucleicos como el DNA, en el que producen mutaciones; o lípidos de la membrana plasmática celular, provocando su peroxidación), convirtiéndose por tanto en tóxicos celulares.

I.2.- ESTRÉS OXIDATIVO

Se denomina así a la situación de desequilibrio que se produce entre los mecanismos prooxidantes y antioxidantes de la célula a favor de los primeros (Sies, 1985). En respuesta al estrés oxidativo se puede producir, como se mencionaba anteriormente, daño a diversas moléculas celulares. Cuando ésta afecta a lípidos ocurre su peroxidación, y parte de los productos tóxicos que se producen durante ésta, como algunos aldehídos, pueden generar en último término un daño celular (Esterbauer *et al.*, 1991).

I.3.- LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Este proceso consiste en el deterioro oxidativo de las grasas, oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos insaturados. Dicho proceso está envuelto en la patogénesis del daño hepático, en anemias hemolíticas y en lesiones pulmonares debidas a sustancias químicas terapéuticas y ambientales (Sevanian y Hochstein, 1985).

Los mecanismos por los cuales la peroxidación de lípidos causa alteración celular, son básicamente tres:

- i) La alteración de los lípidos de la membrana puede hacer perder la función de ésta, y alterar los enzimas de la misma.
- ii) Los radicales libres altamente reactivos generados en el proceso de peroxidación pueden atacar e inactivar enzimas y otros elementos celulares.
- iii) La degradación de los lípidos de la membrana puede inducir la formación de aldehídos reactivos y otros compuestos que son tóxicos por sí mismos, los cuales tienen una vida media relativamente larga en comparación con los radicales libres reactivos. Estos aldehídos pueden ser los responsables de los

efectos a larga distancia promovidos por la peroxidación de lípidos (Esterbauer *et al.*, 1991).

Como consecuencia de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados se forman los peróxidos de ácidos grasos o hidroperóxidos. Estos compuestos son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que inician a su vez nuevas cadenas de peroxidación (Witz, 1989). La peroxidación de lípidos es un fenómeno que puede conducir a la muerte celular, pero también induce la formación de intermediarios derivados de los lípidos (figura I.1).

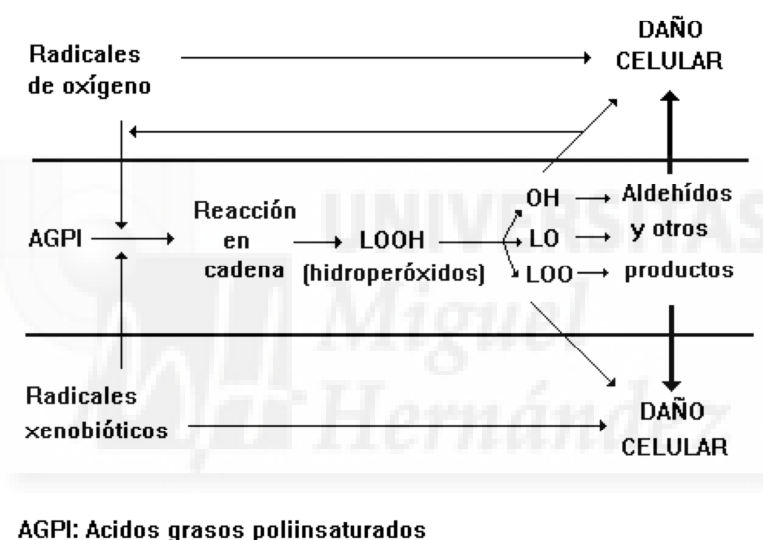


Figura I.1. Mecanismos que participan en la peroxidación de lípidos

1.3.1.- PRODUCTOS DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

Los efectos biológicos de estos derivados de la peroxidación de lípidos son muy variables, en especial cuando se consideran los mediadores de la inflamación, que son productos de la peroxidación del ácido araquidónico (Bazan, 1990).

Otro grupo de productos de la peroxidación lipídica, presentan efectos tóxicos en diferentes componentes de la célula, y son eliminados del tejido donde se han formado a través del torrente sanguíneo o por conjugación. Dentro de este grupo se incluyen una serie de aldehídos que pueden actuar como "mensajeros tóxicos secundarios"

amplificando la acción de los radicales libres iniciales, ya que, estos aldehídos, al contrario de lo que les ocurre a los radicales libres iniciales, poseen una vida media mucho más larga, y pueden por lo tanto difundir desde su lugar de producción y alcanzar y dañar células o tejidos situados a cierta distancia del punto donde se originó la situación de estrés oxidativo. La sangre constituye el principal vehículo por el que circulan estos aldehídos generados endógenamente, y suponen la expresión de la magnitud del daño celular, implicándose en la fisiopatología de dicha enfermedad.

Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados han sido el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos, en particular el 4-hidroxi-nonenal (HNE) y el 4-hidroxi-hexenal (Esterbauer *et al.*, 1991).

I.3.1.1.- Malondialdehído (MDA)

El MDA es una molécula volátil de bajo peso molecular (PM=72,07) que resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico.

Desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han sido involucradas causalmente en la patogénesis de algunas enfermedades humanas, la determinación de remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, en sangre o suero humanos, ha recibido considerable atención. Hasta ahora se han utilizado distintas técnicas para medir esta molécula, basadas todas ellas en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico, denominando a este conjugado como TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances).

Sin embargo en la determinación de este producto de peroxidación existe un factor a tener muy en cuenta, y es precisamente la técnica empleada. A modo de ejemplo en un reciente estudio de Esterbauer (Esterbauer *et al.*, 1991), se puede observar como el nivel de remanentes de la peroxidación de lípidos (MDA ó TBARS) en plasma de sujetos sanos puede variar según la técnica empleada desde 0.0 (indetectable) hasta 47.2 nmol/mL (Higueras *et al.*, 1994; Largilliere y Melancon, 1988; Aznar *et al.*, 1983). El problema reside fundamentalmente en que el nivel de MDA o TBARS detectado por algunas técnicas proviene, además de la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados, de la de otros productos (como azúcares, aminoácidos, aldehídos, ácidos orgánicos, etc.) (Janero, 1990). La literatura ha señalado a la determinación de

MDA por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) como una de las más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica.

I.3.1.2.- 4-hidroxicualquenes

Son otros productos formados durante la peroxidación de ácidos grasos insaturados. Cuando la peroxidación es del ácido linoleico, gamma linoleico y araquidónico, la mayor proporción de aldehídos formados, corresponde al 4-hidroxicinalenal (Esterbauer *et al.*, 1991).

Son sustancias altamente reactivas que reaccionan con biomoléculas, especialmente con aquellas que poseen grupos sulfhidrilo, como la cisteína, el glutatión, el coenzima A y las proteínas o enzimas que contienen grupos -SH (Esterbauer *et al.*, 1991). Entre sus propiedades biológicas cabe destacar su citotoxicidad, actividad de inhibición del crecimiento, genotoxicidad, actividad quimiotáctica y su potencial papel en la aterogénesis.

De los aldehídos identificados hasta ahora, el 4-hidroxicinalenal muestra la más alta actividad frente a biomoléculas importantes, y es el más citotóxico (Benedetti *et al.*, 1980), asociado con enfermedades humanas y en modelos experimentales (Esterbauer, 1993; Selley *et al.*, 1992). Recientemente se le han atribuido propiedades más fisiológicas en la modulación de la actividad celular (Esterbauer *et al.*, 1991). Entre otras, se ha propuesto la capacidad del 4-HNE de activar mecanismos de señalización celular como la fosfolipasa C (Rossi *et al.*, 1990) o D (Natarajan *et al.*, 1993). También se ha demostrado la relajación vascular, mediada por el endotelio, inducida por 4-HNE en arterias cerebrales (Martínez *et al.*, 1994) y mesentéricas humanas (Romero *et al.*, 1997), y otras acciones en diversos lechos vasculares (Van Der Kraaij *et al.*, 1990).

El 4-HNE es capaz de reaccionar con el glutatión (GSH) de forma espontánea, pero intracelularmente esta reacción podría estar catalizada por isoformas específicas de las GSH S-transferasas (Jensson *et al.*, 1986; Danielson *et al.*, 1987). Además, la reacción de este aldehído con otros aminoácidos residuales de las proteínas puede eventualmente conducir a la inactivación de su actividad enzimática. Por ejemplo, en la insulina produce una modificación de los residuos de histidina (Uchida y Stadtman, 1992), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se inactiva debido a una modificación selectiva de un residuo activo de lisina (Szweda *et al.*, 1993) y la inhibición de la

Na^+, K^+ -ATPasa se debe probablemente a la interacción de este aldehído con los grupos sulfidrilos (Siems *et al.*, 1996).

I.4.- DEFENSA ANTIOXIDANTE

I.4.1.- SISTEMAS ANTIOXIDANTES DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA

La prevención del daño ocasionado por los sistemas oxidantes la realizan los sistemas antioxidantes. Las células están equipadas con mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que previenen la aparición o hacen desaparecer esas especies activadas del oxígeno u otros radicales.

Estos sistemas incluyen los agentes antioxidantes, proporcionados o no por la dieta (vitaminas C y E, sistema glutatión, etc.) , los enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamados así por inactivar directamente especies activadas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.), y los enzimas con actividad oxidantes secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glutatión S-transferasa, respectivamente.) (Sies, 1991).

I.4.2.- EL SISTEMA GLUTATIÓN

I.4.2.1.- Glutatión

El glutatión es un tripéptido (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos de sus características estructurales (figura I.2):

- i) El enlace γ -glutamilo que lo protege de las peptidasas por el que sólo puede ser atacado por la γ -glutamil-transpeptidasa.
- ii) La presencia de un grupo tiol libre (-SH) perteneciente a la cisteína. Gracias a éste, el glutatión es extraordinariamente reactivo para con las sustancias tóxicas o no, naturales o exógenas a la célula e incluso para consigo mismo (Meister y Anderson, 1983). Es el tiol no proteico más abundante de prácticamente todas las células animales (Viña *et al.*, 1986) y su presencia se puede explicar en

función de su protección frente a la toxicidad del oxígeno (Fahey *et al.*, 1987).

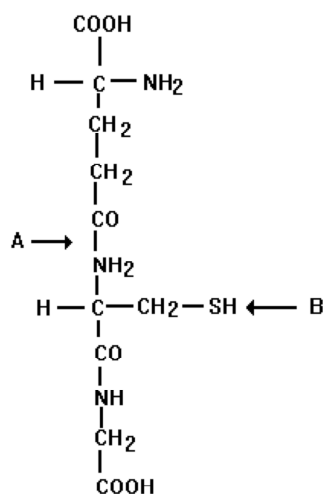


Figura I.2. Fórmula química desarrollada del glutatión

A: Enlace gamma-glutamilo. B: Grupo tiol libre.

Se considera **estado del glutatión** al sistema donde existe un equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower y Kosower, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. El término estado no implica unos valores constantes para el glutatión, sino que estos quedan supeditados a las alteraciones del sistema.

Se denomina **sistema glutatión** ([figura I.3](#)) al conjunto formado por el glutatión y los enzimas relacionados con su metabolismo, que son responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister y Anderson, 1983).

I.4.2.2.- Papel protector del glutatión

Se realiza a muchos niveles, entre los cuales nos interesa en especial la inactivación de radicales libres, el mantenimiento de la integridad celular y la protección frente a la peroxidación de lípidos.

En el mantenimiento de la integridad celular, el glutatión actuaría interceptando radicales libres e impidiendo entre otras la peroxidación de los lípidos de la membrana celular.

Un ejemplo, lo podemos encontrar en la formación de la catarata. En la mayoría de casos, los factores cataratógenos acaban produciendo una disminución del glutatión y de los enzimas antioxidantes con él relacionados, en algunos casos de hasta el 70% de sus niveles (Navea et al., 1992). Esta disminución permitiría que los radicales libres provocaran modificaciones oxidativas en las proteínas o lípidos del cristalino, con pérdida de la transparencia del mismo. Se han encontrado en cristalinos cataratosos actividades enzimáticas relacionadas con el glutatión menores que las descritas en cristalinos sanos (Romero et al., 1989).



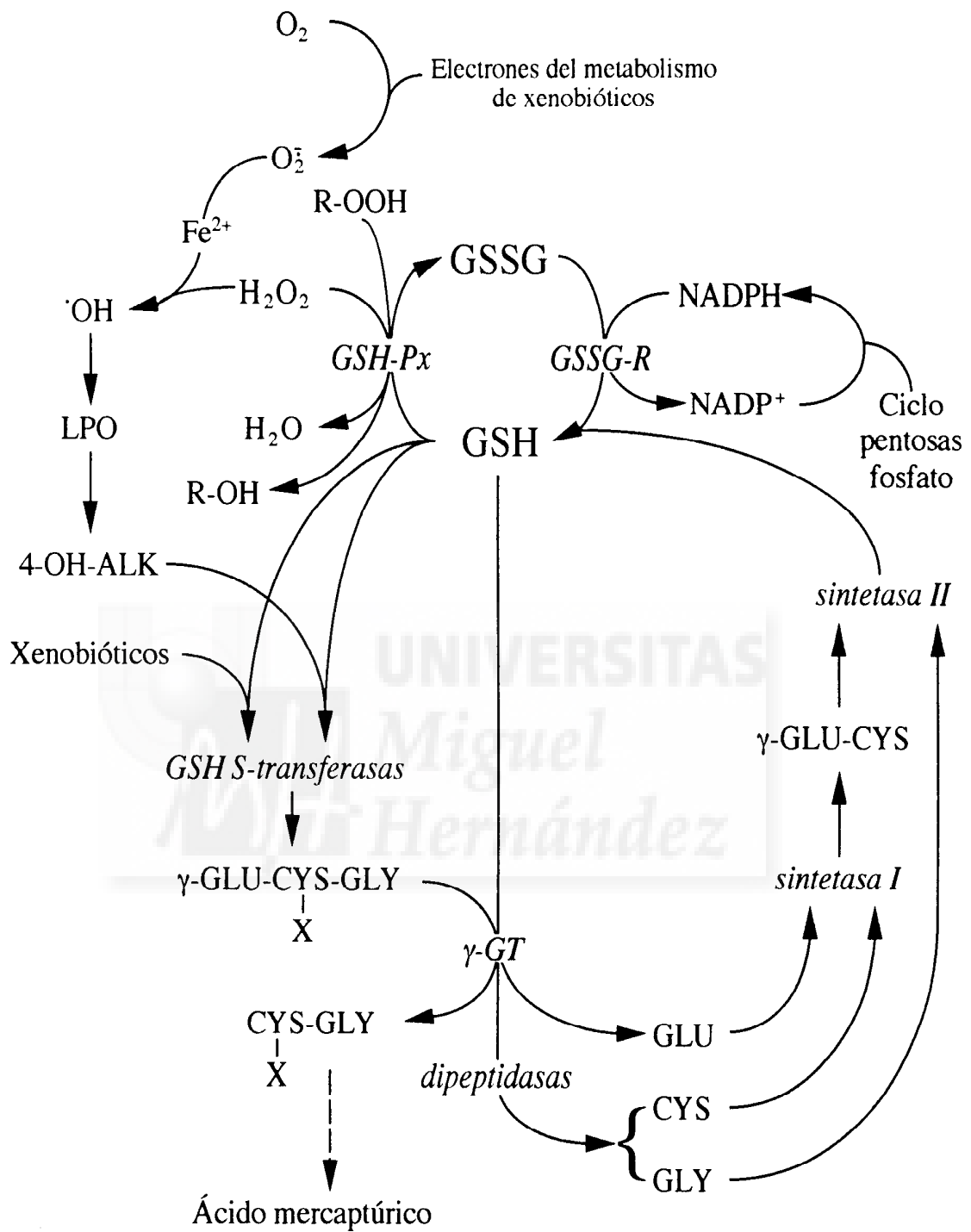


Figura I.3. Representación del sistema glutati6n.

I.4.2.3.- Actividades enzimáticas relacionadas con el glutatión

I.4.2.3.1.- Actividad glutatión S-transferasa

Representa la actividad de un conjunto de enzimas muy versátiles que están envueltos en la detoxificación de multitud de compuestos productos del metabolismo oxidativo (Habig, 1983).

Las GSH S-Transferasas tienen actividad, entre otras, frente a:

- 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB): éste es un sustrato de amplio espectro para las transferasas, ya que presenta una actividad alta cuando para otros sustratos esta es mínima o inexistente.
- 4-Hidroxinonenu (4-HNE): es un producto de la peroxidación de los lípidos y activo sustrato para las GSH S-Transferasas.

La reacción que catalizan este grupo de enzimas, supone la inactivación de aquellas sustancias electrófilas que hayan podido acceder a las células desde el exterior (xenobióticos) o que aparecen como metabolitos finales o intermediarios de otros procesos celulares (endobióticos). Esta familia de enzimas es muy versátil y presenta una afinidad muy grande para el glutatión, y en menor medida para los otros sustratos de la reacción.

I.4.2.3.2.- Actividad peroxidasa

La actividad peroxidasa está representada por tres enzimas:

- i) Glutatión peroxidasa (GSH-Px):** es una enzima que contiene selenio, capaz de reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua. Es la forma más común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. La función de este enzima es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. El hígado por ejemplo, que es uno de los principales lugares para la detoxificación y está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una actividad elevada de glutatión peroxidasa. Los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de esta enzima (Van Vleet *et al.*, 1981).
- ii) Glutatión transferasa con acción peroxidasa:** algunos isoenzimas de la glutatión S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos

orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Bajo condiciones de deficiencia de selenio en la rata, la glutatión peroxidasa está disminuida mientras que la actividad glutatión transferasa está aumentada (Schramm *et al.*, 1985).

iii) Glutatión peroxidasa frente a fosfolípidos peroxidados: actúa sobre fosfolípidos peroxidados de membranas biológicas. Este enzima es una GSH-Px de fosfolípidos hidroperóxidos, llamada PHGPx. Es un monómero y ha sido descubierta como una selenoenzima distinta de la clásica GSH-Px basándose en su cDNA y secuencia aminoácida (Ursini *et al.*, 1982).

I.4.2.3.3.- Actividad glutatión disulfuro reductasa

El glutatión disulfuro (GSSG) formado en las reacciones de peroxidación se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutatión reductasa. Por tanto esta enzima mantiene el estado reducido del glutatión, necesario a su vez para muchos procesos de detoxificación celular.

I.4.2.3.4.- Actividad gamma glutamil transpeptidasa

Es una enzima del catabolismo del glutatión que cataliza la transferencia del grupo gamma glutamilo. Normalmente está asociada a la membrana celular y orientada con su sitio activo hacia el exterior. Constituye el paso extracelular del ciclo del gamma-glutamilo (Meister y Anderson, 1983).

Además, supone el siguiente paso de la vía de degradación de los conjugados formados por la reacción de las glutatión S-transferasas, y que conduce a la formación de compuestos más hidrosolubles: los ácidos mercaptúricos.

I.5.- OTRAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS ANTIOXIDANTES

I.5.1.- CATALASAS DE LOS PEROXISOMAS

Catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno a nivel del fagosoma o en el peroxisoma.

I.5.2.- ACTIVIDAD DT-DIAFORASA

Multitud de compuestos tóxicos lo son o se convierten en ellos por poseer una estructura quinónica. Existe un enzima, la DT-diaforasa, que previene la reducción monoelectrónica de los compuestos quinónicos y la formación de un radical semiquinona. Este enzima transfiere dos electrones a la quinona formando la hidroquinona, que es mucho menos tóxica y evitando el estado intermedio semiquinona.

El peligro de la formación de un radical semiquinona, es la facilidad que éste tiene para reaccionar con el oxígeno molecular, para formando anión superóxido, reponer la quinona inicial. A este fenómeno se le ha denominado por los autores sajones "redox cycling" y supone una fuente habitual de estrés oxidativo (Kappus y Sies, 1981). La presencia de la DT-diaforasa protege pues a las células de este fenómeno.

I.5.3.- ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

Estas enzimas catalizan la conversión de radicales libres superóxidos (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) (McCord y Fridovich, 1969). El peróxido de hidrógeno producido, será eliminado por la acción de las catalasas y de la glutatión peroxidasa (Fridovich, 1978).

Catalizada por la superóxido dismutasa, se produce la conversión del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que será reducido a agua a través de la glutatión peroxidasa. Durante esta reacción el glutatión pasa a su forma disulfuro (GSSG) y vuelve a su estado reducido por la acción de la GSSG reductasa consumiendo NADPH.

Por otro lado, la DT-diaforasa permite la formación de hidroquinona, que es un compuesto mucho menos tóxico, y evita así el estado intermedio de semiquinona que podría reaccionar con el oxígeno molecular para formar anión superóxido y reponer así la quinona inicial que es tóxica.

I.6.- OTROS ANTIOXIDANTES NATURALES

Además del glutatión existe una gran batería de compuestos biológicos encargados del mantenimiento del equilibrio redox en el organismo. Entre ellos destacan

la vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) y el ácido lipóico. Otros como la ubiquinona y los carotenoides tienen variado interés dependiendo del medio en cuestión.

La suma de la actividad antioxidante de la vitamina E en un alimento es la suma de las actividades de ocho tocoferoles químicamente similares, cada uno de los cuales puede existir en un número diferente de formas estéricas (Diplock, 1985). Sin embargo *in vivo*, a causa de factores en la absorción, el más importante tocoferol en ser considerado es el α -tocoferol.

La enfermedad por deficiencia de vitamina E es bien conocida en los animales donde su ausencia en la dieta causa en ratas embarazadas la resorción del feto, en ratas machos produce degeneración testicular, en conejos produce distrofia muscular (Nelson, 1980) y en pollo una lesión aguda en el sistema nervioso central (Diplock, 1985). En humanos la deficiencia de vitamina E es rara, debido a la fácil obtención de ésta por la dieta normal. Sin embargo existen algunas excepciones, por ejemplo, la abetalipoproteinemia, una rara enfermedad genética, provoca una mala absorción de la vitamina que conlleva a una profunda neuropatía periférica que resulta fatal cerca de los 12 años, la enfermedad es tratada con éxito con grandes dosis de vitamina E. Aunque la deficiencia de esta vitamina es rara, la presencia de niveles séricos bajos de la misma puede predisponer a enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como la degeneración macular asociada a la edad (Belda *et al.*, 1999)

La habilidad de sintetizar vitamina C (ácido ascórbico) a partir de la glucosa está ausente en un pequeño grupo de especies animales incluida el hombre, los primates, y otros mamíferos. Estas especies dependen de la fuente externa de la vitamina C en su dieta, ya que es necesaria para una gran variedad de reacciones enzimáticas fundamentales. La oxidación del ácido ascórbico a dehidroascorbato es reversible gracias al glutatión, que renueva la molécula de vitamina C a su estado reducido original siendo catalizada la reacción por la dehidroascorbato reductasa. Está bien demostrada la capacidad del ácido ascórbico para neutralizar diversos radicales libres de oxígeno (Halliwell y Gutteridge, 1989), pero el último gran interés está en la hipótesis de que esta molécula pueda tener un importante papel en la regeneración del α -tocoferol desde su forma oxidada, actuando como un dador de hidrógeno.

La deficiencia de ascorbato en la dieta de animales, que son incapaces de sintetizarlo, conduce a defectos en la síntesis de colágeno, lo cual en el hombre resulta en la conocida enfermedad del escorbuto.

El ácido lipóico juega un papel pivote en el metabolismo energético. Su actividad antioxidante, sin embargo, está reconocida en condiciones normales y patológicas. Este antioxidante actúa en determinadas enfermedades en las que interviene el estrés oxidativo (Borbe y Ulrich, 1989). En un reciente estudio se ha demostrado en un modelo de neuropatía diabética la mejora del flujo sanguíneo y la condición distal en nervio periférico, al igual que es capaz de reducir, en este tejido, el nivel de estrés oxidativo (Nagamatsu *et al.*, 1995). Más aún, se ha descrito su efectividad en la neuropatía diabética de estos enfermos en un ensayo clínico reciente (Ziegler *et al.*, 1995).

I.7.- ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Dada la importancia de los antioxidantes en la fisiología y fisiopatología de diferentes tejidos, se ha desarrollado la idea de que estas sustancias pueden tener una acción terapéutica e incluso preventiva relevante en el desarrollo de ciertas patologías. Ante esta opción se plantea inicialmente el uso de antioxidantes naturales, los cuales presentan la enorme ventaja de ser, en la mayoría de los casos, inocuos (a dosis razonablemente pequeñas). Una segunda alternativa es el empleo de sustancias sintéticas con potencia antioxidante y pensadas para anclarse en los diferentes tejidos u organelas diana de la acción de los radicales libres. Existe una amplia gama de estos compuestos, como son: el Trolox (derivado hidrosoluble de la vitamina E), el probucol, el butilhidroxitolueno (BHT), muchos quelantes de hierro y otros metales. De entre ellos, los compuestos encuadrados en el grupo de los 21-aminoesteroides, también denominados lazaroides (Braugher y Pregenzer, 1989) han demostrado una gran potencia antioxidante en diferentes modelos experimentales, en su mayoría relacionados con el tejido nervioso (Braugher y Hall, 1989; Hall y Braugher, 1989). La principal acción de esta familia de sustancias es la inhibición de la peroxidación de lípidos (Hall *et al.*, 1991; Linseman *et al.*, 1993). Una sustancia importante de este grupo es el Ebselén: se trata de una molécula GSH-Peroxidasa *like* biológicamente activa, con propiedades antiinflamatorias (Díaz-Llopis *et al.*, 1993), que presenta actividad

inhibitoria cicloxigenasa y lipoxigenasa. Además se caracteriza por ser hidrófoba y liposoluble, hechos que suponen un obstáculo para su administración intramuscular y/o subconjuntival. Desde entonces, una amplia investigación sobre esta interesante molécula se extiende desde los estudios iniciales físico-químicos sobre reactividad radical hasta sus propiedades biológicas en células y órganos en el camino hacia su utilización clínica.

I.8.- APOPTOSIS

La apoptosis es una forma de muerte celular morfológicamente distinta que juega un papel central en la embriogénesis y en la homeostasis de los tejidos. Los cambios ultraestructurales que caracterizan a la apoptosis fueron descritos por primera vez por Kerr y colaboradores (Kerr *et al.*, 1972). Estos cambios son la condensación de la cromatina del núcleo y la segmentación del núcleo, seguida de la formación de burbujas en la membrana que finalmente dará lugar a la desintegración celular y a la formación de los cuerpos apoptóticos, los cuales a su vez serán fagocitados por los macrófagos, sin pérdida alguna del contenido celular al exterior. La apoptosis provee al organismo de un método seguro para mantener la integridad del organismo permitiéndole eliminar las células dañadas o no normales sin comprometer a las células vecinas.

Hay cada vez más evidencia de que el mecanismo molecular de la apoptosis se ha conservado a lo largo de la evolución, ya que ocurre en nematodos y vertebrados. Son particularmente importantes los estudios genéticos del nematodo *Caenorhabditis elegans*, que han permitido la identificación de dos genes, *ced-3* y *ced-4*, esenciales en el desarrollo de la muerte celular (Steller, 1995). También hay cada vez más evidencias de que una familia de proteasas con residuos cisteína, las caspasas, juegan un papel fundamental en los procesos de apoptosis tanto en nematodos como mamíferos (Cerretti *et al.*, 1992).

La muerte por apoptosis puede ocurrir como consecuencia de exposición a agentes físicos (radiaciones ionizantes, hipertermia), a agentes tóxicos (peróxido de hidrógeno), por los efectos celulares de citoquinas, por infección viral y mecanismos inmunológicos (Hockenbery *et al.* 1993). Esta gran heterogeneidad de los promotores de la apoptosis sugiere que hay muchos mecanismos que conducen a unos mismos cambios

morfológicos en las células que se mueren. La capacidad de genes como el Bcl-2 de proteger frente a la muerte por apoptosis sea cual sea el estímulo, sugiere que hay un mecanismo final común en la apoptosis (Reed, 1994).

I.8.1- APOPTOSIS Y ESTRÉS OXIDATIVO

Algunos procesos consecuencia del estrés oxidativo son la peroxidación lipídica, la pérdida de la homeostasis del calcio intracelular, y la alteración de las vías metabólicas. Todos estos procesos han sido recogidos en listas de modelos de apoptosis. Pero hay que diferenciar si son mecanismos efectores o simples cambios bioquímicos que ocurren como consecuencia de la muerte celular.

La ruptura de la membrana lipídica aumenta la concentración de lípidos biológicamente activos, tales como los metabolitos del ácido araquidónico, y la liberación de diacilgliceroles y ceramidas de la esfingomielina. Esto puede estimular la liberación del calcio desde sus lugares de almacenamiento intracelular lo que lleva a una pérdida de la homeostasis del calcio de la que dependen muchos sistemas enzimáticos. Se cree además que la activación de la endonucleasa dependiente del calcio es capaz de iniciar la fragmentación de la cromatina que se observa en las células apoptóticas (Lesmasters *et al.*, 1989). El calcio también puede activar las señales de transducción dependientes de la protein kinasa C y así modificar la transcripción génica (Wolf *et al.*, 1985).

Además hay estudios toxicológicos que demuestran que la exposición de las células a bajas dosis de peróxido de hidrógeno conduce a apoptosis en vez de a necrosis, que se ha visto que ocurre a dosis mayores (Lennon *et al.*, 1991)

A pesar de todo hay mucha confusión sobre la conveniencia de usar antioxidantes para modificar la respuesta apoptótica, pues aunque los radicales libres pueden causar estrés oxidativo, no son esenciales para que ocurra el proceso apoptótico.

I.8.2.- LAS PROTEÍNAS DE LA FAMILIA BCL-2

Uno de los reguladores de la apoptosis más importante es la familia de genes Bcl-2, de los que se sabe que hay, por lo menos, 16 en humanos (Chao y Korsmeyer, 1998). El gen supresor de la apoptosis se descubrió como un proto-oncogén que se

encontraba en los linfomas de células B. Los miembros de la familia Bcl-2 se han clasificado en tres grupos (Adams y Cory, 1998):

- i) Los miembros del primer grupo, como Bcl-2 y Bcl-X1, se caracterizan por poseer 4 dominios de homología (BH1-BH4). También se caracterizan por poseer una cola C-terminal hidrofóbica, que sitúa a la proteína en la membrana externa de la mitocondria, con el grueso de la proteína hacia el citosol. El hecho característico de los miembros del grupo I es que todos poseen actividad antiapoptótica.
- ii) El grupo II está compuesto por proteínas con actividad proapoptótica. Los miembros de este grupo, como Bax y Bak, tienen una estructura general similar al grupo I; contienen la cola hidrofóbica y todos los dominios menos el dominio BH4.
- iii) El grupo III consiste en un conjunto diverso de proteínas cuyo único hecho común es la presencia del dominio BH3. Aunque algunos miembros del grupo III, como el Bid, son de hecho homólogos divergentes del Bcl-2 y Bax, otros comparten muy poca semejanza estructural con los miembros del grupo I y II. La clasificación de estas proteínas dentro de la familia Bcl-2 es más una cuestión de conveniencia.

Las proteínas de la familia Bcl-2 son proteínas multifuncionales. Se han identificado tres funciones generales para el Bcl-2 y algunos de sus homólogos antiapoptóticos, como el Bcl-X1 (Green y Reed, 1998):

- i) Dimerización con otros miembros de la familia Bcl-2. En 1993, Oltvai y colaboradores (Oltvai *et al.*, 1993) descubrieron que era capaz de heterodimerizarse con la proteína proapoptótica Bax. De este hecho, surge la hipótesis de que los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 pueden heterodimerizarse intentando bloquearse unos a otros. La relativa sensibilidad o resistencia de las células a los diversos estímulos apoptóticos dependería entonces de la relación entre los niveles de proteínas pro y antiapoptóticas. La dimerización se consigue cuando el dominio BH3 de una molécula se une en un bolsillo hidrofóbico formado por los dominios BH1, BH2 y BH3 de otra proteína.

- ii) Unión con otras proteínas no homólogas. De todas las proteínas con las que pueden interaccionar Bcl-2 y Bcl-Xl, las más importantes son aquellas que están relacionadas directamente con la activación de las caspasas, como Apaf-1. Apaf-1 permanece en estado inactivo hasta que es activado por dATP y citocromo c, entonces forma un complejo con la procaspasa-9 induciendo la actividad de la caspasa-9 que a su vez activa las siguientes caspasas. Se ha visto que Bcl-Xl se une a Apaf-1 (Hu *et al.*, 1997), pero no se sabe como afecta esta unión a la apoptosis.
- iii) Formación de canales iónicos o poros, regulando así la liberación de factores proapoptóticos, en particular citocromo c, del compartimento intermembranal de la mitocondria al citosol.

Se ha sugerido que las proteínas de la familia Bcl-2 pueden actuar insertándose en la membrana externa mitocondrial donde forman canales. La hipótesis general (Schendel *et al.*, 1998) es que las proteínas Bcl-2 citoprotectoras forman pequeños canales con una conformación más cerrada y que tienen preferencia por los cationes, mientras que las proteínas proapoptóticas, como Bax, forman canales más grandes, con una conformación más abierta y que prefieren aniones.

Otro de los mecanismos de salida del citocromo c es la pérdida del gradiente electroquímico de la membrana interna mitocondrial (Petit *et al.*, 1996), que generalmente se debe a la apertura del “mitochondrial permeability transition pore” (PTP). La sobreexpresión de Bcl-2 ó Bcl-Xl hace que sea más difícil la apertura del PTP (Kluck *et al.*, 1997) y la sobreexpresión de Bax induce la pérdida del gradiente electroquímico. Pero, la salida del citocromo c también se puede dar sin pérdida del potencial de membrana.

II.- BASES MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DEL ESTUDIO.

II.1.- LA CÓRNEA

II.1.1.- ANATOMÍA DE LA CÓRNEA

II.1.1.1.- Generalidades y relaciones

La córnea constituye 1/6 de la parte anterior del globo ocular. Es una estructura avascular transparente, con terminaciones nerviosas ricamente inervadas, que proporcionan las sensaciones del tacto y dolor. La interfase entre la película de la lágrima corneal y la atmósfera ambiente proporciona dos tercios del poder refractivo del ojo humano. El tamaño, forma, y las propiedades ópticas de la córnea cambian poco con la edad. Debido a la naturaleza avascular de la córnea, la mayoría de las necesidades de oxígeno para sus actividades metabólicas proviene de oxígeno atmosférico que se disuelve en la película de la lágrima. Cuando los párpados están cerrados, el oxígeno entra en la película de la lágrima través de los capilares de la conjuntiva superficial. Los nutrientes, como los hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos, y otros substratos, son generalmente transportados a través de las arcadas vasculares del limbo y pasan al estroma a través del endotelio corneal por difusión o transporte activo. El anhídrido carbónico y otros productos metabólicos terminales son eliminados por la película de la lágrima, el endotelio corneal, o a través de los capilares del limbo (Smolek y Klyce, 2001).

II.1.1.2.- Embriología

La formación de vesícula del cristalino ocurre durante las primeras semanas del embarazo. Las células del ectodermo superficial cubren el defecto dejado por la invaginación de la vesícula del cristalino y se convierten en las células del epitelio corneal primitivo. La estructura del epitelio en la 8ª semana consiste en dos capas celulares: una capa superficial, compuesta de células planas, y una capa basal subyacente de células cuboideas. En la 26ª semanas de gestación, las capas se abren y el epitelio se compone ahora de cuatro a cinco capas celulares. Las células basales son de cuboideas a columnares, con los núcleos basales, y descansan en una membrana basal. Sobre esta capa están las células interdigitales y, más superficialmente, una capa de

células del epitelio plano. La membrana basal fetal difiere substancialmente de la del neonato, siendo menos electrón-densa y menos homogénea. Al inicio de la gestación, los hemidesmosomas y fibrillas de anclaje están ausentes. A la 19ª semana de gestación, los hemidesmosomas, las fibrillas de anclaje, y la capa de Bowman rudimentario están presentes. Con el desarrollo posterior en el útero, aumenta el número de hemidesmosomas, las fibrillas de anclaje penetran en el estroma anterior, y la capa de Bowman se espesa.

Una "primera oleada" de células del mesodermo empieza a extenderse bajo las células del epitelio corneal del limbo hacia el área central alrededor de la quinta semana de embarazo; estas células forman el endotelio primitivo. El epitelio y endotelio permanecen estrechamente unidos hasta la sexta semana cuando una "segunda oleada" de células mesodérmicas empieza a crecer centralmente desde el limbo entre el epitelio y el endotelio. Este tejido forma el estroma corneal, y el colágeno extracelular empieza a aparecer al cabo de unos días. Durante el tercer mes, las células del endotelio secretan la membrana de Descemet. En el séptimo mes de gestación, la córnea se parece en la mayoría de sus características estructurales y dimensiones físicas a la del adulto. En el recién nacido a término, la medida horizontal de la córnea es de 10 mm o aproximadamente un 80% de la del adulto (Cook *et al.*, 2001).

II.1.1.3.- Estructura histológica

La cornea humana tiene forma elíptica. La medida más grande es la horizontal (11,7 mm), con una media entre 11 y 12,5 mm, y la medida vertical se sitúa alrededor de 10,5 mm, con un rango entre 10 y 11,5 mm. El radio de curvatura anterior de la superficie corneal es de 7,8 mm, con un rango entre 6,8 y 8,5 mm. La hendidura o sulcus es conocida como el limbo.

La córnea es más delgada en el centro, midiendo alrededor de 520 μm y aumenta en espesor a aproximadamente 700 μm a medida que alcanza el limbo (Mishima, 1968). Los 4 mm centrales de la córnea por debajo de la pupila forman el centro óptico. Tiene una superficie y estructura regular y está justo en el centro de la configuración esférica.

La córnea está formada por 5 capas: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (figura II.1). En situación normal carece de vasos sanguíneos y linfáticos.

La superficie anterior de la córnea está cubierta por 5 ó 6 capas de **células epiteliales**, de 50-60 μm de grosor, que se continúan con las de la conjuntiva (figura II.2). Las funciones del epitelio corneal son dos: (1) formar una barrera entre el ambiente y el estroma corneal y (2) formar una delicada superficie refractiva en la córnea a través de la interacción con la película lagrimal. El epitelio corneal se mantiene por un equilibrio entre el proceso de migración celular, la mitosis, y el desprendimiento de células de la superficie, según la hipótesis X,Y,Z (Sharma y Coles, 1989; Thoft y Friend, 1983).

La importancia del epitelio como barrera entre la lágrima y el estroma se demuestra claramente en la respuesta de la córnea ante la abrasión epitelial. Después de la renovación del epitelio, el estroma absorbe líquido de las lágrimas y en el plazo de 4 a 6 horas puede hincharse un 150% de su espesor normal (Ytteborg y Dohlman, 1965).

La **capa de Bowman** es una zona acelular, de 8 a 10 μm de espesor, situada debajo del epitelio, formada por colágeno, que bajo la luz del microscopio no posee ninguna organización. Se suele considerar que la capa de Bowman es resistente al traumatismo, ofreciendo una barrera a la invasión corneal por microorganismos y células tumorales. Por otro lado se ha constatado que carece de capacidad regeneradora cuando se lesiona.

El **estroma** constituye aproximadamente el 90% de la córnea, y consta de 200-250 capas de colágeno laminar (2 μm de espesor), células de estroma y sustancia fundamental. Está rodeado en su porción anterior por la membrana de Bowman. La capa más posterior de colágeno del estroma se mezcla con la capa gruesa del endotelio (membrana de Descemet). En el estroma adulto, los queratocitos se encuentran silentes, aunque parecen formar una red de células interconectadas a través del estroma vía uniones “gap”. Es posible que la rotura de estas uniones por heridas pueda servir de señal para la migración de los queratocitos al área lesionada.

La **membrana de Descemet** tiene un espesor de aproximadamente 10 μm en los adultos y se trata de una lámina basal gruesa producida por el endotelio. El anillo de Schwalbe señala el final de la membrana de Descemet. A diferencia de la capa de Bowman, la membrana de Descemet se desprende del estroma con facilidad, regenerándose con rapidez tras la lesión.

Las **células endoteliales** forman una monocapa de células hexagonales que separan el estroma del humor acuoso (figura II.3). Tienen una altura aproximada de 10 μm al nacer, se aplanan con la edad hasta aproximadamente 4 μm en los adultos. Por lo general no existe actividad mitótica en el endotelio tras el nacimiento.

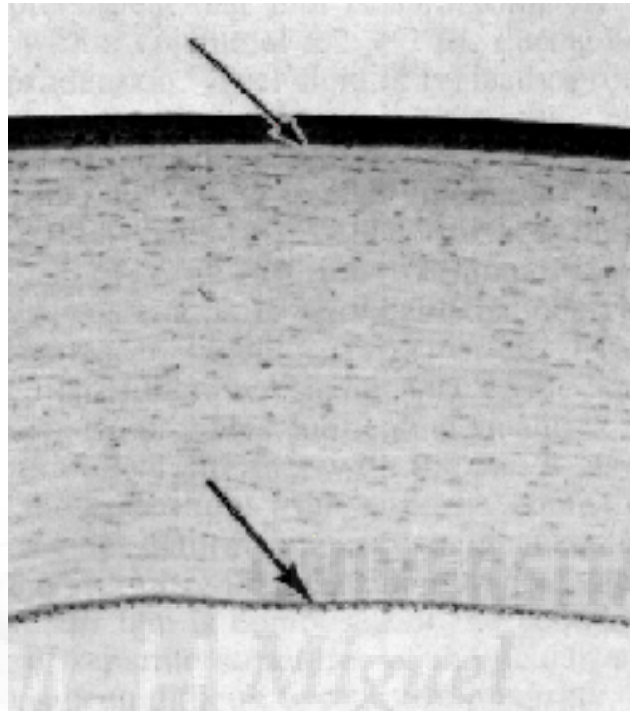


Figura II.1 Imagen del espesor total de la córnea humana normal. Desde arriba: epitelio, membrana de Bowman (flecha), estroma, membrana de Descemet (flecha), y endotelio (tinción de hematoxilina-eosina, x80). Modificada de Duane.

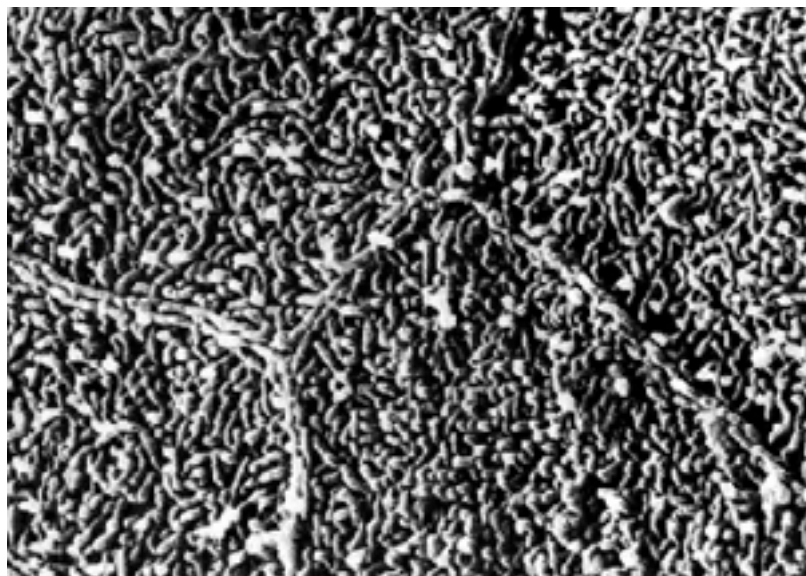


Figura II.2. Superficie del epitelio corneal a microscopía electrónica. Resaltan las numerosas microvellosidades y los márgenes celulares (x12,900). Modificada de Duane.

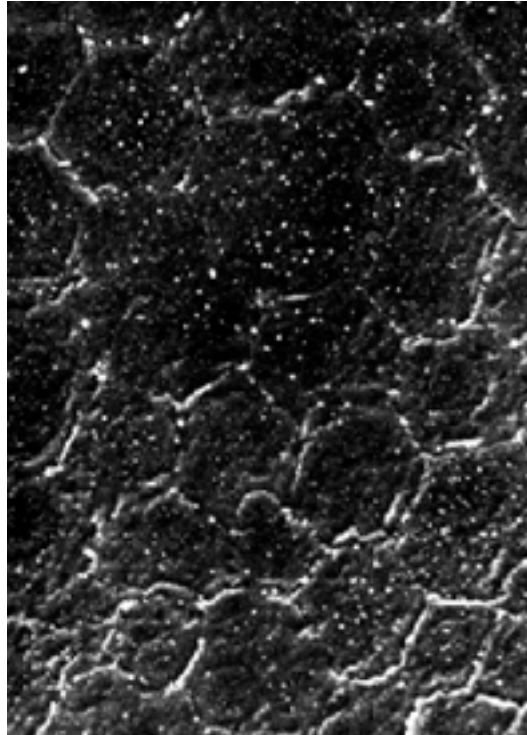


Figura II.3. Superficie del endotelio corneal a microscopía electrónica. Destaca la disposición hexagonal regular de las células (x 1170). Modificada de Duane.

II.1.2.- FISIOLÓGÍA DE LA CÓRNEA

Las células corneales son metabólicamente activas y requieren nutrientes para desarrollar su función (glucosa, oxígeno, vitaminas y aminoácidos). El catabolismo de la glucosa y el glucógeno es la principal fuente de energía de estas células. La glucosa procede fundamentalmente del humor acuoso. El oxígeno, por otro lado, llega por difusión desde la película lagrimal a las células epiteliales, y desde el humor acuoso a las células endoteliales.

El glutatión es un elemento muy importante para la función endotelial, ya que desempeña un papel en la eliminación de los radicales libres y los peróxidos tóxicos que se forman durante la exposición al sol o por otros mecanismos oxidativos (Riley *et al.*, 1980; Riley, 1980).

La función principal del endotelio corneal es mantener una barrera efectiva del humor acuoso, para mantener el bombeo metabólico y la transparencia corneal. La integridad de las uniones de las células endoteliales establece una barrera que es lo más importante en el control del bombeo metabólico del endotelio, y se localiza en la membrana lateral de las células endoteliales.

Una agresión en el número de células, la función de barrera, o en el bombeo metabólico puede ocasionar edema corneal. Clínicamente, si la función de bombeo endotelial equilibra las pérdidas, el contenido de agua del estroma corneal será del 78%, y el espesor corneal (0,52mm) se mantendrá. El fundamento de la función de barrera es la existencia de una complicada interdigitación de las paredes laterales de las células endoteliales, junto con la presencia de múltiples complejos de unión, entre ellos *zonulae occludentes*, *maculae occludentes* y desmosomas. Existen estudios de laboratorio que han demostrado que las uniones estrechas (“*tight junctions*”) son muy sensibles al calcio (la exposición a soluciones con calcio causan la ruptura de las uniones) y a los niveles de glutatión dentro de las células endoteliales (Stiemke *et al.*, 1991a).

El bombeo metabólico del endotelio corneal se controla por la ATPasa Na^+/K^+ localizada en los laterales de la membrana. Los estudios han demostrado que existen 3 millones de sitios de bombeo entre las células endoteliales, y un bombeo activo de HCO_3^- a través de endotelio. Es importante señalar que el transporte o difusión de HCO_3^- siempre se lleva a cabo en asociación con el Na^+ y agua (Hull *et al.*, 1977).

Las uniones estrechas (“*tight junctions*”) forman la barrera junto con la ATPasa Na^+/K^+ para el bombeo metabólico. El bombeo equilibra la pérdida de humor acuoso al estroma y la actividad de Na^+ es mayor en el humor acuoso que en el estroma, por lo tanto el movimiento hidrostático del agua será en dirección del estroma hacia el acuoso. El endotelio corneal puede adaptarse a un aumento de las pérdidas y equilibrar el aumento de permeabilidad produciendo mayor número de bombeos en la membrana lateral.

II.1.3.- COMPOSICIÓN DE LA CÓRNEA

La lámina propia o estromal constituye del 80% al 90% del total del grosor corneal (Kaye, 1969) y está formada por alrededor de 200 lamelas de fibrillas colágenas, que corren paralelas dentro de la superficie. Interpuestas entre las fibrillas de colágeno están los proteoglicanos (PG), glicoproteínas, y sales. Los PG suponen el 4%-5% del peso seco de la córnea y su papel principal es controlar la hidratación, el grosor y la transparencia de la córnea. Los PG están compuestos por glucosaminoglicanos, unidos de forma covalente a una columna de polipéptidos. Los PG mayoritarios en el estroma corneal son el proteoqueratán sulfato y el proteodermatán sulfato. El queratán

sulfato es el glucosaminoglicano más abundante en el estroma corneal. Las células planas del estroma (queratocitos) se ubican entre las laminillas de colágeno. Los queratocitos y fibrocitos secretan PG, colágeno y proteasas.

La función de transporte de las células monocapa del endotelio precisan de la actividad oxidativa que es 5 ó 6 veces la de las células del epitelio (Riley, 1982). El oxígeno atmosférico es la principal fuente de oxígeno al endotelio. La interrupción de este aporte de oxígeno debido a una baja permeabilidad por el uso de lentes de contacto o a un ambiente pobre en oxígeno puede producir un cambio a metabolismo anaeróbico, un aumento en el ácido láctico y el CO₂ estromal, y una caída en el pH estromal (Klyce, 1981). Los cambios clínicos en fase aguda de la hipoxia incluyen edema estromal, disfunción del endotelio y fracaso endotelial. La hipoxia crónica puede producir polimorfismo y pleomorfismo irreversibles. Pulse y colaboradores (Pulse *et al.*, 1990), han demostrado que la hipoxia crónica en humanos altera la capacidad del endotelio para reducir el edema inducido.

II.1.4.- ENVEJECIMIENTO DE LA CÓRNEA

Con la pérdida continua de células endoteliales que ocurren con la edad, no aumenta la permeabilidad. Cuando se elimina el endotelio, la permeabilidad aumenta 6 veces, de 2,26 a 12,85- 4 cm/min (Watsky *et al.*, 1989). Debido a que la permeabilidad del endotelio corneal es el factor clave en el mantenimiento de la transparencia corneal, los procesos de reparación y la integridad de las uniones son de gran importancia. Estudios recientes de Stiemke y colaboradores (Stiemke *et al.*, 1991b) en el desarrollo del endotelio de conejos han demostrado que, a medida que la córnea madura y las uniones estrechas (“*tight junctions*“) se forman, disminuye la permeabilidad endotelial. La densidad de sitios de bombeo en las células de endotelio corneal aumenta y la córnea se deshidrata.

El punto crítico en el cual ocurre la descompensación corneal debido a la progresiva pérdida de células endoteliales es el nivel menor de 500 cels/mm². En este punto crítico, la permeabilidad ha aumentado mucho y las células endoteliales están tan dispersas que no existe suficiente espacio en las células de la membrana lateral para el bombeo metabólico. Por tanto, el bombeo metabólico no puede equilibrar las pérdidas y se produce el edema corneal.

II.2.- EL CRISTALINO

II.2.1.- ANATOMÍA DEL CRISTALINO

II.2.1.1.- Generalidades y relaciones

El cristalino del adulto es una estructura biconvexa, transparente, localizada por delante del cuerpo vítreo y por detrás del iris (figura II.4), uniéndose en los 360° del ecuador a los procesos ciliares, mediante unas fibras suspensorias (zónula de Zinn). El cristalino del ojo joven es por lo general incoloro, pero con la edad se produce una tinción amarillenta o ámbar.

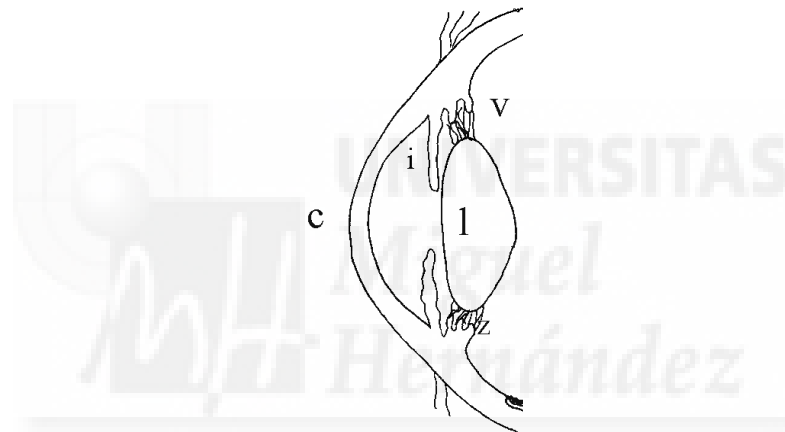


Figura II.4. Situación anatómica del cristalino.

c: córnea; i: iris; l: cristalino; z: fibras zonulares; v: vítreo

Presenta dos caras: anterior y posterior, que se unen en el llamado ecuador. El radio de curvatura es menor en la cara posterior, que aparece más abombada.

La superficie anterior del cristalino está bañada por el humor acuoso, que fluye desde la cámara posterior del ojo, a través de la pupila, a la cámara anterior. El cristalino se halla desprovisto de circulación sanguínea, excepto durante la vida intrauterina, por lo que su nutrición deriva de los líquidos intraoculares, principalmente del humor acuoso (Kleiman y Norgul, 2001).

II.2.1.2.- Embriología

La placoda del cristalino surge de un engrosamiento en la superficie ectodérmica de la invaginación inducida por el contacto con la vesícula óptica, una evaginación del prosencéfalo. Este hecho se produce en la 4ª semana de gestación en el embrión humano. Alrededor de la 5ª semana la placoda cristaliniana comienza a invaginarse para formar la fovea de la lente, al mismo tiempo que la vesícula óptica se invagina para formar la cúpula óptica, donde se localizan las lentes embrionarias. La fovea de la lente continúa invaginándose, formando la vesícula de la lente que se separa de la superficie ectodérmica en la 5ª-6ª semana de gestación. La lámina basal, una capa gruesa de la lente, se desarrolla en la 6ª semana. También alrededor de la 6ª semana de gestación, las lentes embrionarias son envueltas por un delicado sistema vascular, la “túnica vascular”, que alcanza su mayor desarrollo a la 10-12 semanas de gestación y recibe aporte de la arteria hialóidea de la retina.

Las células posteriores de la vesícula de la lente se elongan en la 7ª semana de gestación para formar las fibras primarias del cristalino, que rellenan la cavidad de la vesícula del cristalino. Mientras, Las células anteriores de la vesícula de la lente, en la zona ecuatorial, se dividen y elongan para formar las fibras secundarias del cristalino. Este fenómeno continúa toda la vida.

A medida que las nuevas fibras se forman, las más antiguas son desplazadas hacia el centro de la lente, que se engrosa progresivamente, formando lo que se conoce como “el núcleo del cristalino”

Las fibras zonulares, que son ligamentos suspensorios que sostienen el cristalino, se desarrollan del neuroepitelio en el tercer mes de gestación. En la 7ª semana, el sistema vascular hialóideo, con la regresión del vítreo en el 8º mes de gestación, deja a la lente sin aporte vascular para el resto de su vida (Cook, 2001).

II.2.13.- Estructura histológica

El cristalino está compuesto por 4 estructuras relacionadas entre sí:

- i) **Cápsula:** Representa una lámina basal hipertrófica derivada del epitelio cristaliniano. Se trata de una membrana transparente, fina, elástica, de superficie homogénea, que proporciona la forma lenticular al cristalino. Se encuentra unida a los procesos ciliares a nivel del ecuador cristaliniano

mediante las fibras zonulares. Permite el paso de electrolitos hacia el interior del cristalino, pero no deja pasar a los macrófagos ni salir a las moléculas proteicas de alto peso molecular.

ii) Epitelio: Se encuentra sólo en la superficie anterior del cristalino y está constituido por una fila de células aplanadas que, a medida que van madurando, se acercan al ecuador y se transforman en poligonales. Estas últimas acaban transformándose a su vez en fibras cristalinas.

iii) Fibras: Son el resultado de la transformación de las células epiteliales. Adoptan una situación rectilínea del polo anterior al posterior, convergiendo en unas líneas de sutura con forma de "Y".

iv) Zónula de Zinn: Es un sistema de fibras de 3 a 9 μm de grosor y 7 mm de diámetro, que van desde los procesos ciliares al ecuador del cristalino, al que mantiene fijo y manda las contracciones del músculo ciliar. Su composición es similar a la de las membranas basales.

II.2.2.- FISIOLÓGÍA DEL CRISTALINO

El cristalino funciona como una barrera que proporciona protección a la retina, evitando las radiaciones lumínicas y ambientales, pero la principal función del cristalino es la óptica, puesto que se trata de una lente transparente y biconvexa de aproximadamente +22 dioptrías. Este mecanismo óptico no sería verdaderamente útil si no se produjera la acomodación. Mediante este fenómeno el cristalino puede aumentar su potencia como lente. Cuando el músculo ciliar está relajado la zónula está tensa y por tanto también lo está la cápsula cristalina. Ahora bien, si el músculo ciliar se contrae, relaja las fibras zonulares, por lo que el cristalino tiende a hacerse más convexo (especialmente en la zona anterior de la cápsula), aumentando la potencia de la lente. Así, el radio de curvatura anterior se modifica de 10 a 16 mm, mientras que la curvatura posterior sólo se modifica 1 mm. Además, en el mecanismo de acomodación hay que incluir dos procesos paralelos, que son la convergencia (ayuda a la fusión de las imágenes retinianas) y la miosis (que disminuye las aberraciones ópticas producidas por los cambios de curvatura del cristalino). Todo este complejo mecanismo viene regido por el sistema parasimpático.

Mediante este mecanismo se consiguen focalizar en la retina los objetos que estén entre su punto remoto (punto más lejano que se ve nítido) y su punto próximo (punto más cercano que se ve nítido).

II.2.3.- COMPOSICIÓN DEL CRISTALINO

Los principales constituyentes del cristalino, al igual que en otros tejidos, son el agua y las proteínas. No obstante, el cristalino es único por tener un contenido acuoso muy bajo (65%) y proteico muy alto (33%). Casi todo el peso seco del cristalino se debe a proteínas. Este bajo contenido en agua y la alta concentración de proteínas refráctiles es esencial para su correcta función óptica. El resto de los sólidos, incluyendo lípidos, iones inorgánicos, ácidos nucleicos, fosfato orgánico, y varios metabolitos, constituyen sólo cerca del 2% del total. Sin embargo, la composición del cristalino varía considerablemente con el envejecimiento, y mucho más con la formación de una catarata. La fracción de proteínas solubles se mantiene constante con el envejecimiento, pero la fracción insoluble aumenta (del 1% en el cristalino joven hasta un 50% en un cristalino de 70 años). Esto conduce a la formación de agregados de proteínas, contribuyendo a la pérdida de transparencia de la lente. También se produce un acumulo de polipéptidos de bajo peso molecular, que proceden de la proteólisis de productos cristalinos por exo y endopeptidasas. (Hoenders y Bloemendal, 1981).

El contenido de lípidos en el cristalino es bajo (1-2% del peso seco), estando asociados principalmente a las membranas celulares del cristalino. La composición de los lípidos también se modifica con el envejecimiento, doblándose el colesterol y la esfingomielina (Zelenka, 1984).

El ácido ascórbico se encuentra en concentraciones altas en el cristalino, en ocasiones más altas que las existentes en humor acuoso. El ácido ascórbico no se sintetiza en el cristalino, pero existen evidencias de que existe un transporte especializado para introducirlo en el mismo desde los fluidos que lo rodean (DiMattio, 1989). Un posible papel del ácido ascórbico en el cristalino es el de funcionar como un aceptor de radicales libres de oxígeno. Paradójicamente, el ácido ascórbico puede ser también un pro-oxidante, ya que unido a la luz y a la presencia de un ion metálico puede generar peróxido de hidrógeno (Varma, 1987).

II.2.3.1.- El sistema glutatión en el cristalino humano

El glutatión juega un papel muy importante en el metabolismo lenticular (Reddy y Giblin, 1984). La cantidad de glutatión que se encuentra en humor acuoso es despreciable, pero en el cristalino normal los niveles de glutatión son muy altos, aunque su distribución no es uniforme, siendo mayor en la periferia que en el núcleo. (Reddy *et al.*, 1980). Por ejemplo, en el epitelio lenticular se han demostrado niveles de hasta 64/ $\mu\text{mol/g}$ en peso seco, aunque estos niveles son inferiores en el córtex y el núcleo. Aunque el glutatión se sintetiza en el cristalino, existe también evidencia de un mecanismo de transporte. (Reddy y Giblin, 1984). A pesar de que se ha demostrado que para otros tejidos el GSH mitocondrial supone hasta un 15% del total determinado (Romero y Galaris, 1989), en el caso del cristalino esto no tiene relevancia alguna pues existe una práctica total ausencia de mitocondrias, exceptuando las pertenecientes a las capas celulares más externas del epitelio de la lente (Reddy *et al.*, 1980).

Uno de los principales papeles del glutatión es mantener los grupos sulfidrilos (-SH) de las proteínas cristalinas en su estado reducido (Kinoshita, 1964). La oxidación de estos grupos -SH, debida a la presencia de radicales libres, puede producir uniones de proteínas, llevando a su agregación y a la pérdida de transparencia de la lente (Spector, 1984). El glutatión oxidado pasa otra vez a su estado reducido mediante un mecanismo en el cual la enzima glutatión reductasa utiliza una molécula de NADPH transformándola en NADP (Spector, 1985; Augusteyn 1981.).

El glutatión también ha sido implicado en el mantenimiento de la permeabilidad de membrana y los mecanismos de transporte activo de cationes (Epstein y Kinoshita, 1970). Los niveles de glutatión disminuyen de forma significativa con la formación de catarata, así como los niveles de enzimas necesarios para su síntesis.

II.2.3.- ENVEJECIMIENTO DEL CRISTALINO

El proceso de envejecimiento del cristalino produce una serie de cambios estructurales y bioquímicos que quedan reflejados a continuación:

- i) El peso y el volumen de la lente aumenta con el crecimiento de la misma.
- ii) Al tiempo que las células más antiguas son desplazadas hacia el centro de la lente, éstas pierden el núcleo y las organelas.

- iii) La síntesis de proteínas y otros procesos metabólicos se interrumpen en las células más antiguas, por lo que la actividad metabólica más vigorosa queda restringida a los segmentos más externos del cristalino, quedando la zona interna desprotegida para responder ante una agresión metabólica o de cualquier otra índole.
- iv) El cristalino adquiere un color amarillento con la edad, pudiendo llegar a marrón oscuro en caso de las cataratas brunescientes. Una de las principales causas de esta coloración es la absorción de luz ultravioleta. (Lerman, 1980).
- v) La lente se torna más rígida, comprometiendo el proceso de acomodación, produciéndose el fenómeno conocido como presbicia.
- vi) De entre los cambios en la composición, destacar el aumento de proteínas insolubles, las uniones de proteínas con precipitación de agregados proteicos de alto peso molecular, racemización de aminoácidos esenciales, proteolisis y glicosilación no enzimática (Hoenders y Bloemendahl, 1981). También se altera la composición lipídica de las membranas celulares, así como la degradación de las proteínas que funcionan como *gap-junction* y la modificación del contenido de fosfolípidos (Broekhuysse, 1981). De forma similar, la actividad enzimática del cristalino disminuye con la edad. (Hockwin y Ohrloff, 1981; Spector, 1982; Leske *et al.*, 1991).
- vii) Disminución del grosor y del número de fibras zonulares, aumentando notablemente su fragilidad.
- viii) Todos estos cambios estructurales y moleculares que ocurren con el envejecimiento contribuyen a una reducción gradual de la transparencia del cristalino. Cuando se llega al punto de que esta disminución de la transparencia repercute sobre la visión del individuo es cuando hablamos de la formación de la catarata.

II.3.- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DIFERENCIALES DE LA CÓRNEA Y CRISTALINO DEL CONEJO

El conejo es un animal preparado para la actividad tanto nocturna como diurna. Es un roedor cazador, con dieta vegetariana, y por lo tanto debe estar muy alerta a todo

lo que pasa a su alrededor cuando está en el campo. Los animales de laboratorio heredan estas características, y algunas de ellas son parecidas a los humanos.

Ambos tienen una retina con doble función (conos y bastones), pero la de los conejos no poseen una verdadera fovea central, y sus capas bipolar y plexiforme externa son únicas entre los animales. Ninguna tiene una estructura de recubrimiento. Las otras membranas del ojo, no son tan diferentes, aunque el sistema circulatorio sí muestra diferencias. Ambos utilizan métodos similares de acomodación, pero el conejo tiene mucha menor capacidad que el hombre.

El conejo tiene ciertas estructuras anatómicas que el hombre no posee. Tiene un músculo retractor bulbar, una glándula de Harder, una membrana nictitante, y una glándula nictitante. La glándula lagrimal es mucho más grande en el conejo, y el sistema de drenaje lagrimal es también diferente. El conejo está desprovisto de una membrana de Bowman. Sin embargo en lo esencial la córnea de conejo es bastante similar a la humana (Prince, 1964).

II.3.1.- LA CÓRNEA DEL CONEJO

La córnea del conejo es prominente y relativamente grande, una gran ventaja para un animal que debe saber aprovechar toda la luz de la penumbra. No es circular, y sus dimensiones horizontales son de 15 mm, y las verticales entre 13,5 y 14 mm, siendo el área total de 2 cm². Debido a su tamaño, su curvatura se separa poco de la de la esclera, pero no posee un sulcus muy marcado. El radio de curvatura se encuentra entre 7 y 7,5 mm, pero depende en gran medida de la edad y el peso del animal. Además la curvatura de la córnea de conejo cambia de forma constante durante los primeros 15 meses de vida. Al nacimiento el poder refractivo de la córnea es de más de 60 D, pero se reduce a 50 D a la 30 semana, y la estabilización en 40-43 D ocurre en el 6° a 8° mes. El espesor central de la córnea no es de más de 300 μm, y normalmente no supera los 400 μm.

Como no existe sulcus en el ojo de conejo, los límites de la córnea deben ser identificados en una sección pigmentando la zona anterior.

El **epitelio** es mucho más delgado que en el hombre, aproximadamente de 30-40 μm de grosor. Los desmosomas son menos visibles que en el hombre, estando más

marcados en las células de la membrana intermedia y de superficie, y en las paredes laterales de las células de la membrana basal.

La ausencia de una membrana de Bowman ha sido muy discutida, dado que en algunos casos es posible observar mediante microscopia electrónica un remanente que podría ser identificado como membrana de Bowman. Pero, a efectos prácticos, consideramos que no existe esta membrana en la córnea del conejo.

Cuando se extrae el epitelio corneal, éste se regenera muy rápidamente, y no se detiene hasta que su grosor supera al espesor original (200% en 24 horas), pero pasado este pico, recupera su espesor original entre 1 y 4 días.

La sustancia propia o **estroma** constituye el 90% del espesor corneal, y siempre supera los 240 μm de espesor.

La **membrana de Descemet**, también llamada membrana basal endotelial, tiene un espesor de 7-8 μm en el conejo, pero se engrosa con la edad.

El **endotelio** de la córnea, está formado de una sola capa de células planas hexagonales y poligonales, teniendo en una sección un diámetro de 20 μm y un grosor de 3-5 μm . El daño al endotelio supone la ruptura del mecanismo de transporte activo, que controla la entrada de fluido al estroma, y por tanto se pierde la transparencia corneal (Prince, 1964).

II.3.2.- EL CRISTALINO DEL CONEJO

En el postparto la lente del cristalino es avascular en todos los animales. En el conejo los vasos hialóideos están todavía presentes al nacimiento, y no se reabsorben durante varios días (entre el 8°-19°). El canal hialóideo, o remanente de su membrana, normalmente persiste.

El cristalino del conejo es un poco más grande que el del hombre y es más esférico. Por tanto ocupa más espacio dentro del globo ocular que en humanos, cuyo ojo es bastante más grande, y su índice refractivo es más alto (1,6).

A medida que la lente envejece y su metabolismo se reduce, toda su actividad se retarda, los constituyentes químicos cambian cuantitativamente, el contenido de agua y

oxígeno se reduce, la tasa de crecimiento se reduce y los cambios en la curvatura se detienen (Prince, 1964).

III.- FISIOPATOLOGÍA Y TRATAMIENTO DE LA CATARATA

III.1.- LA CATARATA: CONCEPTO

Es la pérdida de transparencia del cristalino, apareciendo opacidades en su estructura que provocan la disminución de la visión del ojo afectado y dificultan la exploración del fondo de ojo.

III.2.- CATARATAS Y ESTRÉS OXIDATIVO

La catarata es la principal causa de ceguera en el mundo (Thylefors *et al.*, 1994). La catarata senil o relacionada con el envejecimiento es una enfermedad multifactorial, y la prevalencia de la misma casi se duplica cada década a partir de los 30 años de edad. Por esta razón, si se pudiera realizar algún tipo de intervención sobre los factores de riesgo de la misma, retrasando su aparición en 10 años, se podría reducir el número de intervenciones quirúrgicas a cerca de la mitad (McCarty y Taylor, 1996).

Entre los posibles factores de riesgo de la catarata se incluyen la radiación ultravioleta tipo B (UV-B), la diabetes, el alcohol, el tabaco, la dieta, la diarrea y el uso de fármacos como los esteroides (West y Valmadrid, 1995).

Existen evidencias de que el daño oxidativo es uno de los principales mecanismos bioquímicos que conducen a la formación de la catarata (Pirie *et al.*, 1970; Augusteyn, 1981). En un cristalino joven existen muy pocas evidencias de que se esté produciendo una oxidación proteica; en cristalinos ancianos y transparentes sólo aparecen trazos de una pequeña oxidación; en cataratas ya formadas se ha demostrado un mecanismo oxidativo considerable, tanto a nivel de las proteínas cristaliniánas como de los lípidos de las membranas celulares (Spector, 1984).

En 1986 (Jensson *et al.*, 1986) se descubre que uno de los compuestos derivados de la peroxidación, el 4-hidroxinonenal, es sustrato de un isoenzima de la glutatión S-transferasa en el hígado de la rata, en el riñón de este mismo animal (Romero *et al.*, 1988), y también en el hombre (Danielson *et al.*, 1987). En 1989 se detecta esta

actividad, aunque en muy pequeña cantidad, por primera vez en el cristalino cataratoso humano (Romero *et al.*, 1989).

La peroxidación lipídica puede jugar un papel importante en la formación de la catarata, actuando como mecanismo iniciador de la formación de radicales (Sevanian y Hochstein, 1985; Bhuyan *et al.*, 1991).

Existen evidencias de que la concentración de peróxido de hidrógeno está elevada en el humor acuoso de algunos pacientes con catarata (0.9 mM frente a 0.025 mM en el humor acuoso del cristalino sano) (Spector y Garner, 1981). La procedencia de éste es desconocida, pero como ya se ha comentado, el ácido ascórbico podría ser una fuente de peróxido de hidrógeno si se combina con la luz y un ion metálico. En cualquier caso, un tejido como el cristalino, que está expuesto a radiaciones de muy alta energía, puede generar también otros radicales, como el anión superóxido (Ohrloff y Hockwin, 1986). De cualquier forma, el cristalino tiene mecanismos para protegerse frente a la acción de los radicales libres, incluyendo la catalasa y la glutatión peroxidasa (Reddy y Giblin, 1984; Augusteyn, 1981). Es conocido que el cristalino posee una elevada concentración de glutatión (GSH), y que este contenido no está distribuido uniformemente dentro del mismo, siendo la concentración mayor en la periferia que en el núcleo del mismo (Reddy *et al.*, 1980). Además, se ha encontrado reducción en el nivel de glutatión en cristalinios cataratosos (Altomare *et al.*, 1995), así como disminución de las actividades de enzimas antioxidantes dependientes del glutatión, como la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa (Rogers y Augusteyn, 1978; Fecondo y Augusteyn, 1983). Debe asumirse que estos mecanismos antioxidantes protectores estén dañados para que el cristalino sea más susceptible al daño oxidativo.

La hipótesis de que la peroxidación lipídica juega un papel clave en la formación de las cataratas se apoya en la existencia de un modelo animal en el que se puede inducir cataratas subcapsulares posteriores mediante la inyección intravítrea de productos con actividad peroxidante en el ojo del conejo (Goosey *et al.*, 1984). También se ha observado que la administración de butionina sulfoximina (un inhibidor específico de la síntesis del glutatión) induce catarata en ratones (Calvin *et al.*, 1986)

Aunque el origen etiopatogénico de la catarata se acepta como multifactorial, en casi todos los casos los factores cataratogénos acaban provocando una disminución del GSH y los enzimas antioxidantes con el relacionados, en algunos casos de más del 70%

de sus niveles habituales. Esta disminución permite que los radicales libres acaben provocando modificaciones oxidativas de lípidos o proteínas del cristalino, con pérdida irreversible de la transparencia del mismo.

De entre las proteínas cristalinas, las más susceptibles al daño oxidativo son aquellas asociadas con las proteínas de membrana, en concreto, los aminoácidos metionina y cisteína son los más vulnerables (Spector, 1984). La oxidación de estos aminoácidos produce un cambio estructural en la proteína, desplegándose, y exponiendo a la oxidación a nuevos grupos cisteína, que se encontraban enterrados y de este modo protegidos. Posteriormente los grupos disulfuros (generados por la oxidación de los grupos sulfhidrilos) forman enlaces cruzados, produciendo una agregación de las proteínas en especies de muy alto peso molecular. Si se produce este tipo de modificación en las proteínas de membrana se interfiere con la función normal de ésta, afectando al transporte enzimático y a la permeabilidad de la misma, aunque también existen evidencias de que el daño oxidativo puede actuar directamente sobre estos mecanismos. (Borchman *et al.*, 1989; Delamere *et al.*, 1983; Garner *et al.*, 1983). La oxidación puede también afectar a los lípidos de membrana, alterando directamente la actividad de la bomba de cationes (Yeagle, 1989).

Aunque existen evidencias claras del papel del daño oxidativo en la formación de las cataratas, los mecanismos iniciadores del mismo siguen sin comprenderse. Queda además aún por demostrar si el uso de terapia antioxidante resulta eficaz para prevenir la formación de catarata.

III.3.- ETIOLOGÍA DE LA CATARATA

Edad: la catarata senil es la más frecuente. Pueden ser de 3 tipos: cortical, nuclear y subcapsular posterior. Aunque con el envejecimiento se transforma en catarata mixta (Hiller *et al.*, 1986).

Fármacos: los corticoides administrados por vía sistémica, tópica o periocular en función de la dosis y tiempo de administración y la susceptibilidad del paciente (suelen inducir opacidades subcapsulares posteriores), las *fenotiazinas* (depósitos pigmentados anteriores), los agentes *mióticos* (vacuolas en cápsula anterior) y la *amiodarona* (depósito estrellado anterior).

Traumatismos: La *contusión* o traumatismo grave no perforante puede provocar:

- Anillo de Vossius o imprimación de pigmento indiano en la cápsula anterior del cristalino, opacificación estrellada o en roseta de cápsula posterior, subluxación y dislocación cristaliniana.
- La *perforación* ocular con lesión capsular (catarata cortical focal).
- Las *radiaciones ionizantes* (opacidades en cápsula posterior y subcapsulares anteriores), la *infrarroja* (sopladores del vidrio), la *ultravioleta* (cataratas corticales) (Taylor *et al.*, 1988), las radiaciones de *microondas* (producen catarata por efecto térmico).
- Los agentes *químicos* (cataratas corticales).
- La *metalosis* (siderosis y calcosis) (Bhat, 1988).
- Las agresiones eléctricas.

Metabólicas: la *diabetes* (Van Heyningen, 1959), la *galactosemia* (Datiles *et al.*, 1982), la *hipocalcemia* (catarata tetánica) y el síndrome de *Wilson*.

Nutricionales: los niveles altos de riboflavina, vitaminas C y E o carotenos disminuyen el riesgo de catarata (Taylor y Hobbs, 2001). El tabaco aumenta el riesgo de catarata subcapsular posterior y nuclear (Cheng *et al.*, 2000).

Otras causas:

- Catarata secundaria a: uveítis anterior, pseudoexfoliación, atopia, procesos degenerativos (retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, atrofia girata hipotonía crónica, atrofia de iris), miopía grave, glaukomfleken (opacidades blanco-grisáceas que aparecen en la porción anterior del cristalino después de un glaucoma agudo de ángulo cerrado).
- Anomalías de la forma y desarrollo del cristalino: afaquia congénita, lenticono anterior y posterior, lentiglobo, coloboma, mancha de Mittendorf.

- Cataratas asociadas a otras patologías congénitas: síndrome de Peter, microesferofaquia, aniridia, Marfan, homocistinuria, hiperlisinemia, vítreo primario hiperplásico.
- Cataratas asociadas a alteraciones cromosómicas: trisomías 21, 13-15, 16-18, etc.

III.4.- TIPOS DE CATARATA

Congénitas: polar, sutural, nuclear, capsular, lamelar, completa, membranosa (Merin, 1974); estas cataratas presentan diferentes características dependiendo del momento del desarrollo embriológico y del grado de alteración congénita; la catarata congénita es la que está presente en nacimiento, la catarata infantil es la opacidad cristalina que se desarrolla en el primer año de vida. Sin embargo en ocasiones ambos términos pueden intercambiarse ya que a veces es difícil de detectar.

Adulto (las más frecuentes):

- *Nuclear* (Figura III.1): la esclerosis y opacificación del núcleo del cristalino es la consecuencia de la involución senil del cristalino (Jedziniak *et al.*, 1978). Suelen ser bilaterales pero de evolución asimétrica, en casos muy evolucionados el núcleo se opacifica y adopta una coloración marrón denominándose catarata *brunescente*.

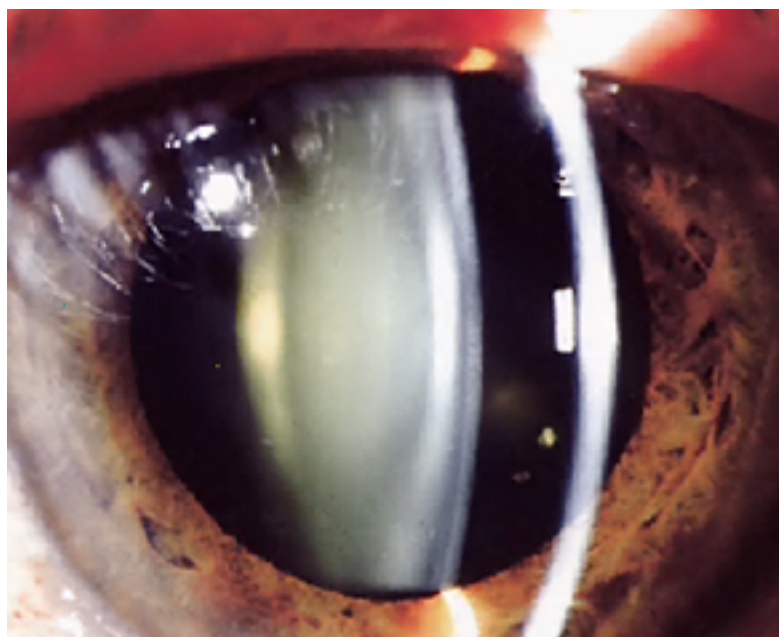


Figura III.1. Catarata nuclear- fotografía en lámpara de hendidura mostrando la opacificación del área del núcleo.

- *Cortical* (Figura III.2): las opacidades de la corteza del cristalino (opacidades cuneiformes) se deben a la hidratación y cambios en la composición de iones de las fibras (Mathias *et al.*, 1997). Pueden verse vacuolas y fisuras en la corteza del cristalino, adoptando las opacidades una disposición de rueda de carro (Duncan y Bushell, 1979). Si continúa la evolución y la hidratación de las fibras del cristalino se forma la denominada catarata cortical *intumesciente* y si todo el contenido se opacifica se forma la denominada catarata *madura, hipermadura* (degeneración del material cortical con salida del mismo a través de la cápsula) y la catarata *morganiana* (Figura III.3: arrugamiento de la cápsula del cristalino por licuefacción de la corteza).

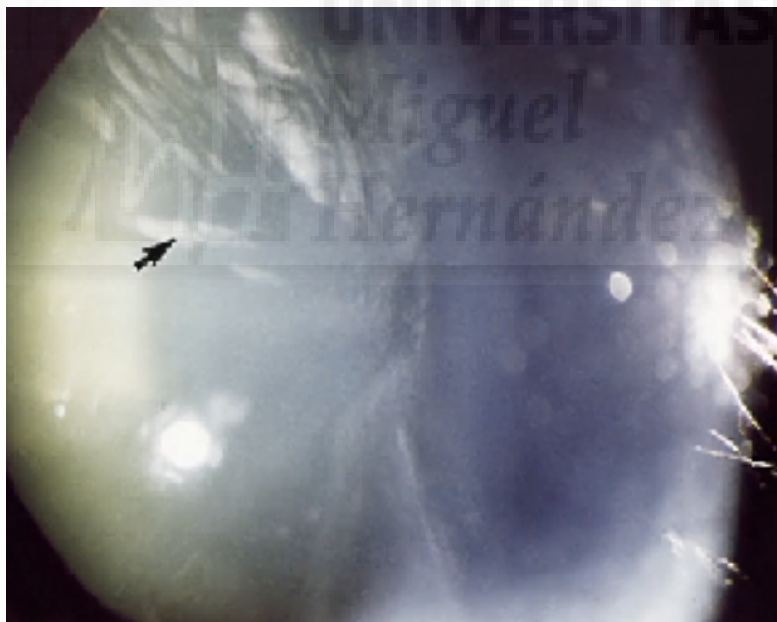


Figura III.2. Catarata cortical. La flecha señala una opacidad en la periferia media del cristalino.

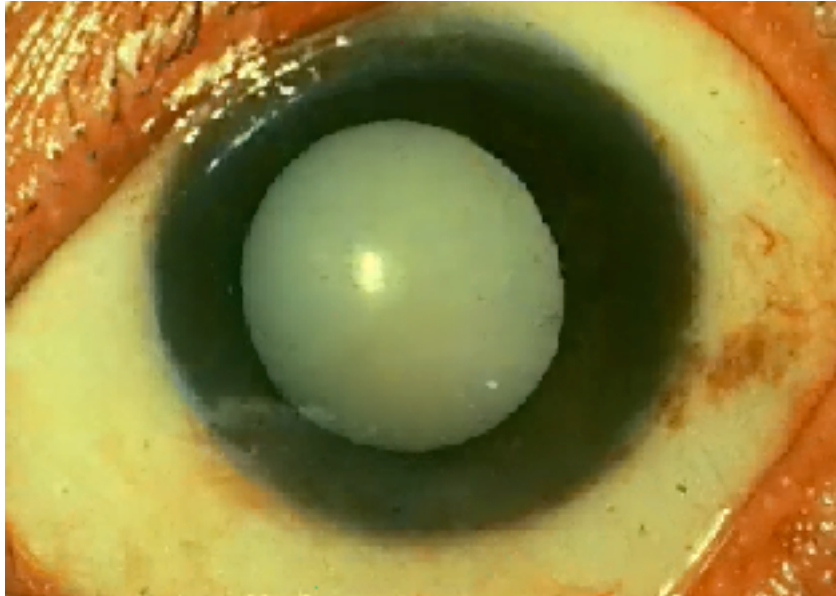


Figura III.3. Catarata Morgagniana. Esta es una catarata madura que es también intumesciente (hinchada), rellena con córtex licuado.

- *Subcapsular posterior* (Figura III.4): suele formarse en pacientes jóvenes, con núcleo y corteza transparentes, afecta a la corteza posterior y suele ser de localización axial. Afecta principalmente a la visión próxima (Al-Ghoul *et al.*, 1998).

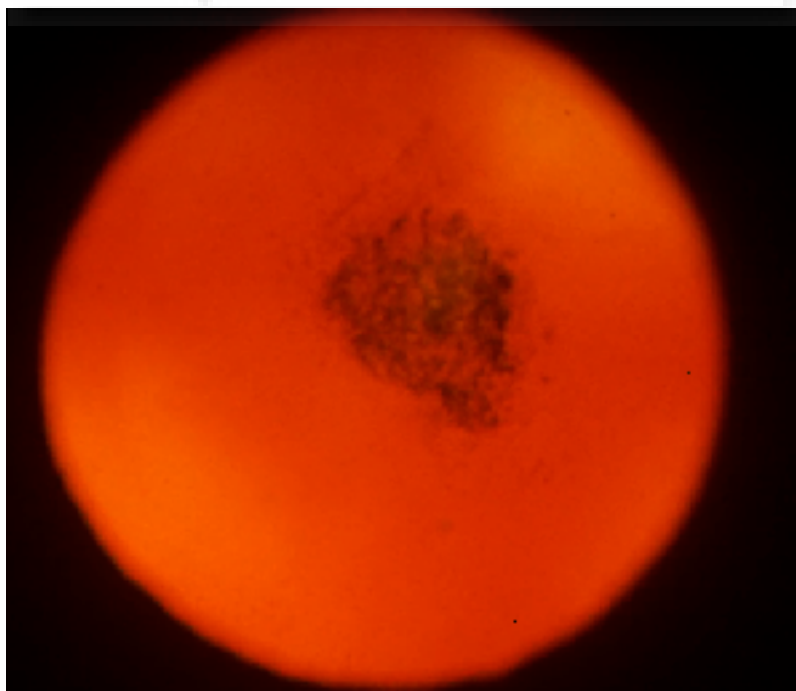


Figura III.4. Catarata subcapsular posterior. Resalta la localización central, que provoca graves deslumbramientos.

III.5.- CLÍNICA DE LA CATARATA

Descenso de la agudeza visual: las cataratas subcapsulares posteriores reducen la visión de forma importante a pesar de ser de poca intensidad, sobre todo para cerca, por la miosis de la acomodación. Las nucleares se asocian con una mejoría de la visión próxima y descenso de la visión lejana. Las cataratas corticales si no afectan al eje visual permiten una buena agudeza visual tanto cerca como de lejos (American Academy of Ophthalmology Committee on Ophthalmic Procedures, 1990).

Deslumbramiento: variable en intensidad, desde un descenso de la sensibilidad contraste en situaciones de buena iluminación, hasta un gran deslumbramiento con luz solar o luz artificial durante la noche (Rubin, 1988). Es más intenso en las subcapsulares posteriores y menos en las nucleares.

Miopización: el aumento de la densidad o el desarrollo de la catarata del núcleo del cristalino provoca un aumento del poder refractivo del cristalino que termina la miopización del ojo mejorando la visión próxima; es propio sólo de las cataratas nucleares.

Diploia monocular: los cambios nucleares pueden localizarse en las capas internas del núcleo lenticular, resultando un cambio de refracción de zona afectada.

Leucocoria: el cristalino opaco se transforma de ser una estructura transparente en una estructura de coloración blanquecina o amarillo-marrón dependiendo del tipo de catarata y el tiempo de evolución.

III.6.- TRATAMIENTO DE LA CATARATA

III.6.1.- TRATAMIENTO MÉDICO

No existe un tratamiento médico eficaz frente a la formación de cataratas, por lo que siempre que sea posible debe ofrecerse la posibilidad de cirugía para resolver el

déficit de la función visual generado por la catarata (Kador, 1983; Hockwin y Schmitt, 1990).

Los inhibidores de la aldosa reductasa al bloquear la conversión de glucosa en sorbitol previenen la formación de catarata causadas por el azúcar en animales (Lou *et al.*, 1996). Existen múltiples sustancias en estudio como vitaminas C y E (Christen *et al.*, 1996; Stewart-Dehaan *et al.*, 1999), aspirina (Cotlier y Sharma, 1981), agentes reductores del sorbitol, etc. Los midriáticos pueden beneficiar a pacientes con cataratas axiales pequeñas.

Los pacientes que no pueden ser intervenidos de catarata pueden beneficiarse de ayudas ópticas de baja visión, como prismáticos y lupas, amplificadores de imagen, luces potentes, etc.

III.6.2.- TRATAMIENTO QUIRÚRGICO

III.6.2.1.- Anamnesis y exploración

El momento de operar la catarata depende, no de la cantidad de visión del paciente en términos absolutos, sino de lo que dificulta la catarata para desarrollar la vida habitual.

En la anamnesis debemos indagar en los antecedentes familiares y personales que puedan afectar a la cirugía y a la recuperación visual: desprendimientos de retina, malformaciones oculares, glaucoma, hipertensión arterial, diabetes, EPOC, cardiopatías, alergias, etc.

En la exploración debemos estudiar minuciosamente la agudeza visual (en condiciones variables de luminosidad), si se puede, la sensibilidad al contraste, el estado de la conjuntiva, reborde palpebral, vías lagrimales, córnea (especialmente el endotelio), cámara anterior, tensión ocular, iris, dilatación pupilar y características de la catarata.

Debe revisarse el fondo de ojo para descartar patología macular o del nervio óptico que pudiera condicionar el pronóstico funcional e incluso descartar la cirugía. Se realizará una biometría para determinar la potencia de la lente intraocular (LIO) que deberemos implantar. Hay que determinar también la agudeza visual potencial de paciente por métodos convencionales (PAM, interferometría o “*pinhole*”).

Existen unos casos especiales como son los pacientes que presentan una catarata total que nos impide ver el fondo de ojo y nos dificulta la posibilidad de hacer un pronóstico de la intervención. En estos casos está indicado realizar unas pruebas específicas como son la ecografía ocular y/o las pruebas electrofisiológicas que nos permitirán saber si hay lesiones en retina y nervio óptico que empeoran el pronóstico visual (Guyton, 1987). A pesar de estas y otras pruebas, hasta que no realizamos la intervención desconocemos con exactitud el pronóstico visual.

III.6.2.2.- Anestesia

La cirugía de la catarata se puede abordar con anestesia general, local (retrobulbar o peribulbar) y tópica.

La **anestesia general** solo se utiliza actualmente en casos muy específicos: niños, pacientes muy nerviosos o con deterioro mental que impida su colaboración durante el acto quirúrgico.

La **anestesia local** retrobulbar o mucho más frecuente peribulbar es una técnica sencilla que consiste en inyectar el anestésico en el espacio que rodea el globo ocular. La mayor complicación reside en el riesgo de puncionar accidentalmente el globo ocular o provocar una hemorragia orbitaria al romper de forma involuntaria algún vaso orbitario (Duker *et al.*, 1991; Edge y Navon, 1999). En casos excepcionales puede provocar lesión del nervio óptico, y también excepcionalmente producir reacciones vaso-vagales con posible afectación sistémica, sobre todo en pacientes cardiopatas.

La anestesia tópica consiste en realizar la cirugía mediante la administración de anestésico en forma de gotas, ayudándose en ocasiones de la administración de anestésico en la cámara anterior del globo ocular (Gills *et al.*, 1997; Gillow *et al.*, 1999).

III.6.2.3.- Midriasis o dilatación pupilar

El diámetro del núcleo del cristalino o del cristalino en su totalidad supera el diámetro pupilar en condiciones estándar y más aún bajo la intensa luz del microscopio. Para evitar traumatizar el esfínter pupilar durante la extracción del cristalino en la cirugía de la catarata debemos dilatar la pupila previamente a la cirugía mediante fármacos todo lo que sea posible. En casos se mala dilatación pupilar por sinequias

posteriores, rubeosis de iris, pseudoexfoliación, etc, nos ayudaremos mediante procedimientos mecánicos (dilatadores de iris) o realizando esfinterotomías.

III.6.2.4.- Extracción intracapsular de cristalino (EICC)

Es la técnica quirúrgica que se realizaba hace años para extraer el cristalino hasta el desarrollo de microscopios, técnicas e instrumentación, que han permitido modificar la técnica y reducir el alto índice de complicaciones que presentaba esta cirugía. Actualmente todavía tiene algunas indicaciones como el caso de cataratas luxadas, hipermaduras o intumescentes e inestables (Barraquer, 1958; Krawicz, 1961).

Además del material e instrumental necesario en la microcirugía de polo anterior, se necesita un sistema de extracción del cristalino como puede ser un fórceps, una ventosa o un terminal de crioextracción para extraer todo el cristalino. La rotura zonular puede realizarse por simple desgarró o mediante alfa-quimotripsina a una concentración de 1:5000-10000, introducido en el área zonular mediante una cánula fina.

El masaje ocular o el uso de agentes hiperosmóticos previo a la cirugía minimiza el prolapso del vítreo al extraer el cristalino. La iridectomía periférica reduce el riesgo de bloqueo pupilar post-cirugía causado por el desplazamiento anterior del vítreo; es además una buena vía de acceso hacia el área zonular para introducir la quimotripsina.

Además del astigmatismo postquirúrgico en estos pacientes afáquicos se crea un defecto de refracción de +10 a +12 dioptrías, si el paciente era previamente emélope, que puede corregirse añadiendo un cristal convergente, una lente de contacto o colocando una LIO de cámara anterior.

Esta cirugía además del defecto de refracción que genera, tiene otras complicaciones: magnificación de imágenes, alta incidencia de desprendimiento de retina, de edema macular quístico, molestias visuales, etc. que no satisfacían al paciente ni al cirujano, por lo que se investigaron y desarrollaron nuevas técnicas quirúrgicas que han reducido las complicaciones.

III.6.2.5.- Extracción extracapsular del cristalino (EECC)

Esta técnica, posterior cronológicamente a la anterior, resuelve una gran parte de los problemas y complicaciones de la técnica descrita anteriormente (Daviel, 1753). Elimina las complicaciones generadas al romper la compartimentación ocular, el vítreo no

ocupa la cámara anterior, no contacta con iris ni endotelio, reduce la movilidad del iris y vítreo (iridodónesis o endoftalmodonesis, ya que también afecta al vítreo) con los movimientos oculares, reduce la incidencia de edema macular cistoide, desprendimiento de retina, edema corneal, etc.

Es la técnica quirúrgica por excelencia bien sea extrayendo el núcleo por expresión o bien mediante facoemulsificación. Tiene una contraindicación relativa en casos de inestabilidad zonular y en algunos casos de glaucoma facolítico. Permite realizar una incisión menor que en la técnica anterior y por tanto es más estable y genera menor astigmatismo. La incisión puede ser escleral o esclerocorneal (de unos 9-12 mm) al igual que en la cirugía anterior, cuanto más escleral sea, menor astigmatismo induce pero mayor riesgo de prolapso de iris. Esta incisión puede ir precedida de una disección conjuntival realizando un colgajo de conjuntiva que permitirá recubrir posteriormente la zona de la incisión y sutura, lo que aumenta el confort del paciente.

La cirugía de la catarata por cualquiera de sus posibles técnicas puede realizarse ayudándonos del uso de materiales viscoelásticos. Los agentes viscoelásticos generalmente derivan del ácido hialurónico y se utilizan sobre todo al principio de la cirugía para mantener formada la cámara anterior, y antes de introducir la LIO en el saco capsular para distender sus paredes y evitar roturas de la cápsula posterior al contactar con los hápticos o con la óptica de la lente.

La capsulotomía anterior, de diferentes formas según las preferencias del cirujano (sobre, abrelatas, sonrisa, etc.) debe ser lo suficientemente amplia como para permitirnos extraer el núcleo del cristalino. Es posible también realizar una capsulorrexis circular continua de gran tamaño, que nos facilitara la extracción del córtex y la implantación más adecuada de la LIO. Una vez realizada la capsulotomía tanto en la EECC como en la facoemulsificación se realiza una hidrodisección (separación mediante suero a presión introducido con una cánula fina) del núcleo, de las masas corticales y de la cápsula del cristalino.

III.6.2.6.- Facoemulsificación

La facoemulsificación la técnica actual de elección para la cirugía de cataratas, en la cual se utilizan las vibraciones ultrasónicas para fragmentar la lente, al mismo tiempo que se procede a la irrigación y aspiración de los fragmentos. Desde su introducción a finales de los 60, se ha demostrado como un método extremadamente

eficaz en la extracción de la catarata (Kelman, 1967). Es una variante de la técnica de EECC en la que se extrae el núcleo a través de una pequeña incisión lo que reduce las complicaciones relacionadas con la incisión (sobre todo el astigmatismo) (Kelman, 1994); la rehabilitación visual y la curación es más rápida en comparación con la técnica anteriormente descrita de EECC.

El principio de la facoemulsificación consiste en fragmentar el núcleo y aspirarlo a través de una aguja fina. Esta técnica requiere un cambio en los hábitos del cirujano y un aprendizaje en el manejo del facoemulsificador.

El abordaje del cristalino se realiza a través de una incisión, de unos 3 mm, valvulada, en córnea a 1-2 mm. del limbo (hay cirujanos que realizan un túnel escleral); se realiza también una paracentesis de servicio que nos ayudará a manipular el cristalino, ambas incisiones no suelen precisar sutura después de la cirugía; si son de un tamaño inferior a 4 mm no suelen generar astigmatismo (o éste es mínimo).

La capsulorrexia consiste en realizar un corte continuo y circular, rasgando la cápsula anterior de un tamaño suficiente para poder manipular el cristalino e introducir la LIO (Stark y Streeten, 1984). Proporciona un soporte adecuado para la LIO, y facilita los pasos de la facoemulsificación, haciendo que ésta sea un procedimiento mucho más seguro.

El aparato de facoemulsificación tiene diferentes variantes según los fabricantes, todos tienen unas características comunes: consta de un terminal de mano con una aguja en su extremo que realiza los cortes sobre el núcleo. La rotura del cristalino se realiza mediante una vibración que se transmite al extremo de la aguja del aparato. Además el terminal va conectado a un sistema de aspiración (que extrae el material fragmentado) e irrigación (que mantiene la cámara anterior profunda). Los aparatos de facoemulsificación pueden utilizar sistemas de bajo flujo o de aspiración. La mayoría de los de bajo flujo utilizan bombas peristálticas, y los de aspiración una bomba Venturi. Cada sistema tiene sus ventajas y desventajas, y es el cirujano el que debe conocer a fondo las propiedades de cada aparato en particular, para así conseguir los mejores resultados.

La última novedad en la facoemulsificación del cristalino es la técnica MICS o cirugía de micro-incisión, que utiliza instrumental más fino para reducir el tamaño de la incisión a 2 mm o menos y aprovecha las nuevas lentes intraoculares plegables para

completar la cirugía con un trauma ocular mínimo y una rápida recuperación visual (Mamalis, 2003).

III.6.2.7.- Lensectomía por pars plana

La realización de una vitrectomía requiere de medios (córnea y cristalino) transparentes. Además, la vitrectomía en sí misma es cataratógena, por lo que en determinadas situaciones debemos realizar la cirugía del cristalino previa a la vitrectomía. El abordaje del cristalino puede realizarse por vía anterior según las técnicas anteriormente descritas o a través de la *pars plana* aprovechando las incisiones de la vitrectomía. Esta cirugía no debe realizarse por vía posterior en casos de cristalinos duros (catarata con esclerosis nuclear brunesciente).

La técnica consiste en realizar una capsulotomía posterior, fragmentar el núcleo y aspirar el cristalino fragmentado y la corteza (Diamond y Kaplan, 1979).

III.6.2.8.- Implantes de lentes intraoculares (LIO)

El primer implante de una lente intraocular lo realizó Ridley en 1949 (Ridley, 1953). Desde entonces se han desarrollado múltiples materiales en la manufacturación de las lentes así como las características de estas dependiendo del destino que tengan en el globo ocular (de cámara anterior fijadas en el ángulo o en el iris, de cámara posterior en sulcus o en el saco, plegables de silicona o acrílicas, etc.). La potencia de la lente a implantar es variable, dependiendo de la constante propia de la lente, la longitud axial del globo ocular y los radios de curvatura de la córnea.

Las lentes de cámara anterior se colocaban inicialmente después de la EICC. Podían fijarse en el ángulo iridocorneal mediante unos hápticos rígidos que se prolongaban desde la zona óptica de la lente, pero generaron múltiples complicaciones (alteración del endotelio corneal, síndrome UHG, atrofia indiana, etc). Este problema pareció resolverse con las LIO de soporte iridiano pero también aparecieron complicaciones: dislocación de la LIO con alteración endotelial, pseudofacodonesis, edema macular, alteraciones pupilares, atrofia iridiana, etc.

Actualmente las LIO de cámara anterior (de hápticos flexibles) se utilizan en casos de implante secundario en pacientes afáquicos o cuando se produce una rotura amplia de la cápsula posterior que impide colocar el implante en saco capsular o en el sulcus (Jaffe, 1999).

Posteriormente se desarrolló la técnica EECC y las LIO de cámara posterior detrás del iris (Pearce, 1977). Con una rápida evolución y diferentes formas y características se ha llegado a un diseño de lente biconvexa de hápticos flexibles que permite insertarla en el saco capsular o en sulcus o bien de forma mixta (Shearing, 1978). Estas lentes han variado sus diseños de tamaño, forma, etc., en función de que se buscara facilitar la visualización del polo posterior, la realización de láser retiniano o de la cápsula posterior, la multifocalidad, etc, se fabrican con diferentes compuestos polipropileno, PMMA, con superficie heparinizada, etc.

En los últimos años con la generalización de la facoemulsificación como técnica de la cirugía de la catarata se han desarrollado unas lentes (silicona o acrílicas) que pueden plegarse sobre si mismas e introducirse por incisiones inferiores a 4 mm (Mazzocco *et al.*, 1986).

El implante de LIO es la indicación principal en todos los pacientes. En algunos casos las LIO pueden estar contraindicadas: las LIO de cámara anterior no deben utilizarse en pacientes con anomalías endoteliales, glaucoma, sinequias anteriores extensas, vasos anormales en el ángulo indiano y están prácticamente contraindicadas si se realiza una técnica quirúrgica combinada de catarata y glaucoma

Una situación especial es el caso de los niños con catarata congénita o traumática. No hay en España una regla establecida, pero en general está indicado implantar una LIO en los casos de niños mayores de 1 año con catarata unilateral para evitar la ambliopía. En este caso hay autores que incluyen la capsulorrexis posterior y vitrectomía anterior durante el mismo acto quirúrgico. Debemos ser agresivos con los antiinflamatorios y cautos en el momento de decidir la potencia de la LIO, puesto que el globo ocular de los niños está todavía en desarrollo.

III.6.2.9.- Complicaciones de la cirugía de la catarata

i) Intraoperatorias

- *Aplanamiento de la cámara anterior:* durante el acto quirúrgico la cámara se puede aplanar por diferentes motivos: inadecuada presión de infusión-irrigación, presión vítrea positiva, incisión de gran tamaño, hemorragia o efusión supracoroidea, presión externa sobre el globo ocular, etc. Ello va a suponer que en las maniobras que realicemos en la cámara anterior dañaremos el endotelio

corneal provocando una descompensación corneal posterior. Para evitarlo rellenaremos la cámara anterior con material viscoelástico y/o realizaremos un cierre parcial de la incisión.

- *Hemorragia*: la hemorragia expulsiva (desprendimiento hemorrágico de la coroides), poco frecuente pero de consecuencias catastróficas para el paciente y el cirujano (Arnold, 1992; Price y Whitson, 1994; Speaker *et al.*, 1991). Se presenta como un aumento brusco de la presión intraocular (PIO), oscurecimiento del reflejo rojizo pupilar, prolapso del iris, expulsión de la lente o cristalino, salida de vítreo y hemorragia de sangre roja. El cirujano debe cerrar la incisión lo más rápidamente posible y practicar esclerotomías que permitan drenar la hemorragia y reapplicar la coroides desprendida. El desprendimiento de coroides puede presentarse en el postoperatorio inmediato. Clínicamente produce dolor, pérdida de visión y aplanamiento de la cámara anterior. Si la PIO se controla, se resuelve de forma espontánea o tratándolo empíricamente con corticoides. Si persiste el desprendimiento coroideo, el aplanamiento de la cámara anterior, o no se controla la PIO, deberemos realizar un drenaje del espacio supracoroideo.
- *Rotura capsular o diálisis zonular*: la rotura de la cápsula posterior tiene diferente importancia según se produzca en la técnica clásica de EECC o por facoemulsificación. En la clásica EECC una rotura pequeña permite seguir la técnica con la ayuda del viscoelástico y mucha prudencia nos permite implantar la LIO en el saco. En caso de roturas muy grandes, extraemos todos los restos de material cortical e intentamos colocar una LIO sobre la cápsula posterior, sobre los restos de la cápsula anterior, suturada en el sulcus o en la cámara anterior (Gimbel, 1990). En la facoemulsificación la situación se complica debido a las variaciones y altas presiones con las que se trabaja con la irrigación automática (Snyder *et al.*, 1998). Si la rotura es pequeña se puede intentar continuar la cirugía pero si es muy

grande se puede reconvertir la cirugía hacia una técnica clásica de EECC. El peligro durante esta cirugía es que pueden pasar partículas de núcleo o del córtex del cristalino a la cámara vítrea y se pueden producir fuertes tracciones sobre el vítreo (Sugar y Schertzer, 1999). En esta situación debe realizarse una vitrectomía anterior eliminando los restos del cristalino y el vítreo anterior (Cionni y Osher, 1995).

- *Iridodiálisis (desgarro de la base iridiana)*: ocurre por la manipulación del tejido ocular; si es ópticamente o cosméticamente insignificante, no precisa tratamiento; si es grande, puede producir diplopia monoocular, por lo que debemos resolverla suturándola.
- *Toxicidad retiniana a la luz*: la exposición prolongada del paciente a la luz del microscopio cuando tiene colocada la LIO puede provocar una quemadura en el epitelio pigmentario retiniano que si es central, foveal, supone una gran reducción de la visión y si es extrafoveal provocará un escotoma paracentral.

ii) *Postoperatorias*

- *Hemorragia*: el hifema inmediato aparece como consecuencia de traumatismos sobre el iris, se resuelve rápidamente de forma espontánea salvo que se mezcle con vítreo o material viscoelástico. Debemos controlar durante el tiempo que está presente la PIO. El hifema que aparece meses o años después de la cirugía (síndrome Swan) se debe a la lesión de los vasos o el tejido vascular por el implante.
- *Edema corneal*: Suele ocurrir en el postoperatorio inmediato. Se debe a la descompensación endotelial causada por la acción de los radicales libres, la inflamación y la elevación de la PIO (Arffa, 1999). La frecuencia del edema corneal es de 24-62% en la

cirugía extracapsular (Bourne y Kaufman, 1976) y del 2-5% en la facoemulsificación (Jaffe *et al.*, 1989). Generalmente se resuelve por completo en las 4 semanas siguientes a la cirugía. En los casos persistentes, pueden generar una descompensación corneal crónica y una queratopatía bullosa. No obstante, la pérdida de células endoteliales durante la facoemulsificación es un efecto secundario frecuente y bien documentado en la literatura de la cirugía de la catarata (Ventura *et al.*, 2001; Diaz-Valle *et al.*, 1998). Quirúrgicamente el trauma al endotelio (p.e. con la inserción de las lentes intraoculares) puede romper las uniones de las células endoteliales y provocar edema corneal. Las uniones estrechas (“tight junctions”) están también reguladas por el citoesqueleto (F-actina) en las células endoteliales (Kim *et al.*, 1992). Los factores y agentes que causan edema en las células endoteliales y edema corneal no parecen afectar a las uniones estrechas (“tight junctions”), pero sí producen una pérdida de uniones “gap” (Watsky *et al.*, 1990)

- *Desprendimientos de la membrana de Descemet*: En ocasiones durante el acto quirúrgico en las maniobras de entrada en la cámara anterior con los instrumentos de cirugía se producen desprendimientos de la membrana de Descemet que producen descompensación corneal y bullas en la zona del desprendimiento. Si lo observamos durante la cirugía podemos resolverlo inyectando una burbuja de aire en la cámara anterior; si son muy grandes pueden precisar un punto de sutura.
- *Queratopatía bullosa*: se debe a la destrucción de las células endoteliales de la córnea. Puede estar causada por el contacto del hongo vítreo con el endotelio corneal en la EICC, por la manipulación quirúrgica en la cámara anterior, por los implantes de cámara anterior, sobre todo los de fijación iridiana; puede verse agravado por el incremento de la PIO. Debemos tratarlo energicamente con agentes hiperosmóticos, corticoides e incluso lentes de contacto terapéuticas. En el caso de descompensarse la

córnea, la queratoplastia penetrante presenta muy buenos resultados anatómicos, el paciente suele dejar de tener dolor, pero funcionalmente suele recuperar poca visión, ya que suele asociarse a un edema macular cistoide.

- *Aumento de la presión intraocular (PIO)*: el aumento de la PIO moderado es frecuente después de la cirugía de la catarata y no requiere el uso prolongado de fármacos hipotensores oculares. Los restos de material viscoelástico que pueden quedar de forma inadvertida en la cámara anterior, en el ángulo o detrás del iris pueden causar un incremento de la PIO. La alfaquimiotripsina, utilizada para romper la zónula, el bloqueo pupilar en la EICC, la sangre en cámara anterior, el bloqueo ciliar, la endoftalmitis, la retención de material cortical, la liberación de pigmento, los corticoides, las sinequias anteriores, etc. pueden ser también causa de aumento de la PIO.
- *Edema macular cistoide (EMQ)*: La patogenia es desconocida; parece ser que se debe al aumento de la permeabilidad capilar perifoveal y a la acción de las prostaglandinas generadas por la inflamación, las tracciones del vítreo y la toxicidad de la luz ultravioleta. Angiográficamente está presente en el 40-60% de las EICC (Hitchings y Chisholm, 1975) y en el 15-20% de las EECC (Allen y Jaffe, 1976), y en menos del 0,5% de las facoemulsificaciones. Aunque la mayor parte de los pacientes están asintomáticos, cursa con disminución de la visión central. Puede durar desde semanas a meses, con resolución espontánea salvo en casos en los que la pérdida visual se hace permanente. Se ha observado una mayor incidencia y peor pronóstico en pacientes portadores de lentes de soporte indiano, en cirugías complicadas, en pacientes con vítreo atrapado en la incisión y en casos de uveítis crónicas. Puede resolverse con la administración de antiinflamatorios no esteroideos tópicos, y recientemente mediante la inyección intravítrea de corticoides depot (Triamcinolona) (Benhamou *et al.*, 2003).

- *Desprendimiento de retina*: la incidencia de desprendimiento de retina en la EICC es del 2-3%. Esta incidencia se reduce con la EECC siempre que no se produzca la rotura de la cápsula posterior. El desprendimiento se produce generalmente en los primeros 6 meses tras de la cirugía o de la capsulotomía posterior mediante láser YAG. Existen unos factores predisponentes: Alta miopía (más de 25 mm), degeneraciones retinianas periféricas predisponentes e historia anterior de desprendimiento en el ojo contralateral.
- *Endoftalmitis*: la endoftalmitis es una de las complicaciones potencialmente más graves de la cirugía de catarata. Generalmente se distinguen dos formas, una precoz y una tardía (Piest *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1999). La forma precoz o aguda se produce en los primeros 2-5 días generalmente, puede tener un curso fulminante si no se diagnostica rápidamente y se trata de forma precoz y agresiva. Clínicamente se caracteriza por dolor, disminución de la visión, reacción inflamatoria intensa en cámara anterior, hiperemia, afectación del polo posterior con incluso casos en los que no puede visualizarse el fondo de ojo. La forma crónica o tardía se presenta como una reacción inflamatoria del polo anterior de intensidad variable, que inicialmente responde bien a los corticoides, que incluso se confunde con inflamaciones estériles y que va cronificándose y afectando a la visión de forma progresiva.
- *Fístulas o defectos del cierre de la incisión*: la filtración de humor acuoso a través de la incisión podemos detectarla en el postoperatorio inmediato y tiende a resolverse de forma espontánea y rápida si cesamos la administración de corticoides, administramos midriáticos o ciclopléjicos, reductores de la producción de humor acuoso y realizamos un vendaje compresivo. Si a pesar de todo persiste, dependiendo del tamaño y las molestias que produce al paciente, o si se inflama o infecta, tomaremos la determinación de corregirlo quirúrgicamente o de

controlarlo; más aún, si se forma una fistula que drena al espacio subconjuntival.

- *Hipotonía*: está causada generalmente por una alteración del cierre de la incisión, ciclodíalisis inadvertida, desprendimiento coroideo o desprendimiento de retina.
- *Glaucoma maligno*: esta causado por una disección posterior del humor acuoso en el vítreo. Esto provoca un desplazamiento anterior de las estructuras con bloqueo del ángulo y aumento de la PIO aún en presencia de iridotomías o iridectomías periféricas. El tratamiento se basa en administrar ciclopléjicos a altas dosis para desplazar el diafragma indiano posteriormente y/o romper quirúrgicamente la hialoides anterior con un cuchillete, el láser YAG o la vitrectomía.
- *Retención de material cortical*: los restos de material cristalino que pueden quedar en la cirugía de la catarata pueden dar lugar a una reacción inflamatoria desproporcionada que debe distinguirse de la endoftalmitis. No suele ser necesaria la reintervención y simplemente con el uso de ciclopléjicos y antiinflamatorios y la observación, estos restos terminan por reabsorberse. Si la reacción inflamatoria fuera muy importante o aparecen otras complicaciones deben aspirarse los restos corticales en quirófano.
- *Incarceración vítrea*: la rotura de la hialoides anterior y de la cápsula posterior puede significar que el vítreo ocupe la cámara anterior y salga por la incisión, esto puede generar tracciones de la retina periférica, inflamación crónica y edema macular.
- *Astigmatismo inducido por la sutura*: es la complicación más frecuente, ya que en mayor o menor grado, la mayor o menor tensión de la sutura puede provocar un aplanamiento de la curvatura corneal, que al cortar la sutura pasadas 6-10 semanas desaparece el efecto regresando el astigmatismo en su mayor parte.

- *Descentramiento de la lente*: la lente puede quedar descentrada durante la cirugía debido a un insuficiente soporte zonular o bien en el postoperatorio debido a la fibrosis irregular de las cápsulas cristalínicas. El descentramiento por la alteración zonular podemos detectarlo en el postoperatorio inmediato y todavía hay tiempo de reposicionar o rotar la lente a una zona de mejor soporte (Tetz *et al.*, 1988). Cuando el descentramiento debido a la fibrosis no es grande no produce grandes molestias al paciente aunque en algunos casos es necesario extraer la lente, incluso con las cápsulas y colocar una nueva lente intraocular (suturada en sulcus si no queda apoyo capsular).
- *Síndrome UGH*: el síndrome de uveítis, glaucoma e hifema, todo junto o por separado era frecuente con el uso de lentes intraoculares de hápticos rígidos (Johnson *et al.*, 1984). Probablemente causado por el tamaño inadecuado del implante, por el contacto del implante con estructuras vasculares, por la manipulación errónea durante el implante de la LIO o por una reacción idiosincrásica del paciente al implante. Responde generalmente bien al tratamiento con antiinflamatorios y antiglaucomatosos, en caso contrario hay que extraer la LIO. La extracción del implante suele estar complicada por la fibrosis que se establece entre el ángulo y el implante.
- *LIO de potencia errónea*: el error lo detectaremos en las primeras refracciones postcirugía, si es pequeño no producirá un discomfort importante al paciente, pero si es alto y produce anisometropía debemos ponerlo en conocimiento del paciente y si fuera preciso cambiar la LIO lo antes posible. En la actualidad es posible evitar el recambio de la LIO utilizando las modernas técnicas de cirugía refractiva con láser excimer para corregir el defecto refractivo residual (Ayala *et al.*, 2001).

III.6.3.- AGENTES VISCOELÁSTICOS

III.6.3.1.- Propiedades físicas y aplicaciones clínicas.

La introducción de los agentes viscoelásticos en el uso de la cirugía oftalmológica intraocular ha supuesto un notable impacto en la práctica de la oftalmología. Debido a su estructura química, los materiales viscoelásticos poseen unas características únicas que les permiten una protección al endotelio corneal frente al trauma mecánico, y mantener el espacio intraocular, incluso en incisiones abiertas. El uso de agentes viscoelásticos es una práctica habitual en la cirugía del segmento anterior, tanto de cirugía extracapsular como en facoemulsificación.

Recientemente la Organización Internacional para la Estandarización de los Agentes Viscoelásticos ha recomendado utilizar el nuevo término de *Instrumentos Oftálmicos viscoquirúrgicos (OVSD)* (Arshinoff, 2000).

Es importante conocer que las diferentes propiedades reológicas de los agentes viscoelásticos tienen un impacto directo en las propiedades químicas de un determinado material. El conocimiento de estas propiedades permite al cirujano poder utilizarlos para distintos usos.

Las propiedades reológicas más importantes de los agentes viscoelásticos en oftalmología son la viscoelasticidad, viscosidad, pseudoplasticidad, y tensión superficial (Tablas III.1 y III.2).

La *viscoelasticidad* se refiere a la capacidad de una solución de volver a su forma original después de ser deformada. Esta propiedad es la esencia del uso los agentes viscoelásticos en oftalmología. La elasticidad permite a la cámara anterior recuperar su forma cuando se aplican fuerzas externas sobre la córnea.

La *viscosidad* traduce la dificultad de una solución para fluir, que es debida en parte al peso molecular de la sustancia. La viscosidad y viscoelasticidad se miden en centipoise (cps).

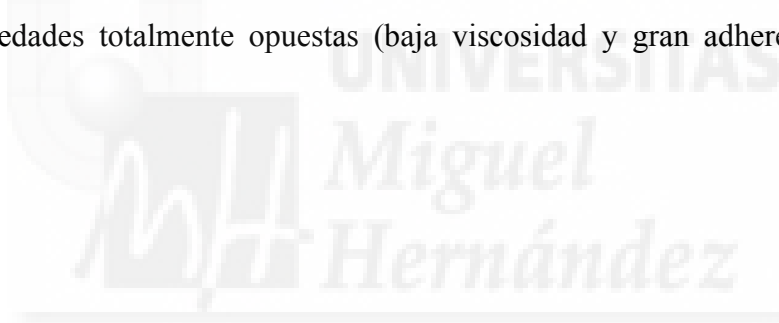
Para facilitar una óptima manipulación los agentes viscoelásticos deberían mantener el espacio y proteger los tejidos, permitir el movimiento de los instrumentos ayudar a la implantación de lentes intraoculares, y ser fácilmente introducidos en el ojo a través de una cánula pequeña. (Bothner y Wik, 1986). Hasta la fecha no se ha encontrado ningún agente viscoelástico que cumpla todos estos requisitos.

La *pseudoplasticidad* se refiere a la habilidad de una solución de transformarse, bajo presión, de una sustancia gelatinosa en una líquida.

La habilidad para recubrir de un agente viscoelástico se determina no solo por la tensión superficial del propio agente viscoelástico sino también por la tensión superficial del tejido de contacto, del material quirúrgico, de la LIO. La tensión superficial se calcula midiendo el ángulo formado por una gota de agente viscoelástico en una superficie plana. Una baja tensión superficial y un bajo ángulo de contacto indican una mejor capacidad de recubrimiento.

En las tablas III.1 y III.2 pueden observarse las propiedades físicas de varios agentes viscoelásticos.

Arshinoff (Arshinoff, 1994) ha dividido los agentes viscoelásticos en 2 categorías: 1) *Viscoelásticos cohesivos*, que poseen un alto peso molecular, un alto grado de plasticidad, y una gran tensión superficial, y 2) *Viscoelásticos dispersivos*, que tienen propiedades totalmente opuestas (baja viscosidad y gran adherencia a tejidos externos).





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Basándonos en la justificación antes mencionada, así como en las bases metodológicas y bibliográficas expuestas en el capítulo de introducción y puesta al día del tema, la presente Tesis Doctoral se ejecutará de acuerdo con la hipótesis de que los radicales libres son tóxicos para el endotelio corneal, así como que estos radicales libres provocan alteraciones estructurales en la córnea que van a colaborar con la mayor agresividad del proceso inflamatorio, potenciando su toxicidad sobre las estructuras del segmento anterior, y que las lesiones endoteliales provocadas por radicales libres pueden ser disminuidas mediante protección con diversas sustancias.

Dedicada a la demostración de esta hipótesis, se expondrán a continuación los objetivos, esquema de trabajo y metodología que se utilizarán en el presente estudio.

OBJETIVOS

De acuerdo con la hipótesis mencionada serán objetivos del presente trabajo:

- 1.- Demostrar sobre un modelo experimental previamente desarrollado, que existe una toxicidad endotelial específica de los radicales libres y que esta lesión es dosis-dependiente de la presencia de los mismos.
- 2.- Demostrar que determinadas sustancias viscoelásticas (SVS18, Healon[®] y Viscoat[®]) pueden tener un papel protector frente al estrés oxidativo, en un modelo “*in vitro*” desarrollado al efecto.
- 3.- Demostrar que se puede realizar una protección de las lesiones provocadas por radicales libres mediante el empleo de sustancias viscoelásticas (SVS18, Healon[®] y Viscoat[®]), en un modelo “*in vivo*”.

ESQUEMA DE TRABAJO.

Para conseguir los objetivos mencionados, la presente Tesis Doctoral se va a desarrollar en base al siguiente esquema metodológico:

- 1.- Puesta a punto y sistematización de un modelo experimental de toxicidad corneal que sea fisiopatológicamente provocado por radicales libres.

- 2.- Desarrollar técnicas bioquímicas, cuantitativas, clínicas, y otras, de ser necesario, que permitan valorar la toxicidad de los radicales libres a nivel del endotelio corneal.

- 3.- Con las técnicas que se consideren más oportunas y sobre los modelos experimentales ya mencionados, se realizarán los distintos grupos experimentales que sean necesarios para alcanzar los objetivos propuestos según la hipótesis planteada.



***MATERIAL Y
MÉTODOS***

I.- ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENADOS DE RETINA BOVINA

I.1.- APARATOS

- Bomba cromatográfica: HPLC PUMP 422 MASTER (Kontron Instruments).
- Detector de fluorescencia: SFM-25 (Kontron Instruments).
- Inyector: Rheodyne modelo 7125 con *loop* de 50 μ L (Kontron Instruments).
- Mezclador dinámico modelo M-491 (Kontron Instruments).
- Controlador Multiport modelo RS-232 (Kontron Instruments).
- Ordenador 486/50 Hz (Kontron Instruments).
- Software: Data System MT2 (Kontron Instruments).
- Columna cromatográfica de separación Spheryc-5, ODS 5 μ m, de 250 x 4,6 mm (Brownlee-Colums).
- Homogenizador manual Potter-Elvehjem

I.2.- PRODUCTOS ESTUDIADOS

Producto N° 1:

Nombre: SVS18

Compuesto activo: Hialuronato de sodio (HS) de origen de fermentación bacteriana

Formulación: 2.0% HS (2.0g/100 mL), isotónico, pH de 7.3, estéril, no contiene ningún conservante y presentado como jeringas que contienen 1.0 mL de hidrogel.

Producto N°2:

Nombre: Healon[®]

Compuesto activo: HS de extracto de cresta de gallo

Formulación: 1.0% HS (1.0g/100mL), isotónico, pH de 7.3, estéril, no contiene ningún conservante y presentado como jeringas que contienen 0.55mL de hidrogel.

Producto N°3:

Nombre : Viscoat®

Compuesto activo: HS del origen de fermentación bacteriana y condroitín sulfato (CS) de origen de cartílago de tiburón

Formulación: 3.0% HS + 4% CS, pH de 7.2, estéril, no contiene ningún conservante y presentado como jeringas que contienen 0.50mL de hidrogel.

I.3.- DISEÑO DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

I.3.1.- OBJETIVO

En el presente estudio se procedió a estudiar el posible efecto inhibitorio de la peroxidación lipídica en homogenados de retina bovina por parte de distintos viscoelásticos (VES). La eficacia antioxidante de cada VES se determinó mediante la determinación de malondialdehído (MDA) -un producto de la peroxidación lipídica- por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

I.3.2.- GRUPOS EXPERIMENTALES

- 1.-Grupo control (no se añade ningún producto).
- 2.-Grupo de protección con SVS18.
- 3.-Grupo de protección con Healon.
- 4.-Grupo de protección con Viscoat.

I.3.3.- DISEÑO DEL ESTUDIO

La capacidad de inhibir la peroxidación lipídica de los distintos VES se determinó mediante un procedimiento clásico. Se disponen cuatro tubos de incubación en el que se añade una cantidad determinada, y siempre la misma (2 mL), del homogenado fresco de retina preparado en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0: al primer tubo no se le añade nada (control), a los tres tubos restantes se les añade el compuesto viscoelástico a estudiar. La concentración de viscoelástico utilizado para todas las muestras fue 0.1 mL viscoelástico/2 mL homogenado. Esta concentración fue determinada tras varios procedimientos, por el método de ensayo-error.

La incubación se lleva a cabo a una temperatura de 37°C durante 60 minutos en continua y ligera agitación, para conseguir una peroxidación espontánea, no inducida. Cada 15 minutos (t0, t15, t30, t45, t60) se extrae de cada tubo una muestra alícuota (150µL) que se procesa como se indica posteriormente para determinar MDA (apartado I.3.5).

La capacidad de inhibir la peroxidación lipídica de cada uno de los compuestos antioxidantes nombrados se determina comprobando el grado de inhibición en la producción de MDA considerando la alícuota t0 control como índice de peroxidación 100 %.

I.3.4.- OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE RETINA BOVINA

Los ojos bovinos se obtuvieron dentro de las 4 horas posteriores a la muerte del animal. El tejido retiniano se extrajo por raspado con una espátula tras extirpar la córnea, el cristalino y el vítreo, y se congeló a -70°C. Tras esto, se homogeneizó en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.0 utilizando un homogenizador manual Potter-Elvehjem para evitar la contaminación mitocondrial de la fracción citosólica. Se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante.

I.3.5.- DETERMINACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO

Para la cuantificación del malondialdehído de las distintas muestras se ha utilizado una modificación del método de Richard (Richard *et al.*, 1992), en el cual se determina el

nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en base a la siguiente reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA (Figura I.1).

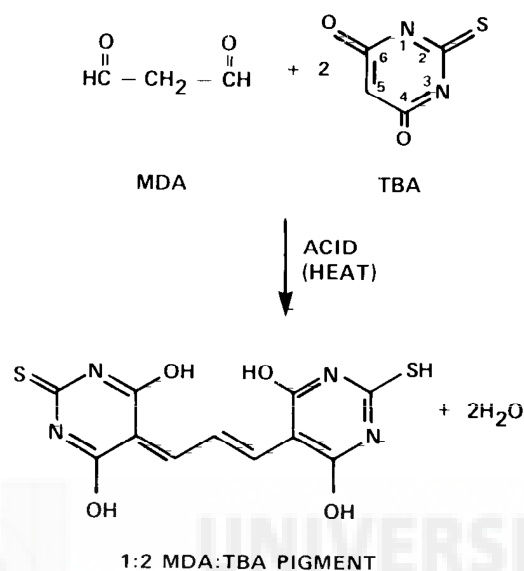


Figura I.1. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico (Janero, 1990).

Se empleó un equipo de CLAR (Kontron instruments), descrito en el apartado I.1. La columna cromatográfica de separación empleada ha sido una Spheryc-5, ODS 5 μm , de la casa Brownlee-Colums, de 250 x 4,6 mm. El flujo de la fase móvil fue de 1.0 mL/min. La longitud de onda de excitación ha sido de 532 nm y la de emisión 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado ha sido 600 y la respuesta de 2 seg. La inyección de cada muestra se ha hecho con una jeringuilla de 100 μL tipo Hamilton (Reno, Nevada).

La fase móvil se ha preparado con un tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 mL de tampón y 420 mL de metanol). Posteriormente se han filtrado a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 μm de poro y 47 mm de diámetro. Dicha mezcla ha sido correctamente gaseada con helio desde media hora antes de realizar el experimento y durante el mismo.

La solución madre de calibración se ha preparado diariamente y conservado en nevera a 4°C. Dicha solución madre ha consistido en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol.

La solución, que llamaremos de trabajo, consistió en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37 %) y ácido perclórico (6,4 %), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también ha sido preparada de forma diaria.

En tubos eppendorf de 2 mL pipeteamos 0,1 mL de la muestra y 0,75 mL de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen durante un periodo de 60 minutos en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo es necesario primero enfriar los tubos en baño de agua-hielo (4°C) durante 10 minutos, con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 12.000 r.p.m. Hasta su inyección en el equipo de CLAR los tubos deben mantenerse a 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro, cada muestra debe ser neutralizada en el plazo de 10 minutos previo a la inyección en el equipo de HPLC. Se añade aproximadamente 0,1 mL de hidróxido potásico 0,7 M, a 0,2 mL de la mezcla que acabamos de centrifugar, hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar, centrifugamos durante un minuto para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 µm, membranas de teflón, suministradas por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de CLAR. La cantidad de muestra inyectada fue de 100 µL para tener la seguridad de llenar el loop de 50 µL.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,2; 0,4; 0,5; 1; 1,5 y 2 µM). Un ejemplo de estas curvas se muestra en la [figura I.2](#). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

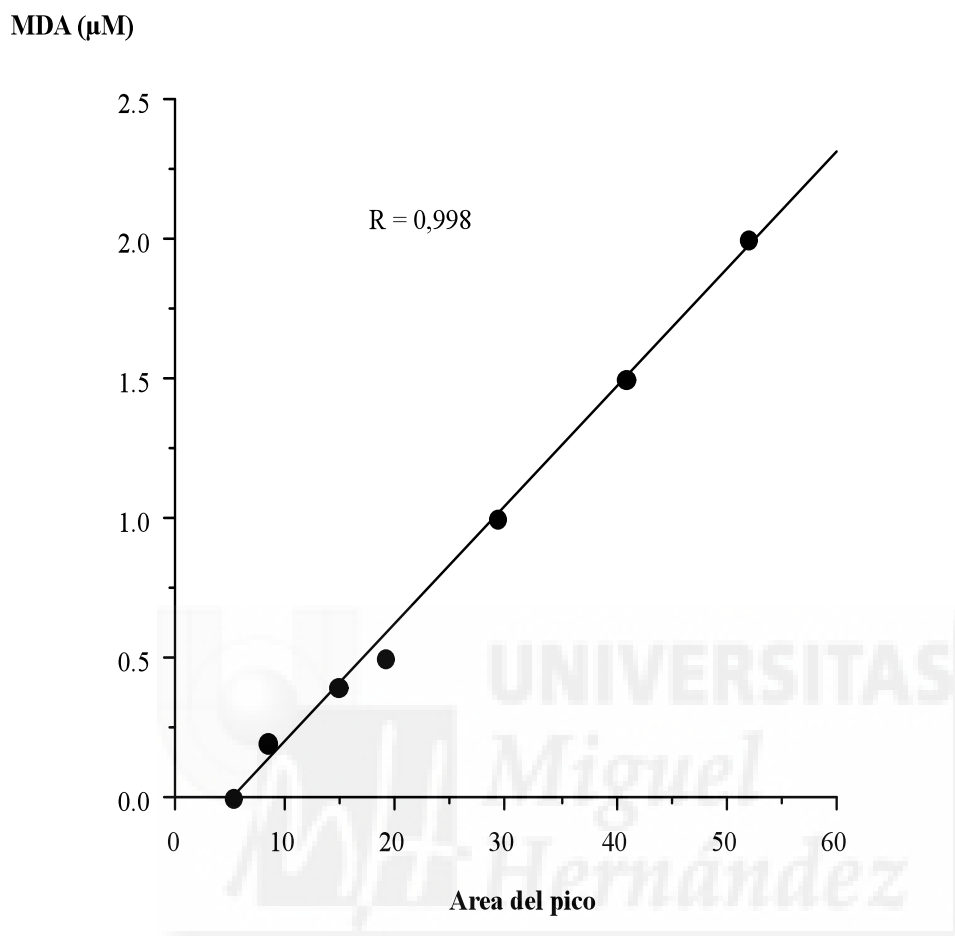


Figura I.2. Curva patrón de MDA obtenida por CLAR.

II.- ESTUDIO *IN VIVO* DE LAS PROPIEDADES PROTECTORAS DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES.

II.1.- APARATOS

-Microscopio quirúrgico TOPCON OMS₇₅ (Figura II.1).

-Espectrofotómetro BIO-RAD Smart-Spect™ 3000 (Figura II.2).

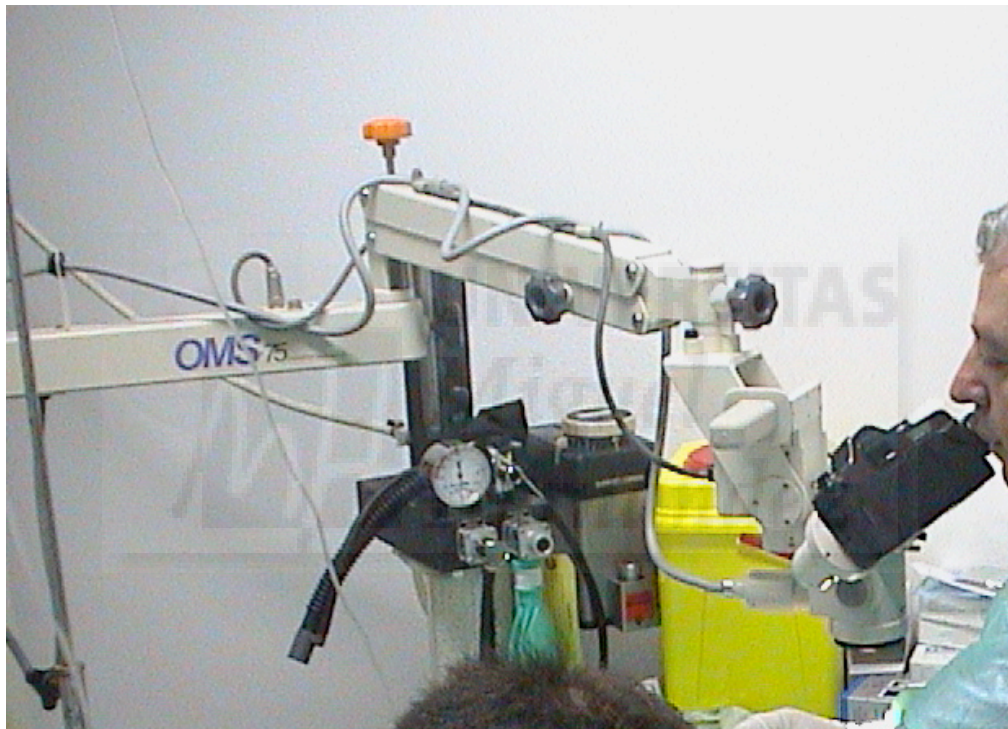


Figura II.1.-Microscopio quirúrgico TOPCON OMS₇₅.



Figura II.2.- Espectrofotómetro BIO-RAD Smart-Specttm 3000.

II.2.- PRODUCTOS ESTUDIADOS

Producto de prueba: Nombre: SVS18

Producto control N°1 Nombre: Healon[®]

Producto control N°2: Nombre: Viscoat[®]

Los principios activos y su formulación se describen detalladamente en los apartados II.2 y II.4.1 de esta misma sección de *Material y Métodos*.

II.3.-DISEÑO DE LOS PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.

II.3.1.- OBJETIVOS

La eficacia de los objetivos se medirá mediante el porcentaje de lesión del endotelio, y la valoración del cirujano en la facilidad de inyección del VES y la facilidad de eliminar el VES.

II.3.2.- GRUPOS EXPERIMENTALES

- 1.-Grupo control (Ringer Lactato).
- 2.-Grupo con H₂O₂ sin protección (1, 10 y 100 mM de H₂O₂).
- 3.-Grupo de protección con SVS18 (1,10 y 100 mM de H₂O₂).
- 4.-Grupo de protección con Healon (1,10 y 100 mM de H₂O₂).
- 5.-Grupo de protección con Viscoat (1,10 y 100 mM de H₂O₂).

II.3.3.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio experimental, randomizado, controlado, grupo-paralelo y enmascarado. Se usarán Healon[®] (HE) y Viscoat[®] (VC) como agentes de comparación. Se comprobarán los efectos de protección del VES y un grupo sin VES en el endotelio después del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a diferentes concentraciones (1mM, 10mM y 100mM) (Tablas II.1 y II.2). La solución de Ringer Lactato se usará como grupo control.

Éste será un ensayo en dos-fases. Los grupos de 1mM y 10mM del peróxido se probarán primero. Por otra parte se estudiará el grupo de 100mM. Cada animal recibirá el mismo tratamiento en ambos ojos (10 ojos por grupo).

Concentración H ₂ O ₂ (mM)	VES			
	No VES	SVS18	Healon [®]	Viscoat [®]
	<u>FASE 1:</u>			
Control (Ringer Lactato)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)
1mM H₂O₂	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)
10mM H₂O₂	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)
	<u>FASE 2:</u>			
100mM H₂O₂	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)	5 (10 ojos)

Tabla II.1: Estudio global: número de conejos por grupo.

PASO	Descripción del procedimiento	Control (No VES)	SVS18	HE	VC
1	Extraer 100 μ L de humor acuoso	X	X	X	X
2	Introducir VES hasta rellenar completamente la cámara anterior		X	X	X
3	Esperar durante 1 min	X	X	X	X
4	Lavar el VES hasta su completa desaparición		X	X	X
5	Añadir 100 μ L de H ₂ O ₂ a 1mM o 10mM o 100mM o Ringer lactato (control)	X	X	X	X
6	Recambio la cámara anterior con BSS		X	X	X
7	Mantener a los animales sedados durante 5 h	X	X	X	X
8	Enucleación, trepanación del botón corneal central	X	X	X	X
9	Medición de la magnitud de daño endotelial por el método de Janus Green	X	X	X	X

Tabla II.2: Procedimiento experimental.

Los animales se anestesiaron con clorhidrato de ketamina intra-muscular (50mg/kg) y 1% tetracaina tópica.

- Paso 1: se extraerá 100 μ L de HA del ojo de animal con una bomba de aspiración de precisión (Hamilton, Bonaduz, Suiza) y una jeringa con una aguja de 30G insertada a través del limbo corneoescleral (Figura II.3).

- Paso 2: En los grupos SVS18, HE y VC, se realiza una paracentesis limbar valvulada (Figura II.4) y se introduce VES en la CA hasta el relleno completo de la CA (Figura II.5). Valorar la facilidad de inyección.
- Paso 3: Se espera 1 min.
- Paso 4: Se introduce en la CA una cánula de irrigación-aspiración por la incisión valvulada y se lleva a cabo irrigación-aspiración con BSS (Alcon Co, Ft. Worth, TX, EE.UU.) hasta la desaparición completa del VES (Figura II.6). Valorar la facilidad de desaparición.
- Paso 5: Se sustituye 100µL de esta solución por 100µL de H₂O₂ a la concentración antedicha o solución Ringer Lactato a través de la primera paracentesis, usando la jeringa de Hamilton (Figuras II.7 y II.8).
- Paso 6: Se lava la CA con BSS (Figura II.9).
- Paso 7: Los animales son mantenidos bajo sedación durante 5h y entonces se provoca la muerte con una inyección letal de Pentobarbital (Laboratorio Eutalender, Normon SA, Madrid, España).
- Paso 8: Los ojos son enucleados y obtendremos mediante trépano un botón corneal central de 9mm para la determinación de magnitud de daño endotelial (Figura II.10).
- Paso 9: La magnitud de daño endotelial se mide usando la técnica de fotometría de absorción Verde Janus.

Este estudio se llevó a cabo según el modelo experimental descrito en la literatura (Artola *et al.*, 1993b), que ha sido considerado por consiguiente como apropiado. Se usarán los conejos albinos Neo-Zelandeses, pues se acepta que esta especie representa un modelo fiable similar a los humanos.

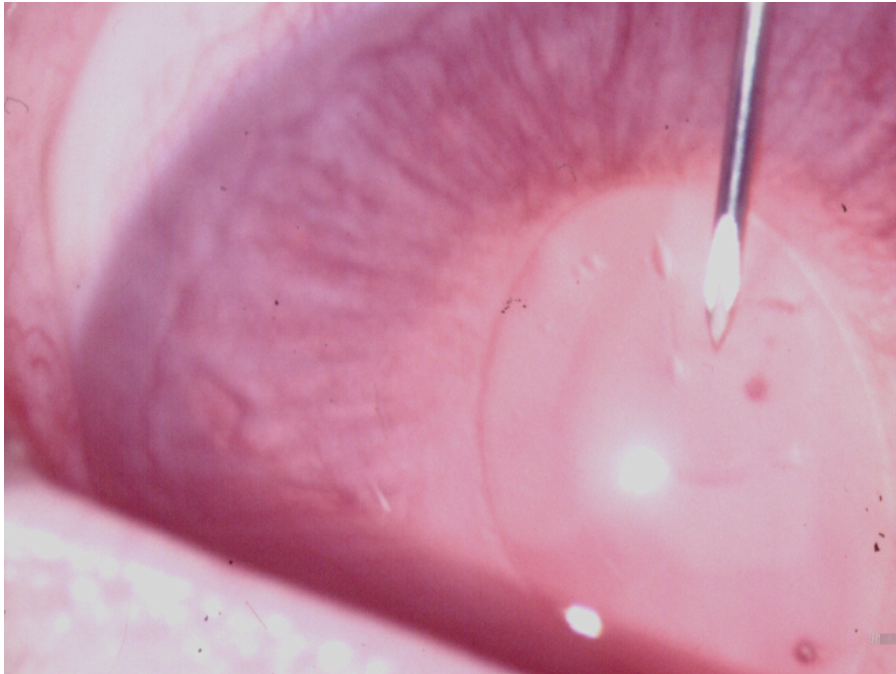


Figura II.3: Extracción de 100 μ L de humor acuoso (Paso 1).

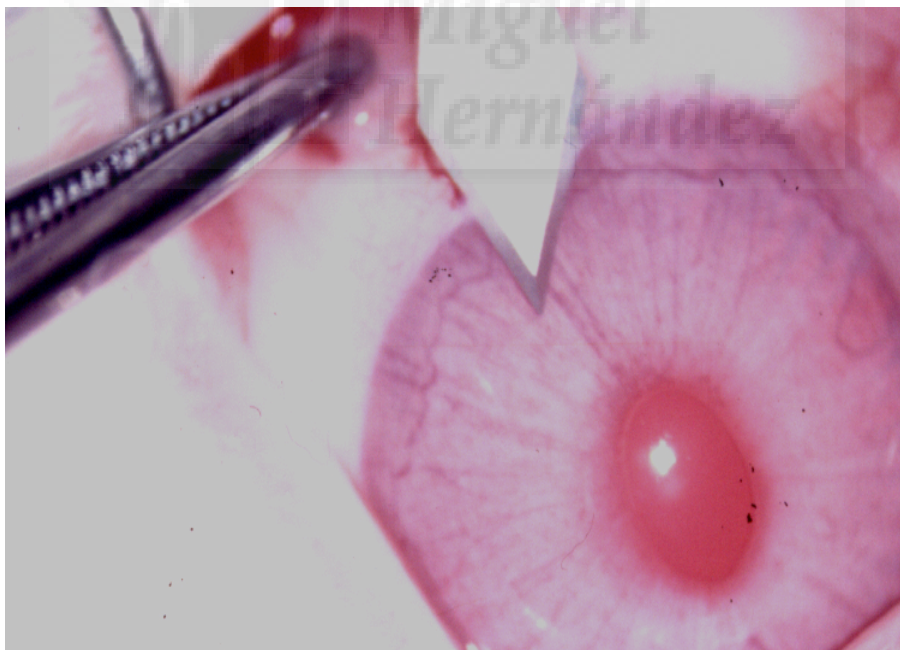


Figura II.4: Paracentesis con bisturí de córnea (Paso 2).

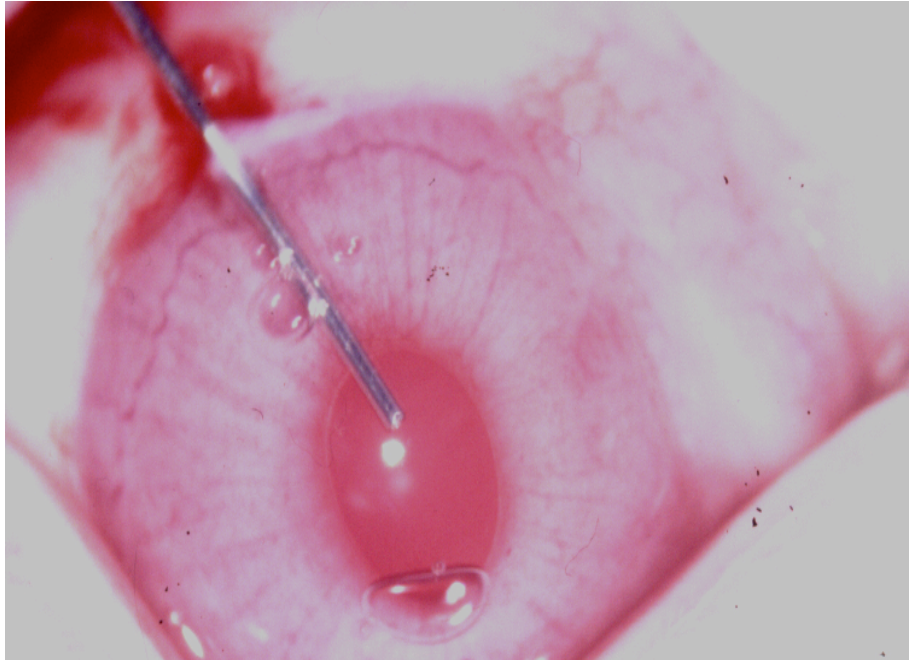


Figura II.5: Inyección de VES en cámara anterior (Paso 2).

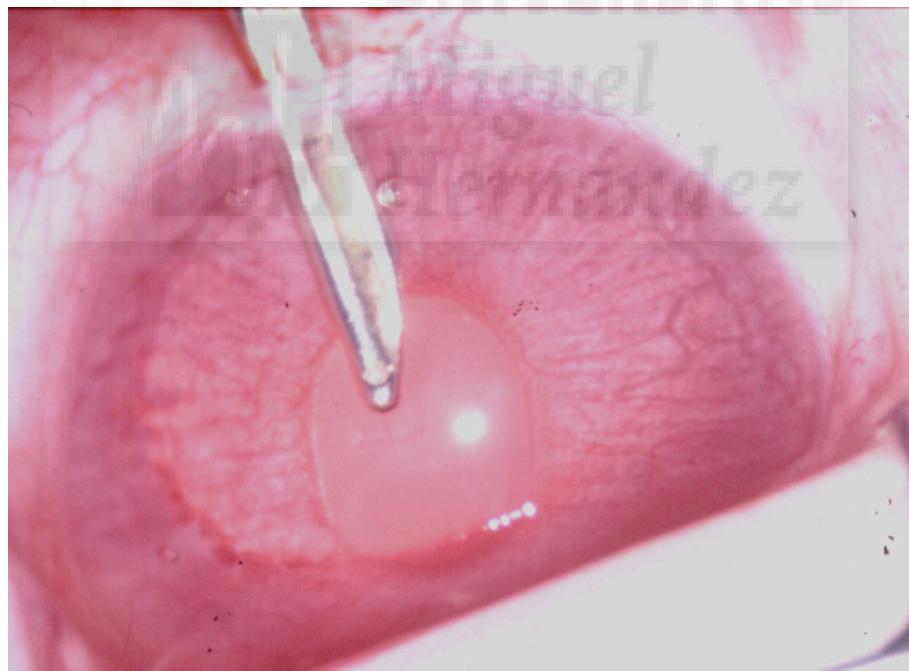


Figura II.6: Lavado del VES hasta su completa desaparición tras 1 minuto (paso 4).

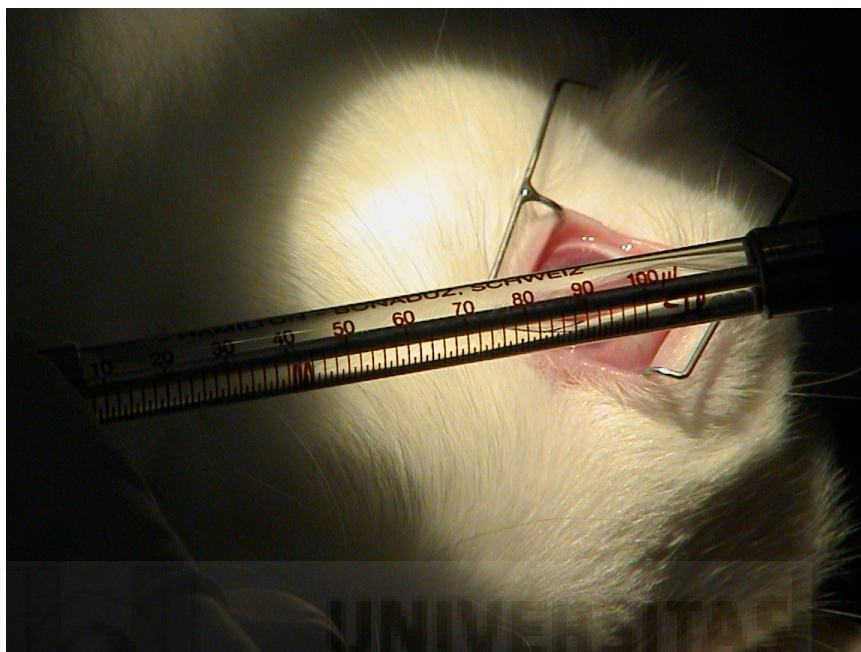


Figura II.7: Añadir 100 μ L de H₂O₂ a 1mM o 10mM o 100 mM o Ringer lactato (control) con jeringa de Hamilton (paso 5).

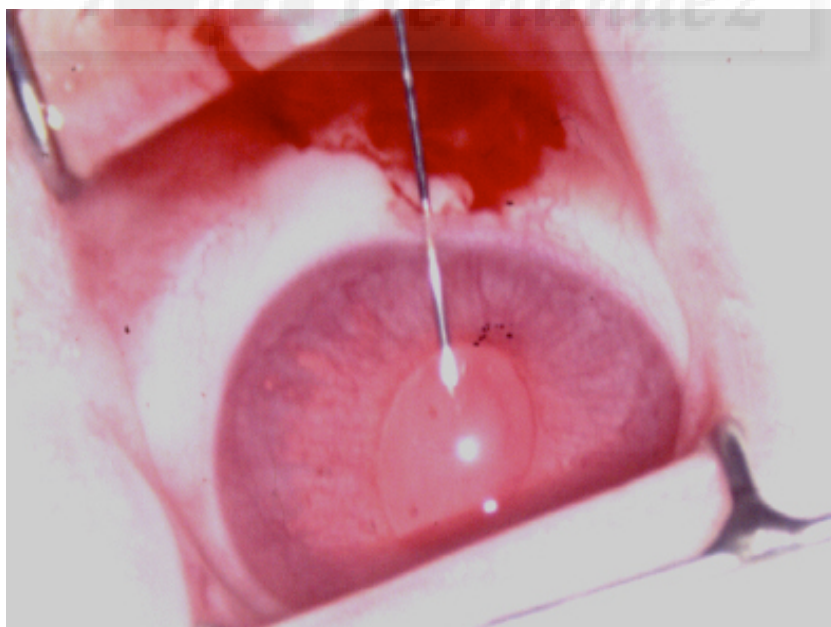


Figura II.8: Añadir 100 μ L de H₂O₂ a 1mM o 10mM o 100 mM o Ringer lactato (control) con jeringa de Hamilton (paso 5).

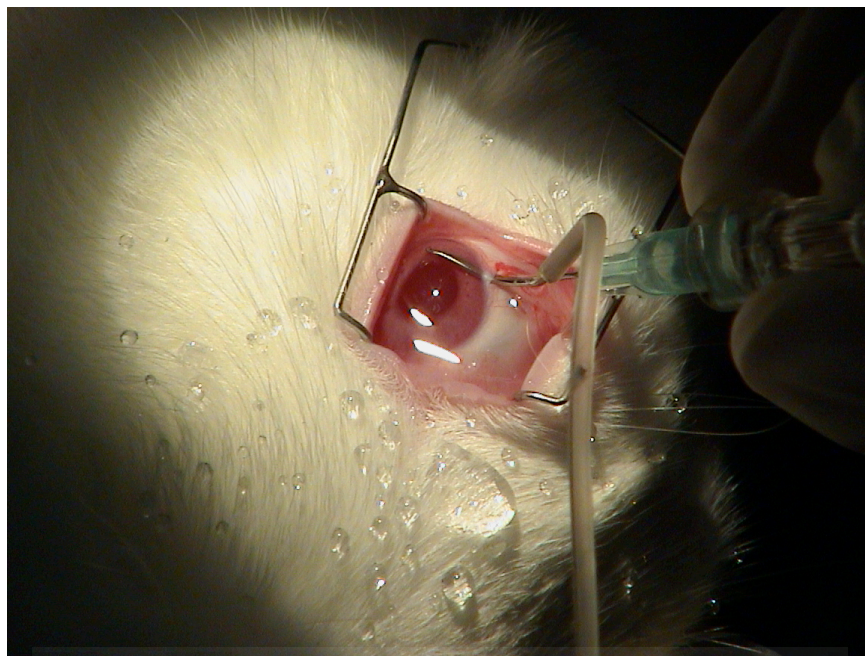


Figura II.9: Recambio de la cámara anterior con BSS (paso 6)

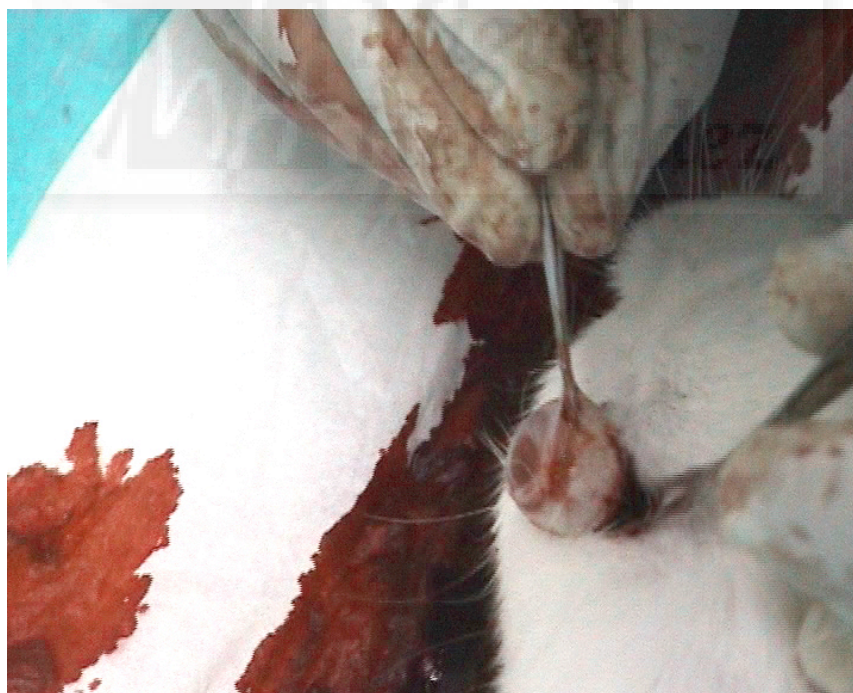


Figura II.10: Enucleación tras eutanasia del conejo, 5 horas tras el estudio (paso 8)

II.3.4.- MEDIDAS TOMADAS PARA MINIMIZAR SESGOS

II.3.4.1.- Randomización

Se asignó al azar cada grupo de 5 animales a los diferentes grupos de tratamiento (16 grupos de 5 animales). La randomización la hizo un estadístico independiente utilizando el programa de ordenador validado RANCODE[®] de IDV (Gauting, Alemania).

Se crearon dos listas separadas para la fase 1 (12 grupos de 5 conejos) y la fase 2 (4 grupos de 5 conejos), respectivamente. Primero, la lista de randomización para la fase 1 se envió al investigador. Después del análisis de los datos del grupo de 100mM, el segundo juego de sobres para la fase 2 se envió al investigador para más comprobaciones.

Para la randomización de conejos, una persona independiente escogió 5 conejos al azar (1 grupo) para el cirujano, que asignó el grupo del tratamiento de acuerdo con la lista de randomización proporcionada por el estadístico.

II.3.4.2.- Estudio ciego

El cirujano conocía el tratamiento debido a que los productos tienen presentaciones y características físicas diferentes (viscosidad, etc). El tratamiento se enmascaró a una persona diferente (asesor) y se llevó a cabo las valoraciones y mediciones.

II.3.4.3.- Mismo cirujano / misma técnica quirúrgica

El mismo cirujano llevó a cabo todos estos procedimientos en todos los animales, utilizando en todos los casos la misma técnica quirúrgica.

II.3.4.4.- El mismo asesor

El mismo asesor realizó la misma valoración analítica y experimental en todos los conejos.

II.4.-TÉCNICAS UTILIZADAS.

II.4.1.- DESCRIPCIÓN DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

II.4.1.1.- Descripción del producto de investigación SVS18

i) Composición

SVS18 contiene 2% HS (w/v), manitol, fosfato de hidrógeno de sodio, fosfato de dihidrógeno de sodio, cloruro de sodio y agua para la inyección. SVS18 es una solución isotónica ajustada a pH 7.3 y no contiene conservante.

ii) Esterilización

La mayor parte de la solución SVS18 se procesa bajo condiciones asépticas y se rellena en jeringas esterilizadas al vacío. Después de que se completa el proceso del relleno, las jeringas son selladas con calor en una bolsa específica y se introducen en el autoclave. Por lo tanto, el contenido de la jeringa como la superficie exterior de la jeringa está estéril.

iii) Empaquetado

SVS18 se suministra en jeringas de cristal de borosilicato Becton-Dickinson tipo I sin color de 1.25 mL, que utilizan un sistema de cierre de Luer y un tapón de goma. Cada jeringa contiene 1.0mL de solución viscosa estéril, no-pirogénica, clara, sin color para un solo uso. La etiqueta contiene el nombre del producto, el número del lote y la fecha de caducidad. Cada jeringa se empaqueta en una bolsa sellada de polipropileno. Un paquete contiene 1 jeringa de SVS18.

iv) Instrucciones para el uso

SVS18 se conserva entre 2-8°C y se mantiene el producto a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos antes de usarlo. Se saca la jeringa del sobre estéril, se retira el cierre Luer de la jeringuilla, se fija la cánula y se asegura girándola ligeramente. Como el producto no contiene conservante, cualquier solución restante debe desecharse.

II.4.1.2.- Descripción del producto de investigación Healon[®]

i) Composición

Healon[®] contiene HS al 1% (w/v), fosfato de hidrógeno de sodio, fosfato de di-hidrógeno de sodio, cloruro de sodio y agua para la inyección. Es una solución isotónica ajustada a pH 7.3 y no contiene conservante.

ii) Empaquetado

El Healon[®] se comercializa en jeringas de cristal de borosilicate Becton-Dickinson tipo I sin color de 1.25 mL que utilizan un sistema de cierre de Luer y un tapón de goma. Cada jeringa contiene 1.0 mL de solución viscosa estéril, no-pirogénica, clara, sin color para un solo uso. Está etiquetada con el nombre del producto, el número del lote y la fecha de caducidad. Cada jeringa está envasada en una bolsa sellada de polipropileno. Un paquete de Healon[®] contiene 1 jeringa.

iii) Instrucciones para el uso

El Healon[®] se conserva entre 2-8°C y se mantiene el producto a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos antes de usarlo. Se saca la jeringa del sobre estéril, se retira el cierre Luer de la jeringuilla, se inserta la cánula y se asegura girándola ligeramente. Como el producto no contiene conservante, cualquier solución restante debe desecharse.

II.4.1.3.- Descripción del producto de investigación Viscoat[®]

i) Composición

Viscoat[®] contiene HS al 3% (w/v), CD 4% (w/v) fosfato de hidrógeno de sodio, fosfato de di-hidrógeno de sodio, cloruro de sodio y agua para inyección. Es una solución isotónica ajustada a pH 7.3 y no contiene conservante.

ii) Empaquetado

El Viscoat[®] se comercializa en jeringas de cristal de borosilicato Becton-Dickinson tipo I sin color que utilizan un sistema de cierre de Luer y un tapón de goma. Cada jeringa contiene 0.50mL de la solución viscosa estéril, no-pirogénica, clara, sin color para un solo uso. Está etiquetada con el nombre del producto, el número del lote y la fecha de

caducidad. Cada jeringa está envasada en una bolsa sellada de polipropileno. Un paquete de Viscoat[®] contiene 1 jeringa.

iii) Instrucciones para el uso

Viscoat[®] se conserva entre 2-8°C y se mantiene el producto a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos antes de usarlo. Se saca la jeringa del sobre estéril, se retira el cierre Luer de la jeringuilla, se fija la cánula y se asegurará girándola ligeramente. Como el producto no contiene conservante, la solución restante debe desecharse.

II.4.2.- INSTRUMENTOS PARA MANEJAR LOS MATERIALES.

Se usaron guantes de látex en todos los procedimientos para evitar la contaminación, sobre todo durante los procedimientos quirúrgicos. Se usaron micropipetas de Gilson[™] para transferir todo los líquidos. Todo el plástico usado para la preparación y traslado de soluciones fue desechable. Todos los instrumentos se esterilizaron por autoclave antes de su uso y la esterilidad se mantuvo durante los procedimientos por inmersión breve en metanol al 70% seguido de lavado en suero salino tamponado estéril.

II.4.3.- ANIMALES, AGRICULTURA, DIETA, ANESTESIA Y EUTANASIA

II.4.3.1.- Animales

El número requerido de animales se seleccionó de aquellos proporcionados por el examen veterinario de salud general y defectos oculares. Los animales seleccionados estaban sanos y libres de defectos oculares.

Los animales se obtuvieron de la Granja San Bernardo, Navarra, España, de 7 a 9 semanas de edad, aproximadamente 2 kg de peso, y hembras nulíparas y no-embarazadas.

La llegada de los animales se identificó por un tatuaje en la oreja con un número individual. Hubo un periodo de aclimatación de al menos 10 días. Al final del periodo de aclimatación, se pesaron los animales de nuevo y los que tuvieron sobrepeso no fueron incluidos en el estudio.

II.4.3.2.- Ambiente

Se alojaron los animales individualmente en jaulas de rejas de metal suspendidas encima de bandejas. Cada bandeja de la jaula tenía material absorbente que se inspeccionó a diario y se cambió cuando fue necesario.

La temperatura y la humedad del cuarto animal se mantuvieron entre 15 a 21°C y 45 a 65%, respectivamente. La lámpara fluorescente proporcionó un ciclo de 24h de 12h oscuridad /12h iluminación.

II.4.3.3.- Dieta y Agua

Siguieron una dieta libre de antibióticos de Harlan Iberica, S.A. La dieta y el agua del grifo a través de botellas fueron proporcionadas *ad libitum*.

II.4.3.4.- Anestesia del conejo HSallaby

A continuación describimos el procedimiento de anestesia del conejo de experimentación:

- i) Pesar al animal. Situarle en un cepo de sujección.
- ii) En una jeringa de insulina preparar una mezcla de Ketamina (Imalgene 1000, Merial) y Xilacina (Rompun 2%, Bayer). Las dosis a calcular son las siguientes:
Ketamina: 10 mgr/Kg de peso, en la práctica 0,1 mL/Kg de peso.
Xilacina: 3 mgr/Kg de peso, en la práctica 0,3 mL/Kg de peso.
- iii) Agitar.
- iv) Comprimir la vena auricular externa de tal manera que regurgite. Desinfectar la zona de inoculación.
- v) Inocular, lentamente, por vía intravenosa en la vena auricular externa, la cantidad adecuada de anestésico. Retirar el animal del cepo y trasladarlo a la mesa de cirugía.
- vi) El animal se considera suficientemente anestesiado ante la falta de reflejo corneal y a la presión del espacio interdigital. Durante la cirugía prestar atención a la temperatura corporal y número de respiraciones/minuto, así como la

profundidad de las mismas. El sistema empleado garantiza entre 30-40 minutos de anestesia quirúrgica y entre 60-90 minutos de hipnosis posterior.

- vii) Cuando la cirugía ha terminado, puede revertirse parte del efecto anestésico con Atipamezol (Antisedan) a dosis de 1mg/Kg vía subcutánea. No hacerlo antes de 20 minutos de inoculado el anestésico.

II.4.3.5.- Eutanasia del conejo HSallaby

A continuación describimos el procedimiento de eutanasia del conejo de experimentación:

- i) Pesar al animal. Situarle en un cepo de sujección.
- ii) En una jeringa de insulina preparar T-61 (Hoeschst Roussel Vet) en cantidad de 0,2 mL/Kg de peso.
- iii) Comprimir la vena auricular externa de tal manera que regurgite. Desinfectar la zona de inoculación.
- iv) Inocular, lentamente, por vía intravenosa en la vena auricular externa, la cantidad adecuada de eutanásico. Retirar el animal del cepo y trasladarlo a la mesa de cirugía.
- v) Comprobar la eficacia de la eutanasia por la ausencia de:
 - Reflejo corneal.
 - Dolor a la presión interdigital.
 - Ausencia de respiración.
 - Ausencia de latido cardiaco.
- vi) Esperar al menos 5 minutos de ausencia de todos estos parámetros antes de certificar la muerte del animal.

II.4. 4.- EVALUACIÓN INTRA-QUIRÚRGICA

Durante la cirugía, el cirujano evaluó cada VES usando una escala arbitraria y respondió a una encuesta dónde se informó de los puntos siguientes:

- Facilidad de inyección (1 = pobre, 2 = buena, 3 = excelente)
- Facilidad de recambio (1 = pobre, 2 = buena, 3 = excelente)

También se registraron las posibles complicaciones intra-quirúrgicas.

II.4.5.- PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.

El modelo experimental utilizado en el presente trabajo ha consistido en provocar lesiones en cámara anterior del conejo, producidas específicamente por radicales libres mediante la presencia en la misma de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a diversas concentraciones.

Para ello realizamos los siguientes pasos:

- i) Una vez anestesiado el animal de experimentación y bajo control microscópico (Microscopio quirúrgico TOPCON OMS₇₅), se extraen 100 μ L de humor acuoso mediante paracentesis de cámara anterior con aguja 30G.
- ii) A continuación, inyectamos por la misma paracentesis 100 μ L de H_2O_2 , de la concentración elegida, en cámara anterior, realizando 5 emboladas y manteniendo la última durante 30 segundos, para evitar la salida del H_2O_2 de la cámara anterior.
- iii) El peróxido de hidrógeno se preparó en el momento con H_2O_2 (w/v) al 33%, 110 vol (Panreac, Montplet & Esteban SA, Barcelona, España) mediante dilución apropiada en agua destilada e inmediatamente se introdujo en la cámara anterior. La concentración precisa se confirmó por el método del iodométrico.

Las diversas concentraciones de H₂O₂ se han preparado de la siguiente forma:

i) Partimos de peróxido de hidrógeno de pureza del 33% y densidad 1.1 (Panreac).

ii) Preparación de 100 mL de H₂O₂ 0.1 Molar:

1)

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de moles}}{\text{Litros}} = \frac{\text{g/PM}}{\text{Litros}}$$

$$0.1\text{M} = \frac{\text{g/34 (PM del H}_2\text{O}_2\text{)}}{0.1 \text{ L. (100mL3)}}$$

$$g = 0.1 \text{ (M)} \times 0.1 \text{ (L)} \times 34 \text{ (PM)}$$

$$g = 0.34: \text{ Peso del H}_2\text{O}_2 \text{ PURO (100\%)}$$

2) Ahora calculamos el volumen que debemos coger del producto puro (líquido) correspondiente al peso calculado (0.34 g):

$$\text{Densidad} = \frac{\text{Masa (g)}}{\text{Volumen (mL)}}$$

0.34 (g)

1.1 (d) = -----

Volumen (mL)

0.34

Volumen = ----- = 0.309 mL = 309 μ L de

1.1

producto puro (100%)

3) Por fin, calculamos el volumen del producto que usamos nosotros (33%):

100 Vol. ----- 33

x ----- 0.309

0.309 x 100

x = ----- = 0.936 mL = 936 μ L del

33

H₂O₂ (33%)

4) Para obtener los 100 mL: Poner en un matraz 936 μ L de H₂O₂ (33%) y enrasar con agua destilada hasta 100 mL.

5) Para preparar diversas concentraciones:

- 1.- 0.0010 M 9.0 μ L.
- 2.- 0.0050 M 46.0 μ L.
- 3.- 0.0100 M 90.0 μ L.
- 4.- 0.0250 M 225.0 μ L.
- 5.- 0.0500 M 450.0 μ L.
- 6.- 0.0750 M 675.0 μ L.
- 7.- 0.1000 M 936.0 μ L.
- 8.- 0.0001 M 0.9 μ L.

II.4.6.- TÉCNICA DE FOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN DE JANUS GREEN

Para la determinación de la lesión endotelial que produce el H₂O₂ introducido en la cámara anterior del conejo, hemos medido por simple fotometría la cantidad de Verde Janus extraído con alcohol absoluto de córneas aisladas después de la tinción vital (Hartmann y Rieck, 1989).

Este método permite una medición cuantitativa tanto de las áreas endoteliales denudadas como de aquellas áreas en que las células del endotelio son afectadas por un proceso irreversible de degeneración oxidativa. El Janus tiñe selectivamente manchas en esas áreas y también las células del endotelio corneal no viables.

Lo primero que hay que realizar es la medición en el espectrofotómetro de la absorbancia máxima del Verde Janus, que corresponde a 650 nm y todas las demás medidas se tomaron a esta longitud de onda. Posteriormente obtuvimos una gráfica estándar con porcentajes de lesión endotelial conocida.

II.4.6.1.- Pasos de la técnica de fotometría de absorción Verde Janús

La realización de la técnica requiere los siguientes pasos:

- i) Escisión de la córnea por el limbo esclero-corneal (Figura II.11).
- ii) Lavado corneal con BSS (solución salina balanceada) durante 2 minutos.
- iii) Colocación de la córnea en una pequeña cubeta con una excavación que corresponde a la curvatura corneal, con la cara endotelial hacia arriba (Figura II.12).
- iv) Tinción del endotelio durante 90 segundos con 200 μ L de una solución Verde Janus (Sigma) al 1% preparada con BSS (La tinción de Janus Green se fija a las áreas desnudas o degeneradas del endotelio corneal) (Figura II.13).
- v) Lavado de la córnea con BSS durante 2 minutos (Figura II.14).
- vi) Obtención de un botón corneal de 9 mm mediante trepanación (Figura II.15).
- vii) Elución (extracción) del colorante: se realiza colocando el botón corneal de 9 mm en un tubo desechable tipo Ependorff, con 1 mL de alcohol absoluto durante 90 segundos, tras los cuales se retira el botón corneal (Figura II.16).
- viii) Dilución al 10% de la muestra de colorante obtenida.
- ix) Medición fotométrica de la elución obtenida al 10% con un Espectrofotómetro BIO-RAD Smart-Specttm 3000, colocando alcohol etílico absoluto como valor blanco o control (Figura II.17).

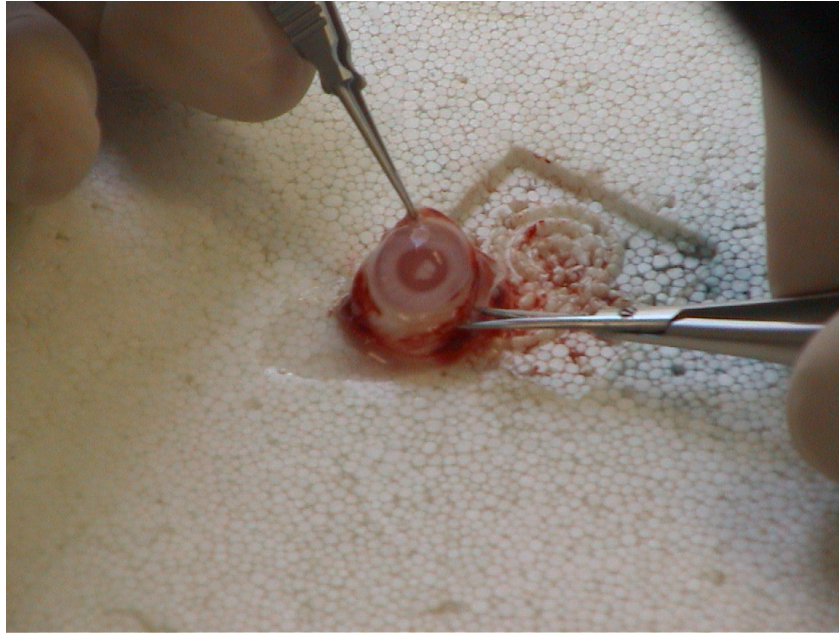


Figura II.11: Preparación de un botón esclero-corneal sin dañar el endotelio.

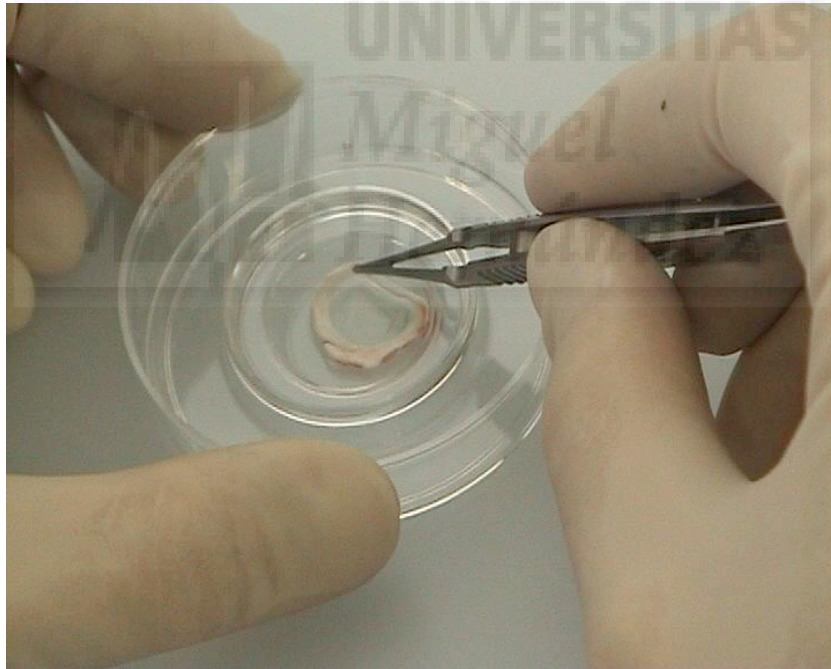


Figura II.12: Colocación de la córnea en una cubeta, con la cara endotelial hacia arriba

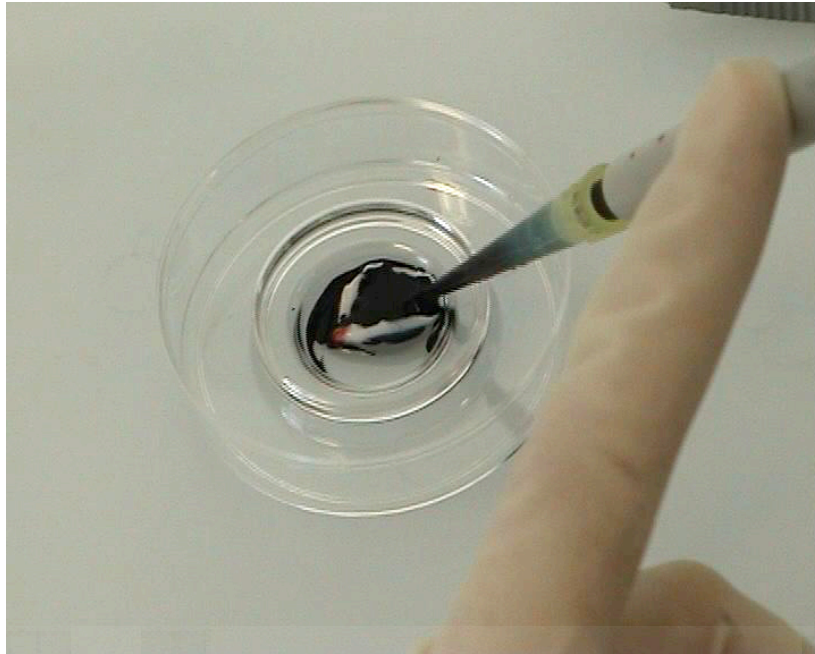


Figura II.13: Tinción endotelial con Verde-Janus, durante 90 seg.



Figura II.14: Lavado de la córnea con BSS durante 2 minutos.

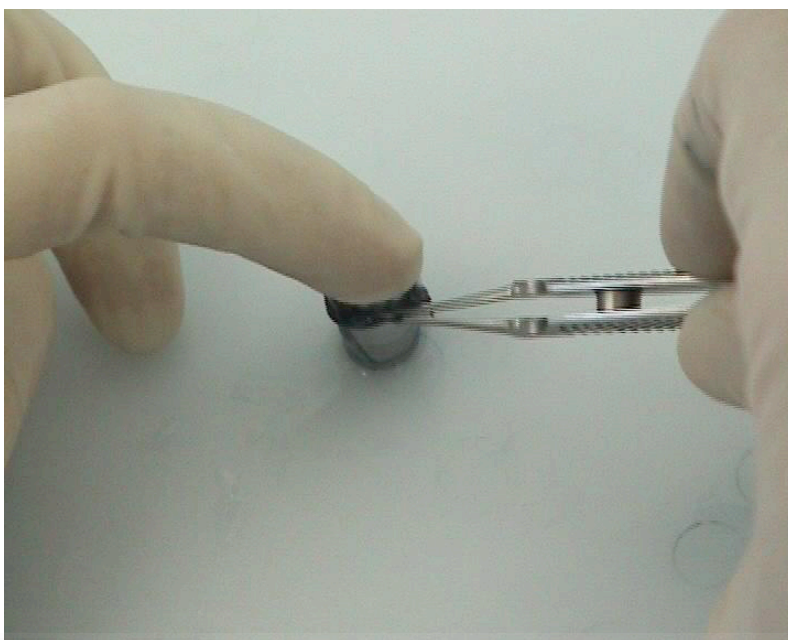


Figura II.15: Obtención de un botón corneal con el trépano de 9 mm.

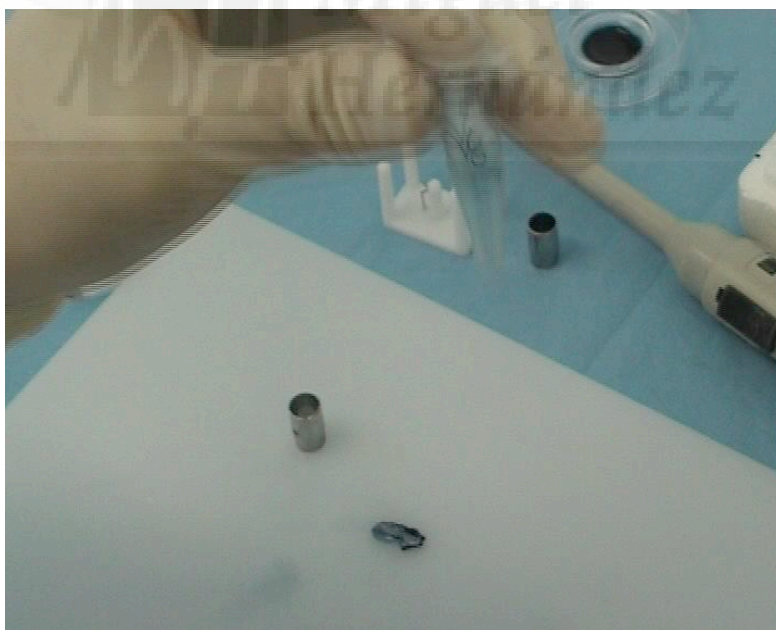


Figura II.16: Elución del colorante con alcohol absoluto durante 90 seg.

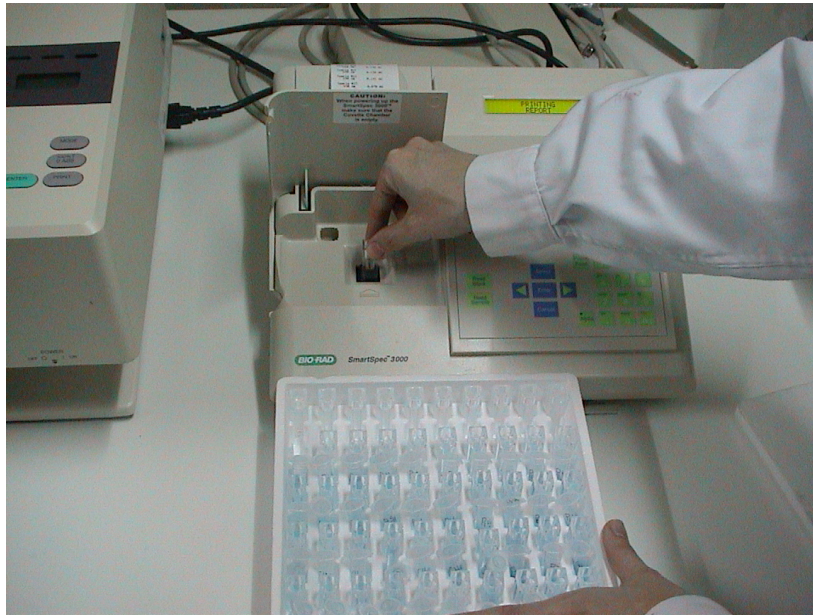


Figura II.17: Dilución al 10% de la muestra obtenida y medición fotométrica con el espectrofotómetro.

II.4.6.2.- Elaboración de la curva patrón

Para los valores correspondientes al 0% utilizamos botones corneales de 9 mm de corneas frescas con endotelio íntegro. Para los valores correspondientes al 100% de lesión, utilizamos botones corneales que tienen 9 mm de diámetro, tratados con alcohol absoluto para alterar todo el endotelio. Utilizamos entonces trépanos de distinto tamaño: 9 mm, 8 mm y 6.5 mm para obtener botones corneales de distinto tamaño que también tratamos con alcohol absoluto, y de esta forma establecer una curva patrón de daño lesional que nos permitió interpretar los resultados.

La superficie de cada botón corneal se obtuvo mediante la fórmula:

$$S = \pi R^2$$

Siendo para cada trépano:

- Trépano de 9 mm; $S=63,62 \text{ mm}^2 = 100\%$ de lesión endotelial.
- Trépano de 8 mm; $S=50,26 \text{ mm}^2 = 79\%$ de lesión endotelial.
- Trépano de 6,5 mm; $S=33,18 \text{ mm}^2 = 52,16\%$ de lesión endotelial.

En cada grupo de porcentaje de lesión se han utilizado 10 muestras. Se han necesitado un total de 20 conejos.

El valor de la fotometría en el estudio de las córneas se obtuvo extrapolando los valores normales utilizando una aplicación de cálculo matemático del programa SPSS para Windows versión 11.0, lo que nos permitió expresar el valor de daño endotelial como un porcentaje.



III.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Debido a que éste es un estudio experimental, no se eligió ningún grado de significación ni poder.

En el estudio *in vitro* el resultado clave es el valor de inhibición de MDA que se obtiene en cada una de las muestras analizadas, y la media \pm desviación estándar de cada VES y del grupo control. Para la medida de relevancia se usó el estadístico de Mann-Whitney para comparar el grupo control frente al grupo de viscoelásticos. Para determinar si existían diferencias significativas entre los distintos grupos de viscoelásticos entre sí se empleo la prueba de Kruskal-Wallis (equivalente no paramétrico del test de ANOVA de un factor). Se escogió un IC del 95% a ambos lados en este estudio experimental y un nivel de α de 0,05.

En el estudio *in vivo* los resultados clave son el porcentaje de lesión endotelial, el juicio del cirujano en la facilidad de inyección y la facilidad de extracción del VES. Primero se analizaron los datos del porcentaje de lesión del endotelio para su distribución normal en cada grupo. La medida de relevancia, en este caso la diferencia estadística y el intervalo de confianza relacionado (IC), fueron utilizados para comparar los grupos por métodos gráficos. La evaluación del cirujano de la facilidad de inyección y facilidad de extracción de VES fueron analizados por métodos no-paramétricos. Para la medida de relevancia se usó el estadístico de Mann-Whitney y el intervalo de confianza relacionado para comparar los grupos. Se escogió un IC del 95% a ambos lados en este estudio experimental y un nivel de α de 0,05.



RESULTADOS

I.- ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENADOS DE RETINA BOVINA

Los homogenados de retina bovina, preparados con arreglo al procedimiento descrito en el apartado I.3.4 de *Material y Métodos* fueron incubados al aire para conseguir su peroxidación espontánea. Las alícuotas fueron separadas cada 15 minutos (t0, t15, t30, t45, t60) durante 60 minutos de incubación a 37°C, y procesados para la determinación de MDA según se detalla en el apartado I.3.5 de *Material y Métodos*.

En la [tabla I.1](#) presentamos la media \pm desviación estándar de los valores correspondientes al grado de inhibición de la producción de MDA (expresados en % con respecto a t0, que se considera 100%). La [figura I.1](#) representa gráficamente estos valores para los distintos tiempos (t0, t15, t30, t45, t60). En la [tabla I.2](#) presentamos la comparación estadística entre el grupo de los viscoelásticos frente al grupo control, para los distintos tiempos (U de Mann-Whitney). En la [tabla I.3](#) realizamos la comparación de todos los grupos entre sí (incluido grupo control), apreciándose diferencias significativas entre grupos (Test de Kruskal-Wallis). Al comparar sólo los grupos de viscoelásticos entre sí (excluyendo grupo control), desaparecen estas diferencias (Test de Kruskal-Wallis).

MDA (%) \pm DE	t0	t15	t30	t45	t60
Control (n=3)	100 \pm 0	318.02 \pm 164.1	349.03 \pm 164.11	388.45 \pm 160.81	637.13 \pm 334.44
SVS18 (n=3)	100 \pm 0	118.94 \pm 22.61	181.07 \pm 45.99	178.07 \pm 94.59	197.97 \pm 87.01
Viscoat (n=3)	100 \pm 0	117.21 \pm 21.72	154.55 \pm 64.14	165.335 \pm 59.5	273.04 \pm 27.65
Healon (n=3)	100 \pm 0	130.46 \pm 38.39	117.67 \pm 35.43	145.21 \pm 9.44	180.69 \pm 74.92

Tabla I.1: Media \pm desviación estándar (DE) del grado de inhibición de producción de MDA (%)

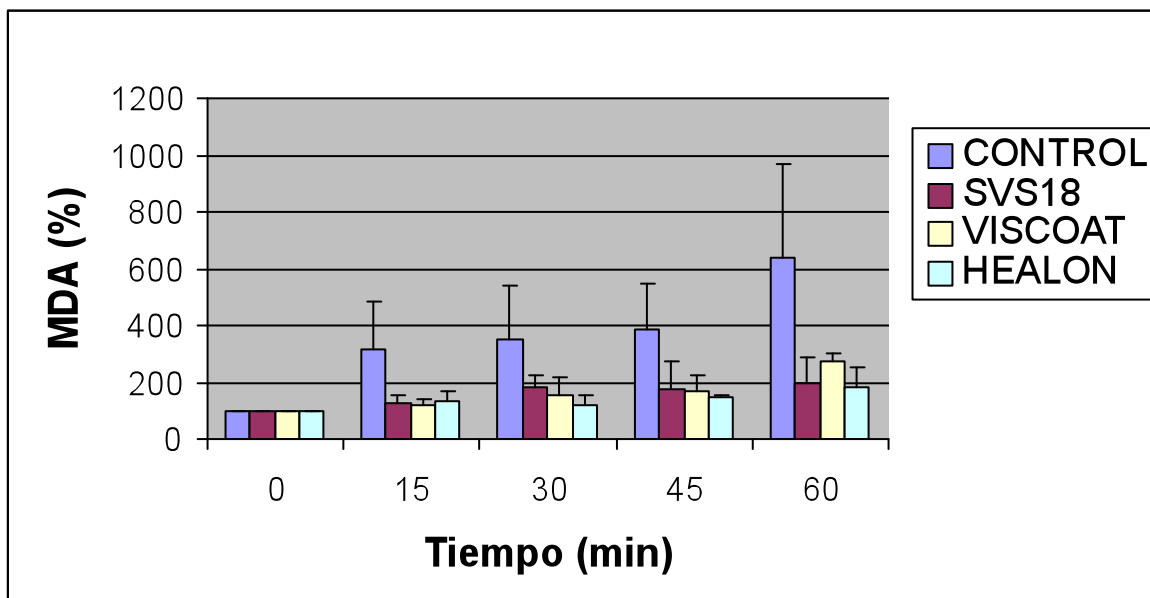


Figura I.1: Representación gráfica de las medias \pm DE de cada grupo, para cada tiempo.

	p	comentario
t15	0.013	El grupo de los viscoelásticos presenta una acción inhibitoria de la producción de MDA frente al grupo control, para todos los tiempos estudiados
t30	0.013	
t45	0.013	
t60	0.003	

Tabla I.2: Diferencias entre los distintos grupos y valor del estadístico p (Mann-Whitney)

	t15	t30	t45	t60	comentario
Todos los grupos entre sí	0.086	0.057	0.086	0.043	Existe uno ó más grupos diferentes entre sí para todos los tiempos
Entre VES	0.733	0.329	0.733	0.193	No existen diferencias entre los distintos viscoelásticos

Tabla I.3: Diferencias intergrupos y valor del estadístico p (Test de Kruskal-Wallis)

II.- ESTUDIO *IN VIVO* DE LAS PROPIEDADES PROTECTORAS DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES.

II.1. ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN.

En la figura II.1 se representa el rastreo de absorbancia realizado para el Verde Janus, el cual posee un pico correspondiente a una longitud de onda de 650nm, de espectro visible.

En la figura II.2 se representa la curva patrón para la absorbancia de porcentajes de lesión conocida (100%, 79%, y 52,6%).

En la tabla II.1 se muestran los valores de absorbancia obtenidos en los botones corneales con porcentajes de lesión endotelial conocidos.

En la tabla II.2 se muestra la media y la desviación estándar (DE) y el grado de significación estadística de dicho grupo.

De la curva patrón (figura II.2) se obtuvo una fórmula matemática que relacionó el valor de la absorbancia del espectrofotómetro con el porcentaje de lesión endotelial:

$$\mathbf{DE = A + (Abs \times B)}$$

DE: Daño endotelial

A: -10,480

Abs: Absorbancia

B: 256,986

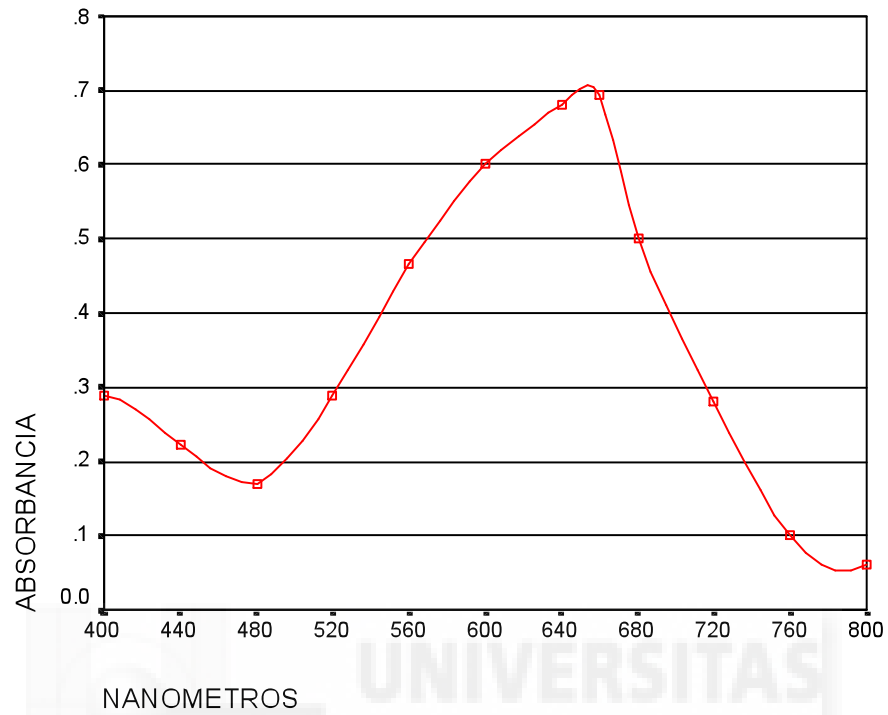


Figura II.1: Absorbancia Verde Janus

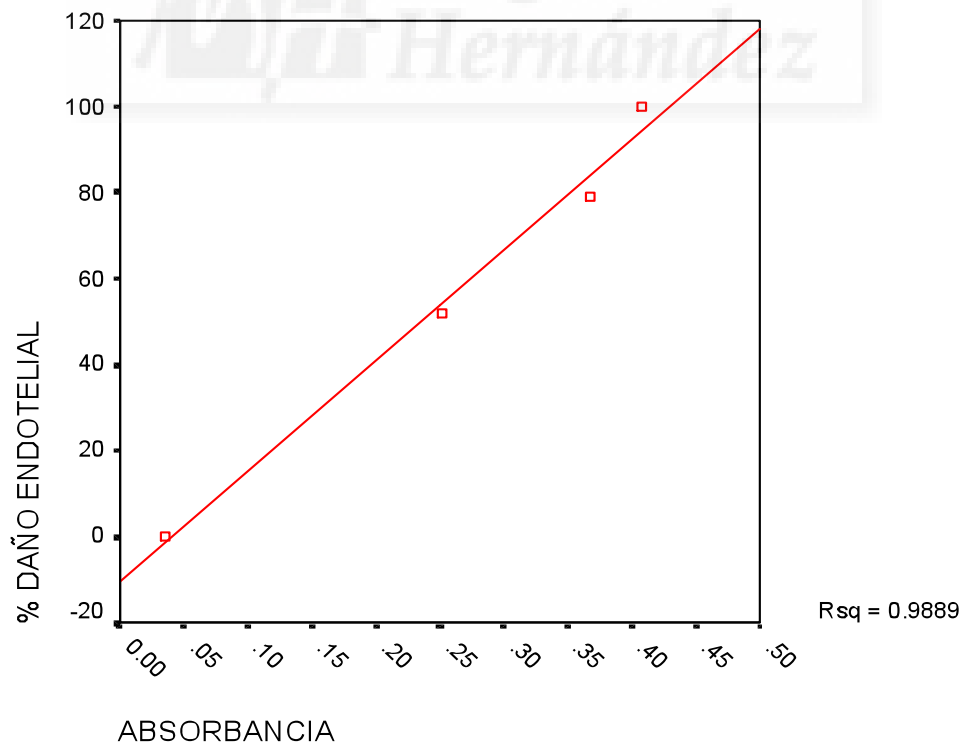


Figura II.2: Curva patrón Verde Janus.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0%	0,038	0,029	0,036	0,040	0,035	0,034	0,034	0,032	0,037	0,033
52%	0,259	0,268	0,244	0,239	0,250	0,270	0,260	0,230	0,255	0,248
79%	0,388	0,339	0,360	0,372	0,357	0,333	0,355	0,397	0,366	0,401
100%	0,398	0,422	0,418	0,348	0,445	0,404	0,436	0,388	0,399	0,421

Tabla II.1: Absorbancia en botones corneales con % lesión conocida

% LESIÓN	MEDIA+ DE	P
0%	0,035± 0,0032	
52%	0,252±0,0126	<0,001
79%	0,367±0,0229	<0,001
100%	0,408±0,0275	<0,001

Tabla II.2: Media ± DE de absorbancia de los botones corneales con % lesión conocida.

II.2.-ESTUDIO DEL DAÑO DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES (TÉCNICA DE FOTOMETRÍA DEL VERDE JANUS)

En las tablas II.3 y II.4 aparecen los datos obtenidos de todos los animales de experimentación, para las fases 1 y 2.

La tabla II.5 resume las medias \pm desviaciones estándar (DE) obtenidas para cada grupo de estudio. La figura II.3 muestra la representación gráfica en forma de barras de las diferencias obtenidas en cada grupo.

En la tabla II.6 se aprecia la facilidad de inyección de los diferentes viscoelásticos, con su representación gráfica en la figura II.4. En la tabla II.7 se aprecia la facilidad de extracción de los diferentes viscoelásticos, con su representación gráfica en la figura II.5.

No se registró ninguna complicación intra-quirúrgica.

Las comparaciones estadísticas de los distintos grupos y parámetros estudiados se presentan en la tabla II.8.

Las figuras de II.6 a II.9 representan gráficamente el porcentaje de daño endotelial a las diferentes concentraciones de peróxido, señalando aquellas que presentan diferencias estadísticamente significativas.

En las figuras II.10 y II.11 se representa la media \pm DE de la valoración del cirujano en la facilidad de inyección y extracción del VES, respectivamente.

En la tabla II.9 y en la figura II.12 se expone el porcentaje de reducción del daño endotelial para cada viscoelástico y concentración de H₂O₂, respecto a los valores del control (no VES).

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)	
No VES/Control	1	1002	NE	NE	0.063	5.710	
	1	1014	NE	NE	0.047	1.598	
	1	1026	NE	NE	0.039	-0.458	
	1	1038	NE	NE	0.035	-1.485	
	1	1050	NE	NE	0.035	-1.485	
	1	1062	NE	NE	0.044	0.827	
	1	1074	NE	NE	0.041	0.056	
	1	1086	NE	NE	0.036	-1.229	
	1	1098	NE	NE	0.038	-0.715	
	1	1110	NE	NE	0.040	-0.201	
		Media				0.042	0.262
		DE				0.008	2.156
No VES/1mMH2O2	2	1003	NE	NE	0.098	14.705	
	2	1015	NE	NE	0.112	18.302	
	2	1027	NE	NE	0.149	27.811	
	2	1039	NE	NE	0.111	18.045	
	2	1051	NE	NE	0.089	12.392	
	2	1063	NE	NE	0.092	13.163	
	2	1075	NE	NE	0.091	12.906	
	2	1087	NE	NE	0.140	25.498	
	2	1099	NE	NE	0.079	9.822	
	2	1111	NE	NE	0.132	23.442	
		Media				0.109	17.609
		DE				0.024	6.139

Tabla II.3. Datos por grupos Fase 1.

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)	
No VES/10mMH2O2	3	1005	NE	NE	0.195	39.632	
	3	1017	NE	NE	0.123	21.129	
	3	1029	NE	NE	0.136	24.470	
	3	1041	NE	NE	0.179	35.520	
	3	1053	NE	NE	0.152	28.582	
	3	1065	NE	NE	0.015	-6.522	
	3	1077	NE	NE	0.174	34.236	
	3	1089	NE	NE	0.199	40.660	
	3	1101	NE	NE	0.192	38.861	
	3	1113	NE	NE	0.188	37.833	
		Media				0.155	29.440
		DE				0.056	14.286
SVS18/control	4	1001	1	1	0.048	1.855	
	4	1013	1	1	0.018	-5.854	
	4	1025	1	2	0.007	-8.681	
	4	1037	1	2	0.019	-5.597	
	4	1049	1	2	0.047	1.598	
	4	1061	1	2	0.036	-1.229	
	4	1073	1	2	0.026	-3.798	
	4	1085	1	2	0.012	-7.396	
	4	1097	1	2	0.038	-0.715	
	4	1109	1	2	0.002	-9.966	
		Media		1.000	1.800	0.025	-3.978
		DE		0.000	0.422	0.016	4.205

Tabla II.3 (Cont). Datos por grupos Fase 1. (Nota: NE = no evaluable)

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)	
SVS18/1mmMH2O2	5	1004	1	1	0.078	9.565	
	5	1016	1	2	0.054	3.397	
	5	1028	2	2	0.114	18.816	
	5	1040	1	2	0.042	0.313	
	5	1052	1	2	0.098	14.705	
	5	1064	1	2	0.056	3.911	
	5	1076	1	2	0.079	9.822	
	5	1088	1	2	0.088	12.135	
	5	1100	1	2	0.129	22.671	
	5	1112	1	2	0.090	12.649	
		Media		1.100	1.900	0.083	10.798
		DE		0.316	0.316	0.027	6.995
SVS18/10mmMH2O2	6	1010	1	2	0.103	15.990	
	6	1022	1	2	0.081	10.336	
	6	1034	1	2	0.124	21.386	
	6	1046	1	2	0.127	22.157	
	6	1058	1	2	0.093	13.420	
	6	1070	1	2	0.125	21.643	
	6	1082	2	2	0.100	15.219	
	6	1094	1	2	0.072	8.023	
	6	1106	1	1	0.099	14.962	
	6	1118	1	2	0.136	24.470	
		Media		1.100	1.900	0.106	16.761
		DE		0.316	0.316	0.021	5.465

Tabla II.3 (Cont). Datos por grupos Fase 1.

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)
Healon/control	7	1009	3	3	0.017	-6.111
	7	1021	3	2	0.013	-7.139
	7	1033	3	3	0.040	-0.201
	7	1045	3	3	0.085	11.364
	7	1057	3	3	0.080	10.079
	7	1069	2	3	0.094	13.677
	7	1081	3	3	0.070	7.509
	7	1093	3	3	0.071	7.766
	7	1105	3	3	0.135	24.213
	7	1117	3	3	0.090	12.649
		Media		2.900	2.900	0.070
	DE		0.316	0.316	0.037	9.571
Healon/1mMH2O2	8	1008	3	3	0.122	20.872
	8	1020	3	3	0.083	10.850
	8	1032	2	3	0.084	11.107
	8	1044	3	3	0.086	11.621
	8	1056	3	2	0.069	7.252
	8	1068	3	3	0.141	25.755
	8	1080	3	3	0.098	14.705
	8	1092	3	3	0.084	11.107
	8	1104	3	3	0.135	24.213
	8	1116	3	3	0.080	10.079
		Media		2.900	2.900	0.098
	DE		0.316	0.316	0.025	6.478

Tabla II.3 (Cont). Datos por grupos Fase 1.

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)	
Healon/10mMH2O2	9	1006	3	3	0.132	23.442	
	9	1018	3	2	0.130	22.928	
	9	1030	3	3	0.122	20.872	
	9	1042	3	3	0.082	10.593	
	9	1054	2	3	0.140	25.498	
	9	1066	3	3	0.106	16.761	
	9	1078	3	3	0.155	29.353	
	9	1090	3	3	0.125	21.643	
	9	1102	3	3	0.123	21.129	
	9	1114	3	3	0.158	30.124	
		Media		2.900	2.900	0.127	22.234
		DE		0.316	0.316	0.022	5.720
Viscoat/Control	10	1012	1	1	0.047	1.598	
	10	1024	1	1	0.039	-0.458	
	10	1036	2	1	0.038	-0.715	
	10	1048	1	1	0.069	7.252	
	10	1060	1	1	0.052	2.883	
	10	1072	1	1	0.034	-1.742	
	10	1084	1	2	0.088	12.135	
	10	1096	1	1	0.038	-0.715	
	10	1108	1	1	0.083	10.850	
	10	1120	1	1	0.062	5.453	
		Media		1.100	1.100	0.055	3.654
		DE		0.316	0.316	0.020	5.043

Tabla II.3 (Cont). Datos por grupos Fase 1.

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)	
Viscoat/1mMH2O2	11	1007	1	1	0.105	16.504	
	11	1019	1	1	0.089	12.392	
	11	1031	2	1	0.105	16.504	
	11	1043	1	1	0.076	9.051	
	11	1055	1	1	0.109	17.531	
	11	1067	1	2	0.113	18.559	
	11	1079	1	1	0.075	8.794	
	11	1091	1	1	0.064	5.967	
	11	1103	1	1	0.110	17.788	
	11	1115	1	1	0.080	10.079	
		Media		1.100	1.100	0.093	13.317
		DE		0.316	0.316	0.018	4.589
Viscoat/10mMH2O2	12	1011	1	1	0.146	27.040	
	12	1023	1	1	0.158	30.124	
	12	1035	2	1	0.159	30.381	
	12	1047	1	1	0.146	27.040	
	12	1059	1	1	0.108	17.274	
	12	1071	1	2	0.105	16.504	
	12	1083	1	1	0.121	20.615	
	12	1095	1	1	0.085	11.364	
	12	1107	1	1	0.138	24.984	
	12	1119	1	1	0.084	11.107	
		Media		1.100	1.100	0.125	21.643
		DE		0.316	0.316	0.028	7.310

Tabla II.3 (Cont). Datos por grupos Fase 1.

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)	
No VES/100mM	1	2002	NE	NE	0.270	58.906	
	1	2006	NE	NE	0.250	53.767	
	1	2010	NE	NE	0.303	67.387	
	1	2014	NE	NE	0.245	52.482	
	1	2018	NE	NE	0.265	57.621	
	1	2022	NE	NE	0.266	57.878	
	1	2026	NE	NE	0.289	63.789	
	1	2030	NE	NE	0.333	75.096	
	1	2034	NE	NE	0.295	65.331	
	1	2038	NE	NE	0.270	58.906	
	Media					0.279	61.116
	DE					0.027	6.837
SVS18/100mM	2	2001	1	2	0.301	66.873	
	2	2005	1	2	0.225	47.342	
	2	2009	1	2	0.214	44.515	
	2	2013	2	2	0.298	66.102	
	2	2017	1	2	0.198	40.403	
	2	2021	1	2	0.233	49.398	
	2	2025	2	2	0.179	35.520	
	2	2029	1	2	0.268	58.392	
	2	2033	1	1	0.248	53.253	
	2	2037	1	2	0.202	41.431	
	Media			1.200	1.900	0.237	50.323
	DE			0.422	0.316	0.042	10.732

Tabla II.4. Datos por grupos Fase 2. (Nota: NE = no evaluable)

Resultados

	Grupo randomización	Nº randomización	Facilidad de inyección	Facilidad de extracción	Espectro	Daño endotelial (%)	
Healon/100mM	3	2004	3	3	0.265	57.621	
	3	2008	3	2	0.255	55.051	
	3	2012	2	3	0.222	46.571	
	3	2016	3	3	0.247	52.996	
	3	2020	2	3	0.236	50.169	
	3	2024	3	3	0.249	53.510	
	3	2028	3	2	0.288	63.532	
	3	2032	3	3	0.272	59.420	
	3	2036	3	3	0.282	61.990	
	3	2040	3	3	0.241	51.454	
		Media		2.800	2.800	0.256	55.231
		DE		0.422	0.422	0.021	5.382
Viscoat/100mM	4	2003	1	2	0.238	50.683	
	4	2007	1	1	0.190	38.347	
	4	2011	2	1	0.231	48.884	
	4	2015	1	1	0.295	65.331	
	4	2019	NE	NE	0.227	47.856	
	4	2023	2	1	0.266	57.878	
	4	2027	1	1	0.271	59.163	
	4	2031	1	1	0.209	43.230	
	4	2035	1	2	0.267	58.135	
	4	2039	1	1	0.201	41.174	
		Media		1.222	1.222	0.240	51.068
		DE		0.441	0.441	0.034	8.830

Tabla II.4 (Cont). Datos por grupos Fase 2. (Nota: NE = no evaluable)

	Control		1mM H2O2		10mM H2O2		100mM H2O2	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
No VES	0.262	2.156	17.609	6.139	29.44	14.286	61.12	6.84
SVS18	-3.978	4.205	10.798	6.995	16.761	5.465	50.32	10.73
Healon	7.381	9.571	14.756	6.478	22.234	5.72	55.23	5.38
Viscoat	3.654	5.043	13.317	4.589	21.643	7.31	51.07	8.83

Tabla II.5: media \pm DE, para cada grupo de estudio.

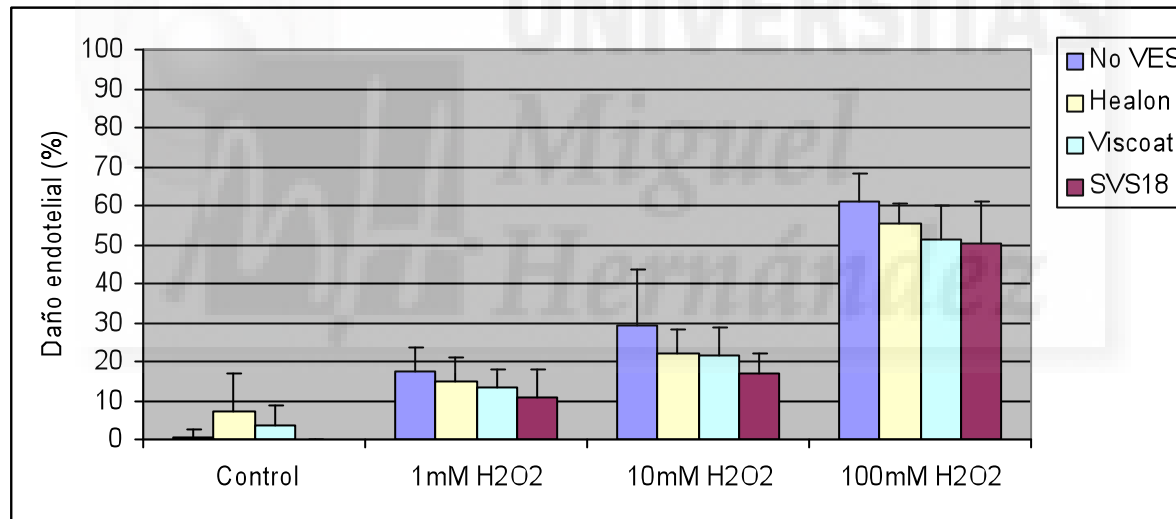


Figura II.3: Representación gráfica de las medias \pm DE de cada grupo.

Resultados

	Control		1mM H2O2		10mM H2O2		100mM H2O2	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
No VES	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
SVS18	1	0	1.1	0.316	1.1	0.316	1.2	0.4
Healon	2.9	0.316	2.9	0.316	2.9	0.316	2.8	0.4
Viscoat	1.1	0.316	1.1	0.316	1.1	0.316	1.2	0.4

Tabla II.6: Facilidad de inyección de los viscoelásticos.

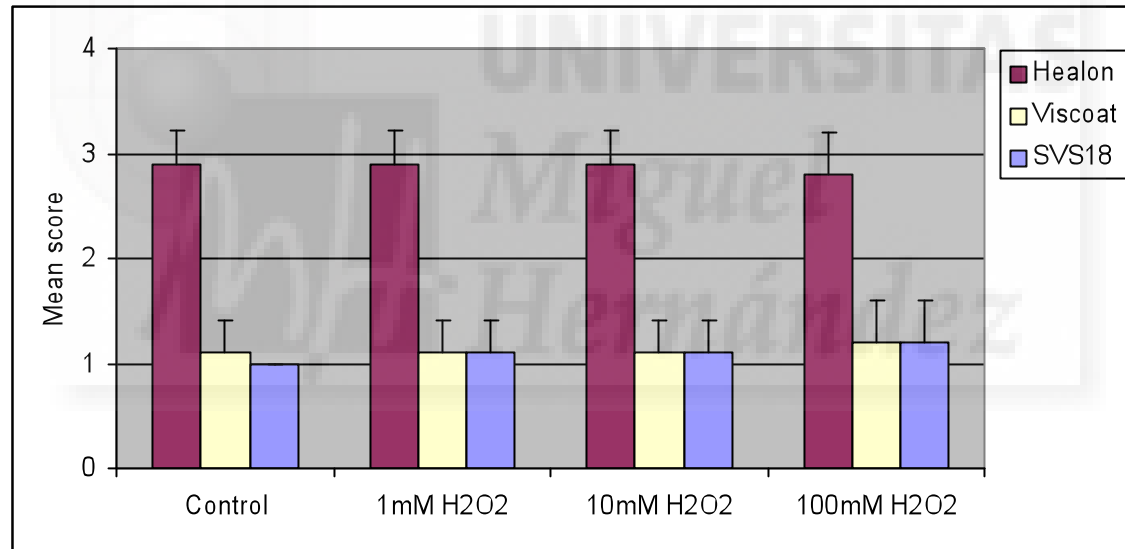


Figura II.4: Representación gráfica de la facilidad de inyección de los viscoelásticos.

Resultados

	Control		1mM H2O2		10mM H2O2		100mM H2O2	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
No VES	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
SVS18	1.8	0.422	1.9	0.316	1.9	0.316	1.9	0.3
Healon	2.9	0.316	2.9	0.316	2.9	0.316	2.8	0.4
Viscoat	1.1	0.316	1.1	0.316	1.1	0.316	1.2	0.4

Tabla II.7: Facilidad de extracción de los viscoelásticos.

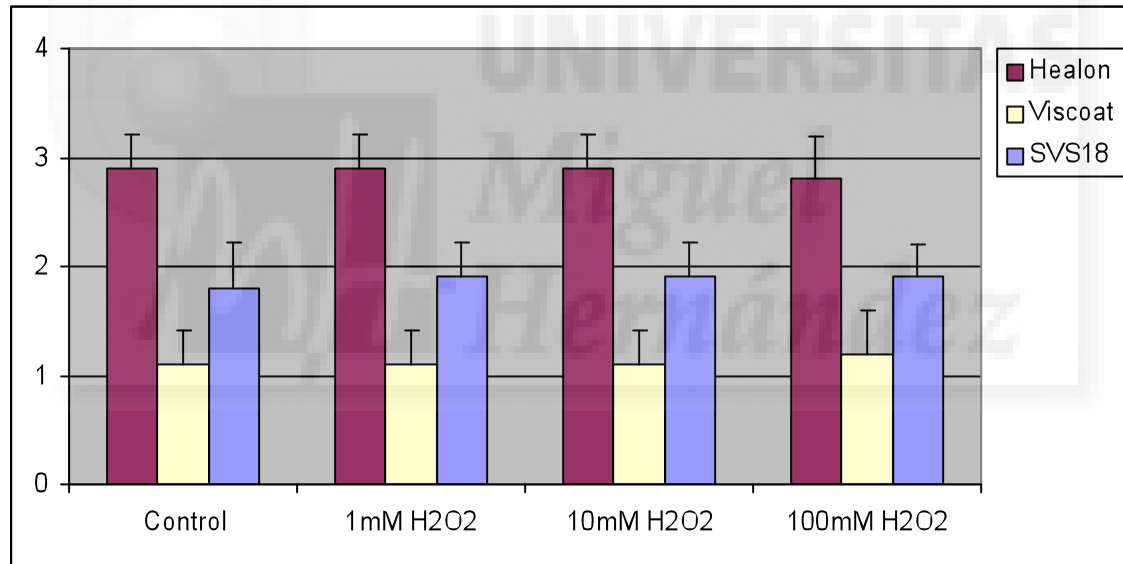


Figura II.5: Representación gráfica de la facilidad de extracción de los viscoelásticos.

Control / no H ₂ O ₂	p	MW-statistic	95%-CI	comentario
no VES vs SVS18	0.045*	0.765	[0.5133;1]	SVS18 superior a no VES
no VES vs Healon	0.0548*	0.245	[0.0025;0.4875]	No VES superior a Healon
no VES vs Viscoat	0.1828	0.32	[0.0779;0.5621]	No VES superior a Viscoat
SVS18 vs Healon	0.0089*	0.16	[0;0.4064]	SVS18 superior a Healon
SVS18 vs Viscoat	0.003*	0.125	[0;0.3812]	SVS18 superior a Viscoat
Healon vs Viscoat	0.2103	0.67	[0.4318;0.9082]	Viscoat superior a Healon

Tabla II.8: Comparaciones estadísticas de los distintos grupos y parámetros de daño endotelial.

1mM H ₂ O ₂	p	MW-statistic	95%-CI	Comentario
no VES vs SVS18	0.0337*	0.78	[0.5296;1]	SVS18 superior a no VES
no VES vs Healon	0.2244	0.665	[0.4262;0.9038]	Healon superior a no VES
no VES vs Viscoat	0.1276	0.705	[0.4641;0.9459]	Viscoat superior a no VES
SVS18 vs Healon	0.288	0.355	[0.116;0.594]	SVS18 superior a Healon
SVS18 vs Viscoat	0.4688	0.4	[0.1623;0.6377]	SVS18 ligeramente superior a Viscoat
Healon vs Viscoat	0.6976	0.555	[0.3182;0.7918]	Viscoat igual a Healon

Tabla II.8 (Cont.): Comparaciones estadísticas de los distintos grupos y parámetros de daño endotelial.

10mM H2O2	p	MW-statistic	95%-CI	comentario
no VES vs SVS18	0.0056*	0.855	[0.6061;1]	SVS18 superior a no VES
no VES vs Healon	0.0302*	0.785	[0.5384;1]	Healon superior a no VES
no VES vs Viscoat	0.0336*	0.78	[0.5407;1]	Viscoat superior a no VES
SVS18 vs Healon	0.055*	0.245	[0.0003;0.4897]	SVS18 superior a Healon
SVS18 vs Viscoat	0.1013	0.28	[0.0404;0.5196]	SVS18 superior a Viscoat
Healon vs Viscoat	0.9844	0.505	[0.268;0.742]	Viscoat igual a Healon

Tabla II.8 (Cont.): Comparaciones estadísticas de los distintos grupos y parámetros de daño endotelial.

100mM H2O2	p	MW-statistic	95%-CI	Comentario
no VES vs SVS18	0.0273*	0.79	[0.5399;1]	SVS18 superior a no VES
no VES vs Healon	0.0547*	0.755	[0.5107;0.9993]	Healon superior a no VES
no VES vs Viscoat	0.0272*	0.79	[0.5407;1]	Viscoat superior a no VES
SVS18 vs Healon	0.2176	0.33	[0.0864;0.5736]	SVS18 superior a Healon
SVS18 vs Viscoat	0.9118	0.48	[0.2444;0.7156]	SVS18 igual a Viscoat
Healon vs Viscoat	0.2799	0.65	[0.4089;0.8911]	Viscoat superior a Healon

Tabla II.8 (Cont.): Comparaciones estadísticas de los distintos grupos y parámetros de daño endotelial.

Facilidad de inyección

	p	MW- statistic	95%-CI	Comentario
SVS18 vs. Healon	<0.0001*	0.9937	[0.947;1]	Healon es significativamente mejor que SVS18
SVS18 vs. Viscoat	0.737	0.5141	[0.444;0.584 2]	SVS18 igual a Viscoat
Healon vs. Viscoat	<0.0001*	0.008	[0;0.0609]	Healon es significativamente mejor que Viscoat

Facilidad de extracción

	p	MW- statistic	95%-CI	Comentario
SVS18 vs. Healon	<0.0001*	0.9453	[0.8772;1]	Healon es significativamente mejor que SVS18
SVS18 vs. Viscoat	<0.0001*	0.1266	[0.0533;0.1999]	SVS18 es significativamente mejor que Viscoat.
Healon vs. Viscoat	<0.0001*	0.008	[0;0.0609]	Healon es significativamente mejor que Viscoat

Tabla II.8 (Cont.): Comparaciones estadísticas de los distintos grupos en cuanto a la facilidad de inyección o extracción del VES, según valoración del cirujano.

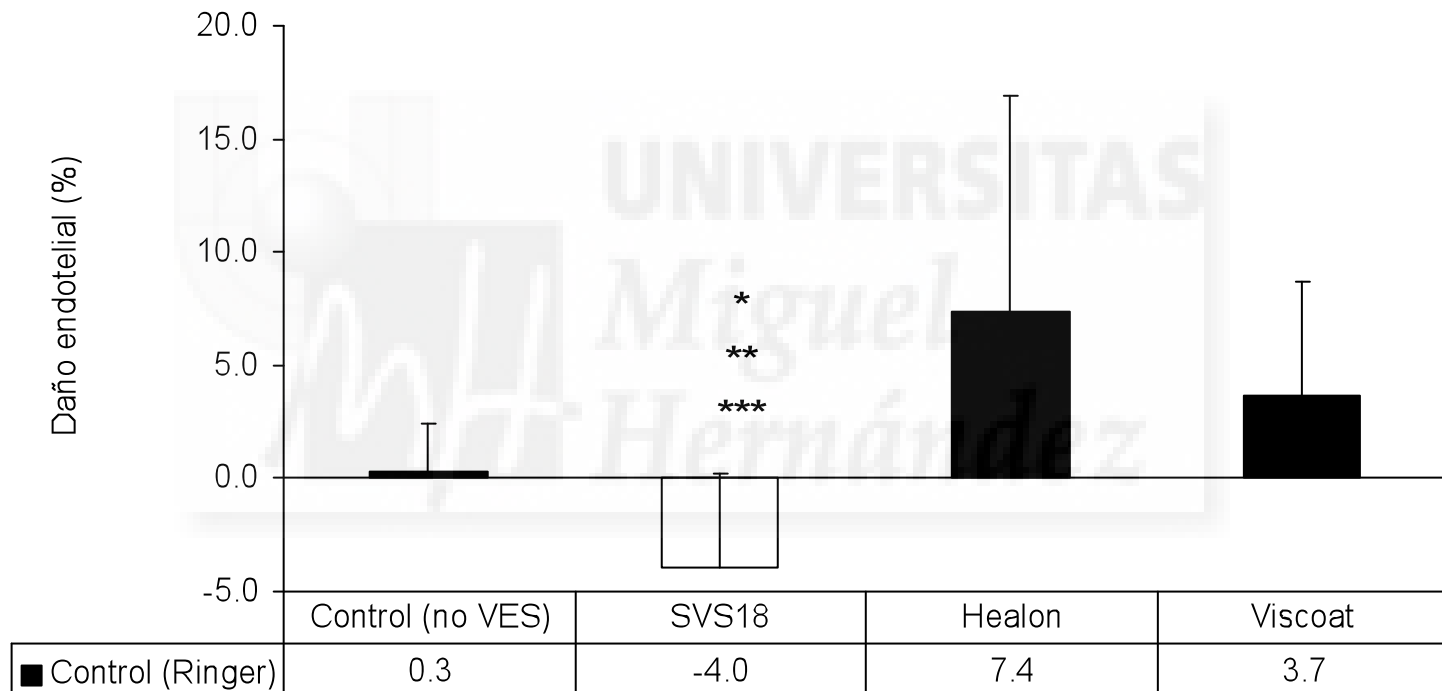


Figura II.6: Daño endotelial (media±DE, %) tras la exposición a solución de Ringer Lactato en cámara anterior (Control, sin peróxido) en el control (no VES), SVS18, HE y VC . *p=0.045 vs. no VES; **p= 0.0089 vs. HE; ***p=0.003 vs. VC.

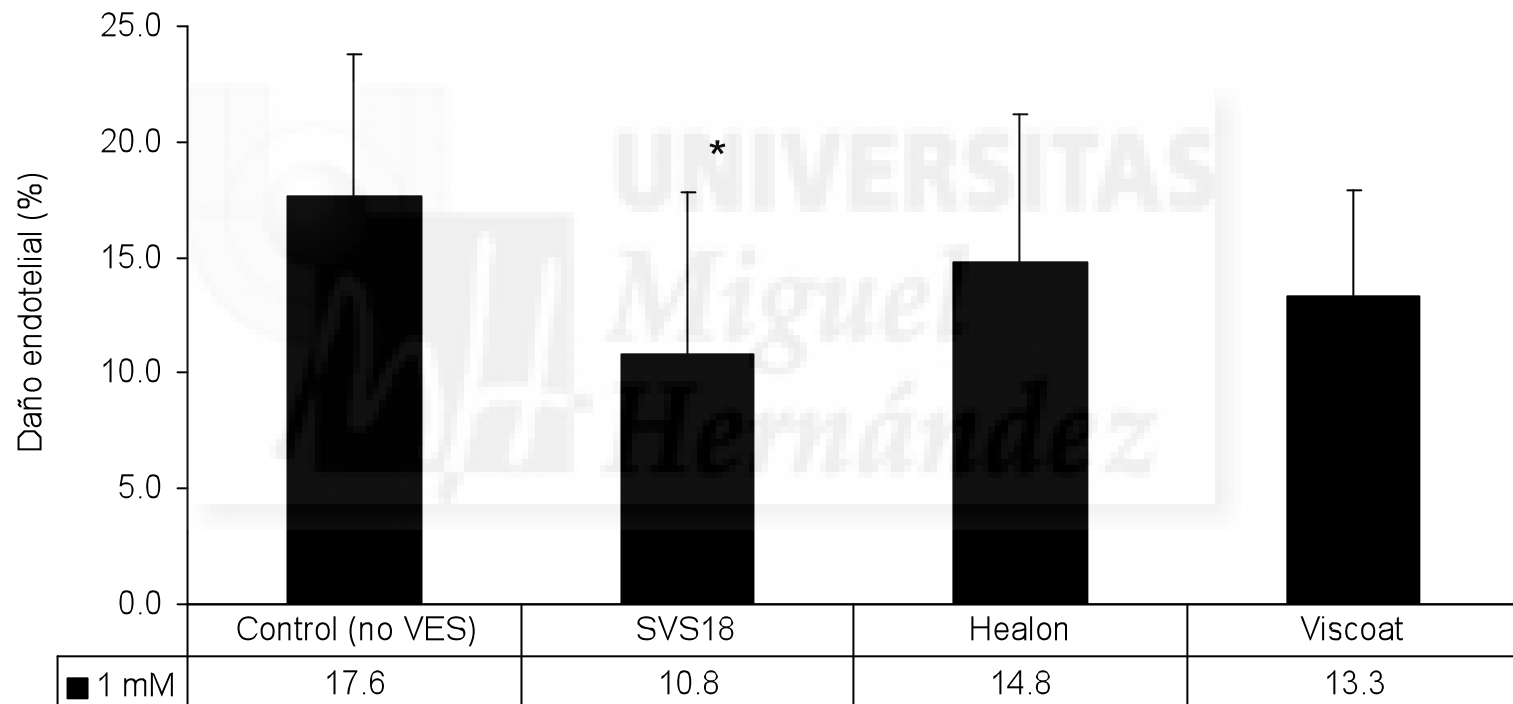


Figura II.7: Daño endotelial (media \pm DE, %) tras la exposición a 1mM de peróxido en cámara anterior en el Control (no VES), SVS18, HE y VC. * $p=0.0337$ vs. no VES; SVS18 vs. Viscoat y Healon N.S.

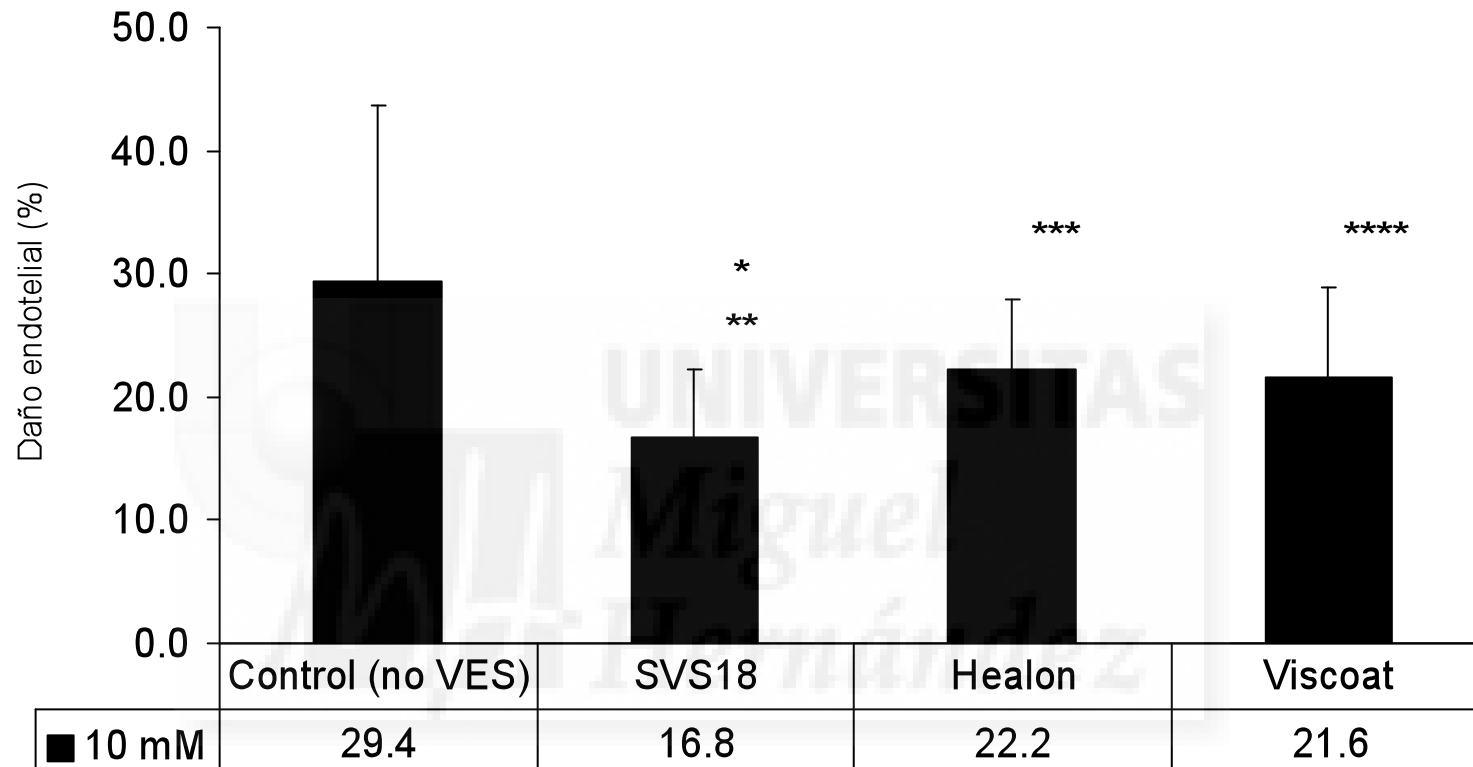


Figura II.8: Daño endotelial (media±DE, %) tras la exposición a 10mM de peróxido en cámara anterior en el Control (no VES), SVS18, HE y VC. *p=0.0056 vs. Control (no VES); **p=0.055 vs. HE; ***p=0.0302 vs. Control (no VES); ****p=0.0336 vs. Control (no VES)

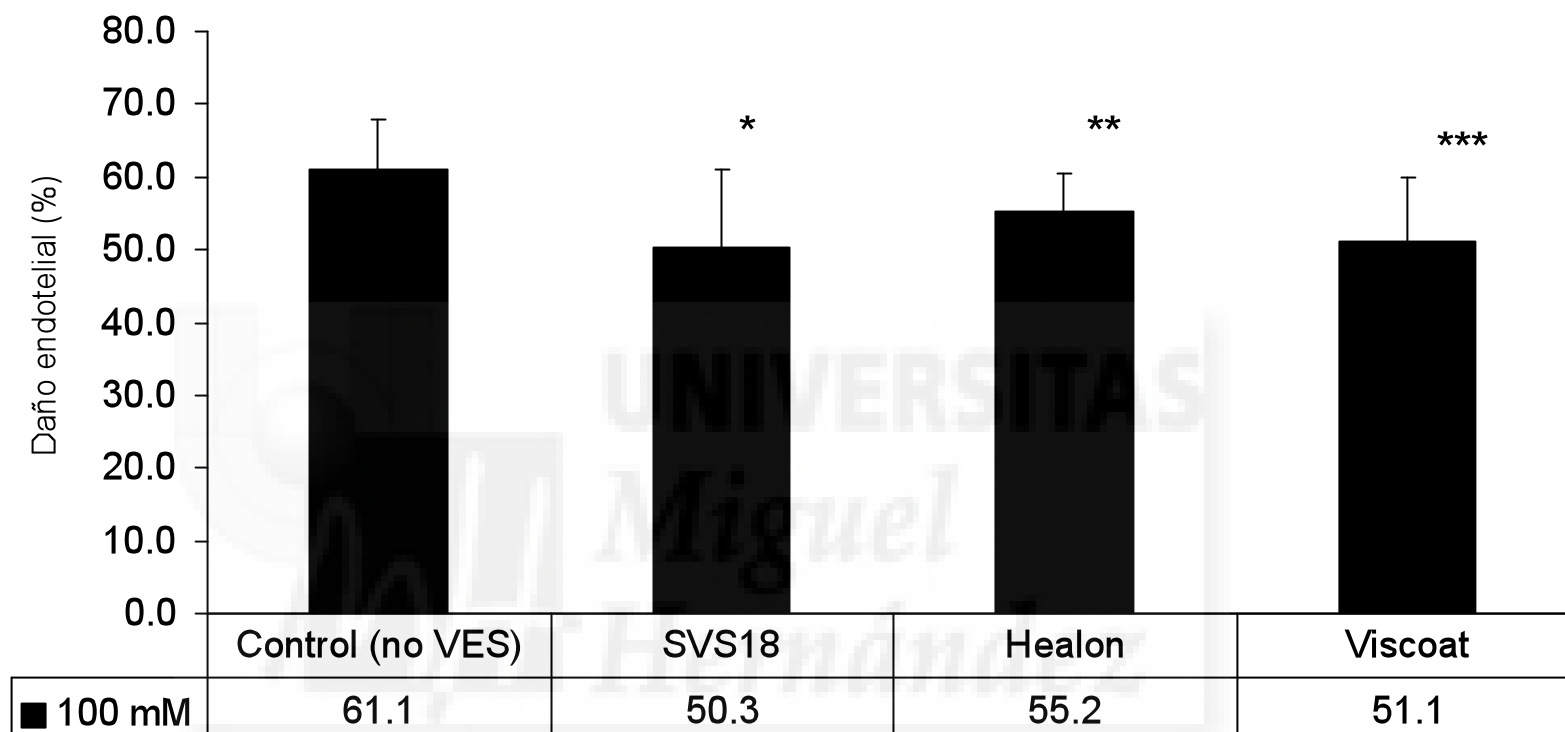


Figura II.9: Daño endotelial (media±DE, %) tras la exposición a 100mM de peróxido en cámara anterior en el Control (no VES), SVS18, HE y VC . *p=0.0273, **p=0.0547, ***p=0.0272 vs. Control (no VES)

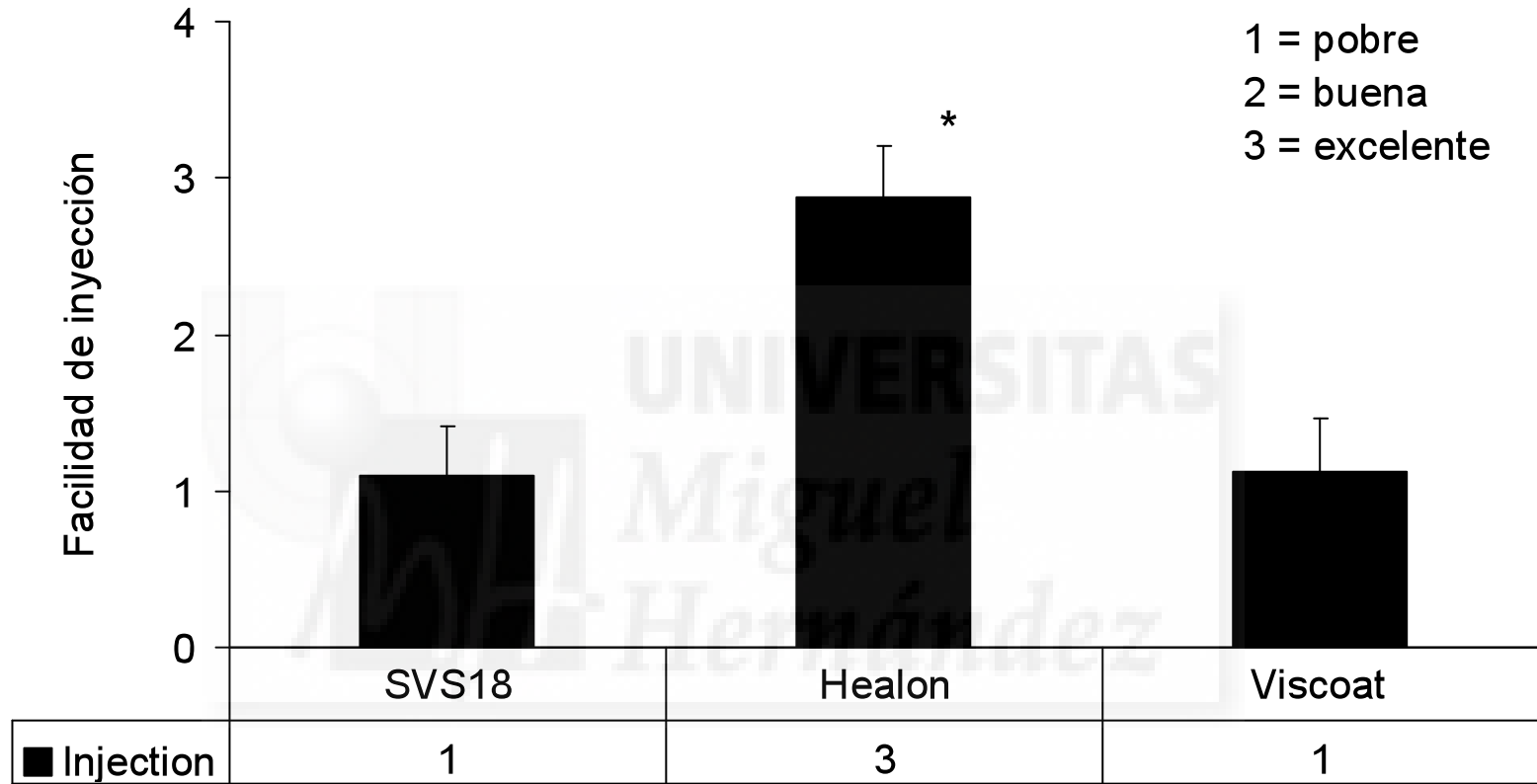


Figura II.10: Facilidad de inyección (media±DE) de SVS18, HE y VC. * $p < 0.0001$ vs. SVS18 y VC

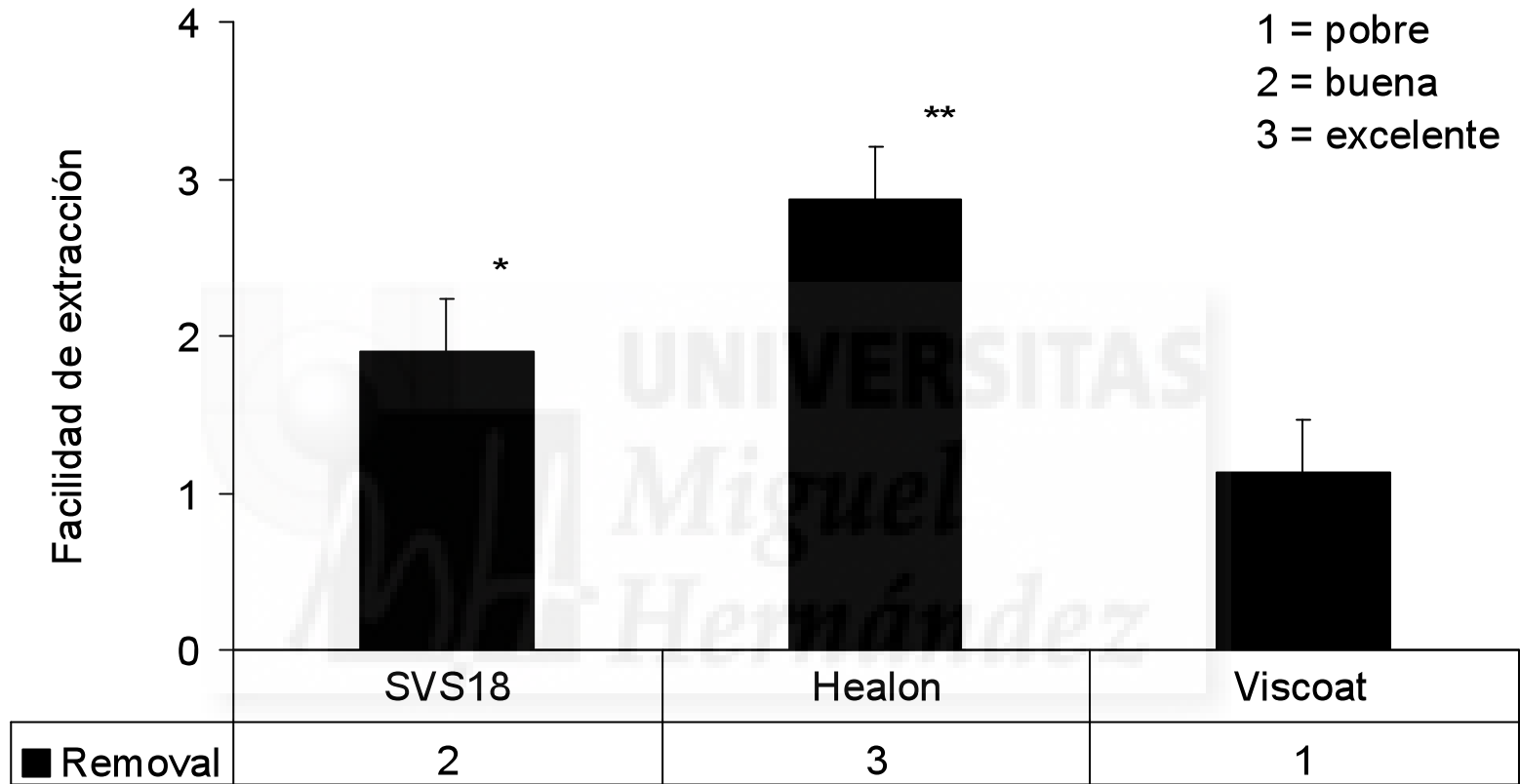


Figura II.11: Facilidad de extracción (media±DE) de SVS18, HE y VC. *p<0.0001 vs. VC, **p<0.001 vs. SVS18 y VC.

VES \ H₂O₂.	1 mM	10 mM	100 mM
SVS 18	38,7 %	43.1 %	17,7 %
HEALON	16.2 %	24,5 %	9,6 %
VISCOAT	24,4 %	26,5 %	16,4 %

Tabla II.9: Porcentaje de reducción del daño endotelial para cada VES y concentración de H₂O₂, respecto al Control (no VES).

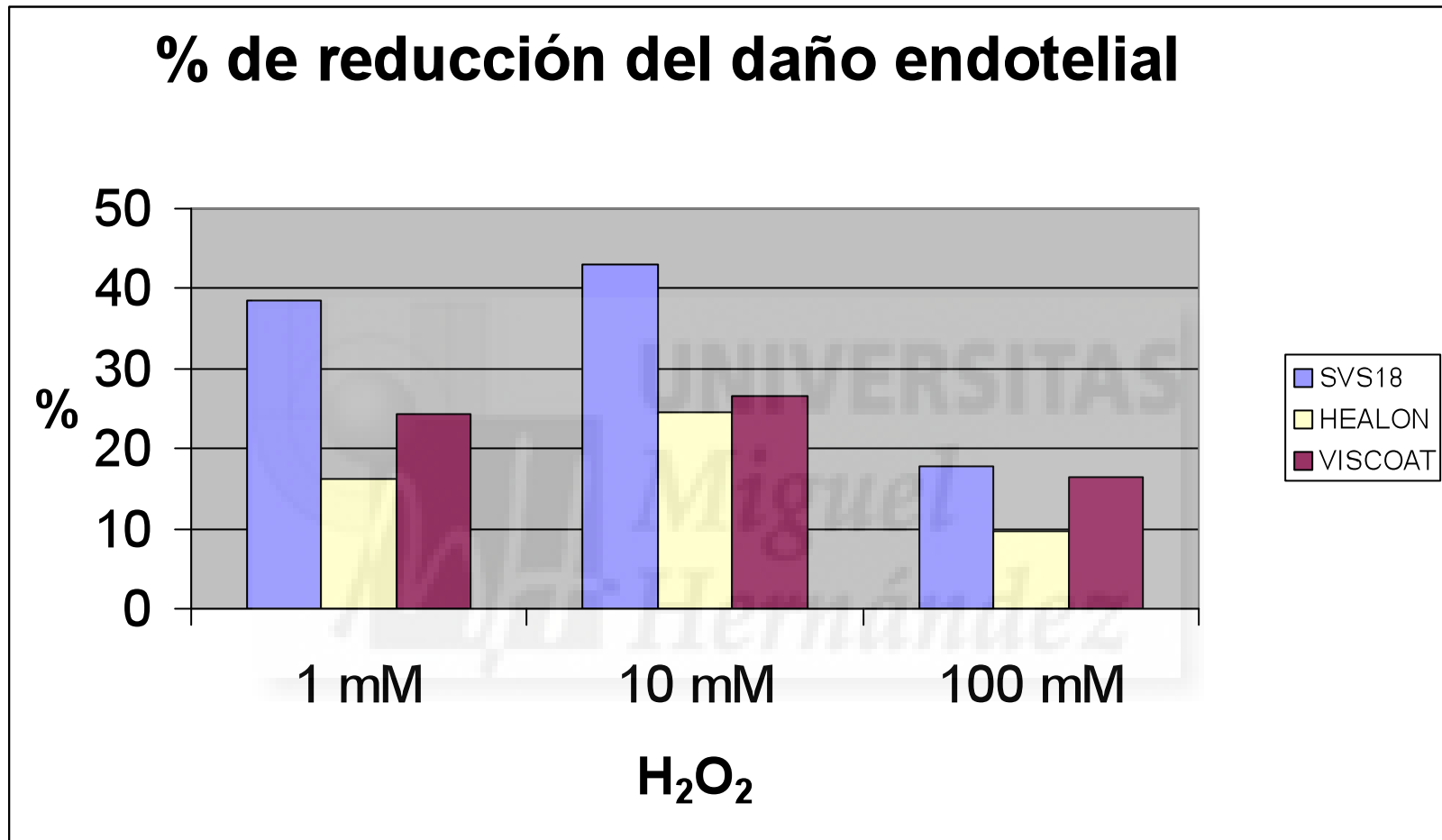


Figura II.12. Porcentaje de reducción del daño endotelial de cada VES para las distintas concentraciones de H₂O₂



DISCUSIÓN

I.- ESTUDIO *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENADOS DE RETINA BOVINA

El hialuronato sódico (HS) es un biopolímero cada vez más empleado en medicina por sus características de modulación de las funciones celulares, inhibición de mediadores de la inflamación y atenuación de los receptores del dolor (Ghosh, 1994; Dougados, 2000). En oftalmología el uso de hialuronato sódico como solución viscoelástica (VES) en la cirugía de las cataratas supuso un cambio significativo en la prevención de complicaciones de la cirugía extracapsular, y hoy en día sigue cumpliendo ese mismo papel en la facoemulsificación.

Sin embargo, muy poco se conoce acerca del mecanismo de acción del HS a nivel celular. Existen varios estudios *in vivo* que le atribuyen efectos protectores por su capacidad aceptora de radicales libres (Artola *et al.*, 1993a; Artola A *et al.*, 1993b; Holst *et al.*, 1993; Arshinoff, 2000). En cambio, son pocos los estudios que han demostrado claramente la capacidad antioxidante de HS *in vitro* (Takahashi *et al.*, 2002).

En nuestro estudio diseñamos un modelo experimental *in vitro* para demostrar el efecto aceptor de radicales libres del hialuronato sódico. Este modelo está basado en un estudio previo (Belda *et al.*, 1996) en el que se determinó la capacidad de inhibición de malondialdehído (MDA), un producto de la peroxidación lipídica, en un modelo *in vitro* utilizando distintos antioxidantes naturales y sintéticos sobre homogenados de retina humana, en la que previamente se había inducido una peroxidación con ADP-Fe⁺⁺. En nuestro modelo, hemos sustituido la retina humana por retina bovina (ante la dificultad de obtención de muestras humanas de estas características) y la peroxidación no fue inducida, sino espontánea, tras incubación al aire, a 37°C durante 60 minutos.

En primer lugar, de los resultados obtenidos y que se muestran en la [tabla I.1](#) del apartado de *Resultados*, podemos afirmar que el modelo *in vitro* en retina bovina es un modelo adecuado para inducir peroxidación lipídica espontánea, ya que los valores de

MDA aumentan progresivamente con el tiempo de exposición, con un resultado final a los 60 minutos 5 veces mayor que el inicial.

Por otro lado, tal y como se aprecia claramente en la [figura I.1](#) de *Resultados*, todos los VES empleados inhibieron efectivamente la producción de MDA, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto al control para todos los tiempos estudiados, aunque con mayor significación estadística para el t60 ([tabla I.2](#) de *Resultados*).

Sin embargo, cuando buscamos diferencias entre los distintos VES en cuanto a su capacidad inhibitoria de la producción de MDA, todos ellos resultan igual de efectivos, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos ([tabla I.3](#) de *Resultados*), aunque sí de forma individual frente al control.

La ausencia de diferencias en cuanto a la capacidad antioxidante *in vitro* entre los distintos VES estudiados, a pesar de que las concentraciones de HS son diferentes en cada uno de ellos, y de la coexistencia de otras sustancias con capacidad aceptora de radicales libres (p.e. manitol en el SVS18), puede ser debida al número limitado de muestras estudiadas, o a la dilución única de VES empleada para nuestro estudio. Este hecho podría mejorarse en un próximo estudio en el que se emplearán distintas diluciones de VES junto con la posibilidad de trabajar con oxidaciones inducidas con ADP-Fe⁺⁺.

La confirmación de la capacidad inhibitoria *in vitro* de la peroxidación lipídica de los VES utilizados en este estudio mediante el modelo experimental diseñado al efecto, sienta las bases necesarias para la realización del estudio experimental *in vivo*.

Nuestro modelo experimental se perfila como un modelo útil y reproducible para determinar la capacidad antioxidante de los distintos VES que existen en el mercado. Creemos que mejorando los parámetros de dilución del VES, tiempos y forma efectiva de obtener la peroxidación, podría ser útil también para comparar la potencia antioxidante de cada VES, permitiendo obtener datos muy valiosos sobre los efectos beneficiosos de los VES, antes incluso de que estos sean comercializados.

II.- ESTUDIO *IN VIVO* DE LAS PROPIEDADES PROTECTORAS DE DISTINTOS VISCOELÁSTICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO ENDOTELIAL POR RADICALES LIBRES.

Una de las complicaciones más dramáticas tras la cirugía de la catarata mediante facoemulsificación es la descompensación endotelial, que conlleva la pérdida de la transparencia de la córnea, y la necesidad de una queratoplastia para que el paciente recupere su función visual (Ventura *et al*, 2001; Díaz-Valle *et al*, 1998).

En estudios previos nuestro grupo (Artola, 1990) ha utilizado un modelo experimental de daño endotelial con H₂O₂ y la tinción de Verde Janus para la valoración de la acción protectora endotelial frente a los radicales libres de distintas sustancias antioxidantes. En el presente trabajo hemos empleado el mismo modelo experimental para evaluar la capacidad protectora endotelial de distintos VES que se utilizan frecuentemente en la cirugía de la catarata.

El daño endotelial provocado por diversos modelos experimentales puede valorarse también mediante el conteo celular de células necróticas bajo observación microscópica tras realizar una tinción vital (de las muchas que existen). Sin embargo, hemos preferido utilizar la técnica fotométrica del colorante Verde Janus para nuestros estudios. La técnica fotométrica del Verde Janus utiliza la permeabilidad de las membranas celulares y nucleares como marcador de muerte celular. Se trata de una técnica validada y reciente para valorar el daño endotelial, que proporciona porcentajes de lesión global como parámetro de viabilidad endotelial (Hartmann y Rieck, 1989; Hartmann *et al.*, 1989). Se ha demostrado que el método de evaluación del daño corneal mediante la tinción de Verde Janus es mucho más objetivo (independiente de la experiencia del investigador), rápido, requiere equipo de laboratorio estándar, y además permite evaluar en conjunto toda la superficie endotelial; a diferencia del conteo celular directo con otras tinciones como el Rojo de Alizarina, que tan sólo evalúa una pequeña parte de la córnea central que se considere representativa, y que requiere múltiples evaluaciones centrales y periféricas para poder minimizar errores estadísticos (Pharmakakis *et al.*, 1995; Shimmelfennig, 1984).

Otros autores (Eggeling *et al.*, 2000; Artola *et al.*, 1993; Artola *et al.*, 1993) han utilizado la tinción de Verde Janus con éxito para evaluar el daño endotelial en sus estudios experimentales. Por estas razones se utilizó la técnica Verde Janus para nuestro estudio.

Existen estudios que demuestran que el H₂O₂ tiene una gran toxicidad sobre el endotelio corneal (Riley y Giblin, 1983). El H₂O₂ es una de las fuentes más importantes del radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que de forma natural se encuentra en concentraciones mínimas en el humor acuoso (0,025-0,030 mM) (Spector y Garner, 1981). El origen de este peróxido no está claro, pero lo más probable es que se forme de la oxidación del ácido ascórbico por el oxígeno molecular. Este proceso está catalizado por la luz y por la riboflavina (Giblin *et al.*, 1984). El radical $\cdot\text{OH}$ formado a partir del H₂O₂ (Reacción de Haber-Weiss: $\cdot\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \cdot\text{OH} + \text{O}_2$) tiene un potencial altamente oxidante, y rápidamente interacciona con proteínas y lípidos de los tejidos orgánicos, produciendo el daño oxidativo. El radical $\cdot\text{OH}$ ha sido relacionado con la patogenia de numerosas enfermedades como la artritis reumatoide (Greenwald y Moy, 1980) y el cáncer (Taniguchi *et al.*, 1993). La exposición al radical hidroxilo (y al resto de radicales libres) produce daño en tejidos oculares como el cristalino (Spector y Garner, 1981), el iris (Artola *et al.*, 1993b) y el endotelio corneal (Hull *et al.*, 1984). Además también ha sido implicado en múltiples enfermedades oculares como las cataratas (Bhuyan *et al.*, 1991), uveítis (Rodríguez-Galietero *et al.*, 1997) y retinopatía diabética (Doly *et al.*, 1992).

Otros posibles orígenes de los radicales libres derivados del oxígeno, durante los procesos de inflamación ocular son la activación de la cascada del ácido araquidónico, la activación de los fagocitos, además de los procesos de facoemulsificación durante la cirugía de cataratas (Shimmura *et al.*, 1992). Por ello, es esperable que el estrés oxidativo producido por los radicales libres derivados de la degradación del peróxido de hidrógeno liberado durante la cirugía de catarata, juegue un papel importante en el daño endotelial posquirúrgico.

En una tesis previa realizada por nuestro grupo (Artola, 1990) se valoraron las lesiones producidas por diversas concentraciones de H₂O₂ inyectadas en cámara anterior, mediante la técnica fotométrica del Verde Janus, estableciendo las concentraciones que producían una lesión máxima (dosis letal) y una lesión mínima. Según estos datos, se

encontró una lesión máxima (101%) para una concentración de H₂O₂ de 100 mM. y la concentración mínima de las ensayadas corresponde a 1 mM, con un porcentaje de lesión del 28,78%. Por ello éste fue el rango de concentraciones utilizado en nuestro estudio.

Otros autores también han utilizado H₂O₂ para inducir daño endotelial producido por radicales libres, demostrando que concentraciones de peróxido de hidrógeno mayores de 0,3-0,5 mM producen toxicidad endotelial y pueden inducir edema corneal (Csukas y Green, 1988). En nuestro modelo experimental el daño endotelial mediante radicales libres se produce mediante el uso de H₂O₂, simulando el que se produce durante el proceso quirúrgico de la facoemulsificación. Consideramos que este es un modelo válido, sencillo y reproducible que simula el daño oxidativo producido por la facoemulsificación y que permite valorar de forma objetiva el efecto antioxidante de distintos VES.

Hemos utilizado una solución de Ringer Lactato como control, debido a su baja toxicidad en el endotelio corneal, que ha sido confirmada en otros estudios (Edelhauser *et al.*, 1978). Creemos que el porcentaje de lesión obtenida confirma la validez del modelo fotométrico con la tinción de Verde Janus de nuestro estudio. En el grupo en el que se inyectó Ringer Lactato intracameramente se encontró una absorbancia media de 0.042 ± 0.008 , no presentando diferencias significativas respecto al grupo de corneas normales con lesión conocida del 0% (0.035 ± 0.0032), utilizado para realizar la curva patrón.

En las córneas empleadas para determinar la curva patrón con lesión del 0%, obtenemos una absorbancia media de $0,35 \pm 0.0032$. Esto es fácilmente comprensible si tenemos en cuenta que al realizar la trepanación y escisión corneal, y durante el manejo de la córnea a lo largo del proceso, se producen áreas pequeñas de alteraciones endoteliales, especialmente en el reborde del botón corneal, que posteriormente van a absorber Verde Janus, que se detectará por el fotómetro. El error metódico de sobreestimación de lesión endotelial que se induce por este mínimo trauma se puede considerar menor del 10%. Otros autores prefieren igualar dicho valor a 0, haciendo así una corrección de la curva patrón (Hartmann y Rieck, 1989).

La aplicación clínica inmediata de nuestros resultados es en la cirugía de la catarata mediante facoemulsificación. La técnica actual de elección para la extracción del cristalino cataratoso es la facoemulsificación ultrasónica seguida de implante de lente

intraocular (LIO), siendo uno de los procesos quirúrgicos más frecuentes en los países desarrollados. Existen numerosas evidencias de que la facoemulsificación ultrasónica produce radicales libres que pueden lesionar distintas estructuras endoculares (Hull *et al.*, 1984; Hull, 1990). Shimmura y colaboradores (Shimmura *et al.*, 1992) demostraron la formación de radicales libres durante la facoemulsificación en un modelo experimental *in vitro*. Holst y colaboradores (Holst *et al.*, 1993) verificaron este fenómeno en un modelo quirúrgico *in vivo* utilizando conejos.

Uno de los mecanismos por el que se produce la formación de radicales libres durante la utilización de los ultrasonidos en una solución acuosa es la cavitación acústica, que produce el colapso de las burbujas de gas, y ocasionan una sonolisis del agua con formación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) y átomos de hidrógeno ($\cdot\text{H}$) (Riesz y Kondo, 1992; Shimmura *et al.*, 1992). Según otros autores la formación de radicales libres también puede ser debida a la activación de la cascada del ácido araquidónico y al incremento de productos fotoquímicos derivados del peróxido procedentes de la luz usada por el microscopio quirúrgico (Takahashi *et al.*, 2002; Michels y Sternberg, 1990).

Otros estudios demostraron que la concentración de $\cdot\text{OH}$ era proporcional a la duración del tiempo de emisión del ultrasonido (Cameron *et al.*, 2001; Topaz *et al.*, 2002). Estos radicales libres producidos por los ultrasonidos pueden ser causantes de daño endotelial durante la cirugía de la catarata (Hull *et al.*, 1984; Shimmura *et al.*, 1992).

Numerosos trabajos han demostrado el efecto protector de varios aceptores de radicales libres durante el proceso de la facoemulsificación (Nakamura *et al.*, 1994; Beesly *et al.*, 1986), y se ha sugerido que estas sustancias podrían prevenir el daño endotelial inducido por la misma (Ventura *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 1996).

Holst y colaboradores (Holst *et al.*, 1993) demostraron que existe una gran liberación de radicales libres y de radiación ultravioleta durante la facoemulsificación, tanto *in vivo* como *in vitro*, y que esto podría reducirse al añadir superóxido dismutasa a la solución de irrigación. Sin embargo no examinaron si dicha solución podría reducir el daño endotelial.

Otros estudios han demostrado un efecto beneficioso con la irrigación de soluciones con glutatión (un aceptor de radicales libres) para reducir el daño endotelial.

(Nakamura *et al.*, 1994). Se han publicado estudios comparando el resultado de la cirugía de cataratas usando BSS como solución de irrigación frente a una solución similar con glutatión (BSS plus). Algunos de estos trabajos han demostrado un efecto protector en el endotelio corneal (Joussen *et al.*, 2000), mientras que otros no han visto ningún efecto beneficioso del glutatión (Puckett *et al.*, 1995).

Otros investigadores han utilizado el ácido ascórbico (un conocido aceptor de radicales libres) para valorar su efecto protector antioxidante frente al daño endotelial (Rubowitz *et al.*, 2003). Estos autores observaron que para tiempos de facoemulsificación menores de 5 minutos, el daño endotelial producido era mínimo en el grupo de solución salina con ácido ascórbico, mientras que este efecto protector no aparecía en el grupo de solución salina sólo. Debido a que los dos grupos eran idénticos en todos los parámetros de estudio, excepto en cuanto a la presencia o no del ácido ascórbico, los autores concluyen que la diferencia en los resultados de pérdida endotelial se explica fundamentalmente por la formación de radicales libres. Estos datos coinciden con nuestros resultados, reafirmando que el uso de sustancias antioxidantes en el suero de infusión o durante la cirugía puede contribuir a un menor daño endotelial por la facoemulsificación.

Otros autores (Rodríguez-Galietero *et al.*, 1997) emplearon L-NAME (un antioxidante sintético, inhibidor del óxido nítrico), demostrando un efecto protector del mismo frente al daño endotelial en un modelo de uveítis experimental.

Se ha demostrado que los agentes viscoelásticos (VES), recientemente llamados *Instrumentos Oftálmicos Viscoquirúrgicos (OVSD)* (Arshinoff, 2000), suprimen los radicales libres de forma dosis-dependiente, reduciendo la concentración de radicales libres en el humor acuoso (Takahashi *et al.*, 2002). Por otro lado, existen numerosos estudios que confirman la capacidad aceptora de radicales libres de los productos que contienen ácido hialurónico (AH) (Artola *et al.*, 1993a; Artola A *et al.*, 1993b; Holst *et al.*, 1993; Presti y Scott, 1994; Dua *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2001). El AH es capaz de competir con las células por la hidroxilación $\cdot\text{OH}$, ejerciendo un efecto protector frente al daño oxidativo celular. Esta capacidad protectora del AH estaría basada en una estructura organizativa de las moléculas de alto orden (terciaria) (Presti y Scott, 1994). Por otro lado, el AH puede actuar directamente sobre los macrófagos, inhibiendo la fagocitosis y la formación de

especies activas de oxígeno, disminuyendo también por este mecanismo el daño tisular (Suzuki y Yamaguchi, 1993).

Sin embargo, el efecto anti-radical libre del AH va seguido de una rotura de moléculas, reduciendo así el efecto protector del AH sobre las células (Greenwald RA y Moy WW, 1980; Deguine *et al.*, 1998). Como resultado, y para evitar esto, se han desarrollado nuevos VES que contienen aceptores de radicales libres. En nuestro estudio hemos evaluado el SVS18 que contiene manitol, un aceptor de radicales libres que se producen durante la facoemulsificación del núcleo. Así se proporciona una doble protección al endotelio y se mantienen las características físico-químicas del AH a lo largo de la cirugía. Esto es particularmente importante en pacientes con el núcleo duro en los que el tiempo de facoemulsificación es mayor, con lo que la producción de radicales libres aumenta.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que los VES que contienen una alta concentración de HS protegen mejor el endotelio frente a la agresión de los radicales libres (quizás debido a que son capaces de mantener mejor su estructura molecular). Otros autores han demostrado que los VES basados en HPMC tienen menor eficacia en la protección frente a radicales libres (Artola *et al.*, 1993), aunque posteriormente no se han confirmado estos resultados (Dua *et al.*, 2000).

Aparentemente el mecanismo por el que proporcionan protección al endotelio lo realizan principalmente formando una fina película que impediría el contacto de dichas estructuras con las sustancias y/o instrumentos que penetren en la cámara anterior, ya que dichas sustancias se adhieren a las estructuras oculares. Cabría dilucidar si estas sustancias protegen al endotelio corneal y al iris frente a los radicales libres mediante esta acción de "barrera", o bien si existe alguna reacción química con los radicales libres que, de alguna manera, los inactive. Parece más lógico pensar que la acción es puramente mecánica, ya que en nuestro modelo experimental extraemos el viscoelástico antes de inyectar el H₂O₂, por lo que sólo quedaría esa fina película de material viscoelástico que realizaría la función de "barrera mecánica impermeable", que sólo se pierde o deja de ser efectiva cuando empleamos concentraciones muy altas de H₂O₂ (100mM), que inutilizan la barrera. Sin embargo el HS ha demostrado que puede funcionar como antioxidante tanto

in vitro (Estudio I de la presente memoria) como *in vivo*, en tejidos oculares y otros muchos tejidos conectivos (líquido sinovial, cordón umbilical, etc). (Deguine *et al.*, 1998; Suzuki y Yamaguchi, 1993; Halliwell *et al.*, 1992; Dougados, 2000). Por lo tanto, creemos que puede existir de forma directa un efecto antioxidante del HS durante la acción del H₂O₂.

A concentraciones bajas (1 mM y 10 mM de H₂O₂), los grupos Healon y Viscoat no presentan diferencias significativas entre ellos. A concentraciones mayores de H₂O₂ (100 mM) se aprecia una diferencia entre Healon y Viscoat, siendo Viscoat superior a Healon. El SVS18 es superior al Healon y al Viscoat en todas las concentraciones de H₂O₂.

Cuando observamos el porcentaje de reducción media del daño endotelial para cada VES (tabla II.9 y figura II.12 de *Resultados*) a 1 mM de H₂O₂, el SVS18 produce una reducción del daño endotelial del 38,6% frente a un 16,2% y 24,4% de Healon y Viscoat respectivamente. A concentraciones de 10 mM de H₂O₂ esta reducción es de 43,1% para el SVS18, frente a un 24,5% y 26,5 % de Healon y Viscoat respectivamente.

A concentraciones altas (100 mM) el H₂O₂ produce un mayor daño endotelial, y pensamos que el efecto protector de los distintos viscoelásticos empleados es sobrepasado por la toxicidad oxidativa del H₂O₂, no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre los 3 viscoelásticos, aunque sí que existen estas diferencias significativas cuando los comparamos individualmente con el grupo control. Sin embargo, a esta concentración el porcentaje de reducción del daño endotelial es mucho menor que el obtenido a las otras concentraciones, confirmándose la pérdida del efecto protector.

En nuestro trabajo hemos observado que dicha función de protección la realizan aceptablemente todos los VES a concentraciones de hasta 10mM de H₂O₂, pero pierden parte de su eficacia protectora a concentraciones de 100mM de H₂O₂. Estos resultados son similares a los obtenidos por nuestro grupo en estudios previos, con diferentes VES (Artola, 1990). Pensamos que a concentraciones altas de H₂O₂ el potencial antioxidante de los VES queda saturado rápidamente, y los radicales libres destruyen más fácilmente el endotelio.

Nuestros resultados sugieren que la mayor parte del daño endotelial es debida a la formación de radicales libres (y no sólo al efecto térmico y mecánico antes mencionado). Esto sería consecuencia del daño celular que los radicales libres causan a la membrana celular. Además, estos resultados junto con los de otros autores (Shimada y Matsumura,

1987, Goldberg y Toole, 1987) apoyan el uso de VES con altas concentraciones de HS (en nuestro estudio, SVS18 y Viscoat) para una mejor protección del endotelio corneal durante la facoemulsificación, ya que se ha demostrado su mayor efecto protector frente al estrés oxidativo.

Por otro lado, el hecho de añadir sustancias con capacidad antioxidante, bien al suero de infusión (Rubowitz *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 1994; Holst *et al.*, 1993; Jousen *et al.*, 2000) o bien en la propia sustancia viscoelástica (manitol en el SVS18 de nuestro estudio) puede incrementar el efecto protector endotelial frente a la agresión producida por la facoemulsificación. Creemos por tanto que nuestros resultados abren una vía de investigación de nuevas sustancias viscoelásticas que, bien por sí mismas, o bien añadiendo nuevos componentes con capacidad aceptora de radicales libres, puedan mejorar el efecto de protección endotelial, sobre todo en los casos complicados de facoemulsificación en cataratas duras, o en presencia de distrofias endoteliales previas.





CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- El modelo experimental de lesión endotelial mediante H_2O_2 es válido para simular la lesión endotelial producida por los radicales libres durante la facoemulsificación y para la evaluación de la eficacia de distintos viscoelásticos en cuanto a su capacidad protectora del endotelio corneal. Se ha demostrado que existe una toxicidad endotelial producida por los radicales libres, y que esta toxicidad es dosis-dependiente.

2.- Se ha demostrado que las sustancias viscoelásticas empleadas en el estudio (Viscoat[®], Healon[®] y SVS18) presentan capacidad antioxidante en un modelo experimental “*in vitro*”.

3.- Las sustancias viscoelásticas empleadas (Viscoat[®], Healon[®] y SVS18) protegen al endotelio corneal frente a la acción de los radicales libres, en un modelo experimental “*in vivo*”, para todas las concentraciones de H_2O_2 empleadas en el estudio. Aquellas sustancias que contienen una mayor concentración de hialuronato sódico (Viscoat[®] y SVS18) presentan una mayor protección del endotelio. La adición a las sustancias viscoelásticas de aceptores de radicales libres (manitol en el SVS18) produce una mayor protección endotelial frente a los radicales libres.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J.M. y Cory, S. (1998)
The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.
Science **281**, 1322-1326.
- Al-Ghoul, K.J.; Novak, L.A. y Kuszak, J.R. (1998)
The structure of posterior subcapsular cataracts in the Royal College of Surgeons (RCS) rats.
Exp. Eye Res. **67**,163.
- Allen, A. y Jaffe, N.S. (1976)
Intraocular lenses: Cystoid macular edema-preliminary study.
Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. **81**, 133-134.
- Alpar, J.J. (1986)
Endothelial cell loss in different non-automated extracapsular nuclear evacuation techniques and the role of sodium hyaluronate.
Ophthalm. Surg. **17** (11), 719-23.
- Alpar, J.J. (1987)
Viscoelastic surgery.
Ann. Ophthalmol. **19**, 350.
- Altomare, A.; Vendemiale, G.; Grattagliano, I.; Angelini, P.; Micelli-Ferrari, T. y Cardia, L. (1995)
Human diabetic cataract: role of lipid peroxidation.
Diabete Metab. **21**, 173-179.
- American Academy of Ophthalmology Committee on Ophthalmic Procedures (1990)
Contrast sensitivity and glare testing in the evaluation of anterior segment disease: Ophthalmic procedures assessment.
Ophthalmology **97**, 1233.
- Anis, A. (1996)
Phacotmesis.
Curr. Opin. Ophthalmol. **7**, 49-52.
- Arffa, R.C. (1999)
Transtornos del endotelio.
En: Grayson: *Enfermedades de la córnea (4ªed)*. Madrid: Mosby, p.479.
- Arnold, P. (1992)
Study of acute intraoperative suprachoroidal hemorrhage.
J. Cataract Refract. Surg. **18**, 489-499.

Arshinoff, S. (1994)

The safety and performance of ophthalmic viscoelastics in cataract surgery and its complications.

En: Arshinoff, S. (ed): *Proceedings of the Sixth Annual National Ophthalmic Speakers Program*. Montreal: Medicopea International, p. 21.

Arshinoff, S. (2000)

New terminology: Ophthalmic viscosurgical devices.

J. Cataract Refract. Surg. **26**, 627-628.

Artola, A.; Alio, J.L.; Bellot, J.L. y Ruiz, J.M. (1993a)

Protective properties of viscoelastic substances (sodium hyaluronate and 2% hydroxymethylcellulose) against experimental free radical damage to the corneal endothelium.

Cornea **12** (2), 109-114.

Artola, A.; Alio, J.L.; Bellot, J.L. y Ruiz, J.M. (1993b)

Lipid peroxidation in the iris and its protection by means of viscoelastic substances (sodium hyaluronate and hydroxypropylmethylcellulose).

Ophthalmic Res. **25** (3), 172-176.

Artola, A. (1990)

Efectos tóxicos de los radicales libres sobre el endotelio corneal.

Tesis doctoral. Universidad de Alicante.

Augusteyn, R.C. (1981)

Protein modification in cataract: Possible oxidative mechanisms.

En: Duncan, G. (ed): *Mechanisms of Cataract Formation in the Human Lens*. London: Academic Press, pp 71-115.

Ayala, M.J.; Perez-Santonja, J.J.; Artola, A.; Claramonte, P. y Alio, J.L. (2001)

Laser in situ keratomileusis to correct residual myopia after cataract surgery

J. Refract. Surg. **17**(1), 12-16.

Aznar, J.; Santos, M.T.; Valles, J. y Sala, J. (1983)

Serum malondialdehyde-like material (MDA-LM) in acute myocardial infarction.

J. Clin. Pathol. **36**, 712-715.

Balazs, E.A. (1983)

Sodium hyaluronate and viscosurgery.

En: Miller, D. y Stegman, R. (eds): *Healon-A: Guide to its Use in Ophthalmic Surgery*. New York: John Wiley, p. 5.

Bhat, K.S. (1988)

Plasma calcium and trace metals in human subjects with mature cataract.

Nutrition Reports International, **37** (1), 157-163.

- Barraquer, J. (1958)
Enzymatic zonulysis: Contribution to the surgery of the crystalline lens (preliminary note).
Acta Ophthalmol. **36**, 803–806.
- Bazan, N.G. (1990)
Lipid Mediators in Eye Inflammation.
New Trends in Lipid Mediators Research **5**, 24.
- Beesly, R.D.M.; Olson, R.J. y Brady, S.E. (1986)
The effects of prolonged phacoemulsification time on the corneal endothelium.
Ann. Ophthalmol. **18**, 216-219.
- Belda, J.I.; Romá, J.; Vilela, C.; Puertas, J.P.; Díaz-Llopis, M.; Bosch-Morell, F. y Romero, F.J. (1999)
Serum vitamin E levels negatively correlate with severity of age-related macular degeneration.
Mech. Ageing Dev. **107**, 159-164.
- Belda, J.I., Puertas, F.J., Bosch-Morell F., Navea, A., Díaz-Llopis M. y Romero F.J. (1996)
Efficacy of different antioxidants to inhibit iron-induced lipid peroxidation in human retina homogenates.
IOVS **37**, S1047.
- Benedett, A., Comporti, M. y Esterbauer, H. (1980)
Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids.
Biochem. Biophys. Acta **620**, 281-296.
- Benhamou, N.; Massin, P.; Haouchine, B.; Audren, F.; Tadayoni, R. y Gaudric, A. (2003)
Intravitreal triamcinolone for refractory pseudophakic macular edema.
Am. J. Ophthalmol. **135**(2), 246-249.
- Bhuyan, K.C.; Bhuyan, D.K. y Podos, S.M. (1991)
Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit.
Free Radical Res. Comm. **12-13**, 609-620.
- Borbe, H.O. y Ulrich, H. (1989)
Thioctaire: Neue biochemische, pharmakologische und klinische Erkennttnisse zur Thioctsaure.
Frankfurt: Verlag, pp. 12-78.

- Borchman, D.; Paterson, C.A. y Delamere, N.A. (1989)
Oxidative inhibition of Ca²⁺-ATPase in the rabbit lens.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **30**,1633.
- Bothner, H. Y Wik, O. (1986)
Rheology of intraocular solutions.
Viscoelastic Materials **2**, 53.
- Bourne, W.M. y Kaufman, H.E. (1976)
Endotelial damage associated with intraocular lenses.
Am. J. Ophthalmol. **81**, 482.
- Braugher, J.M. y Hall, E.D. (1989)
Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation.
Free Radical Biol. Med. **6**, 289-301.
- Braugher, J.M. y Pegenzer, J.F. (1989)
The 21-aminosteroid inhibitors of lipid peroxidation: Reactions with lipid peroxy and phenoxy radicals.
Free Radical Biol. Med. **7**, 125-130.
- Broekhuysse, R.M. (1981)
Biochemistry of membranes.
En: Duncan, G. (ed): *Mechanisms of Cataract Formation in Human Lens*. London: Academic Press, pp. 151-191.
- Cadenas, E. (1989)
Biochemistry of oxygen toxicity.
Ann. Rev. Biochem. **58**, 79-110.
- Calvin, H.I.; Medvedovsky, C. y Worgul, B.V. (1986)
Near-total glutathione depletion and agespecific cataracts induced by buthionine sulfoximine in mice.
Science **233**, 553-555.
- Cameron, M.D.; Poyer, J.F. y Aust, S.D. (2001)
Identification of free radicals produced during phacoemulsification.
J. Cataract Refract. Surg. **27**, 463-470.
- Cerretti, D.P.; Kozlosky, C.J. y Mosley, B. (1992)
Molecular cloning of the interleukin 1 β converting enzyme.
Science **256**, 97-99.

- Chao, D.T. y Korsmeyer, S.J. (1998)
Bcl-2 family: regulators of cell death.
Ann. Rev. Imm. **16**, 395-419.
- Charlin, R. (1985)
Peripheral corneal edema after cataract extraction.
Am. J. Ophthalmol. **99**, 298.
- Cheng, A.C.; Pang, C.P. y Leung, A.T. (2000)
The association between cigarette smoking and ocular diseases.
Hong Kong Med. J. **6**(2), 195-202.
- Christen, W.G.; Glynn, R.J. y Hennekens, C.H. (1996)
Antioxidants and age-related eye disease: Current and future perspectives.
Ann. Epidemiol. **6**, 60.
- Cionni, R. y Osher, R. (1995)
Complications of phacoemulsification surgery,
En: Steinert, R. (ed): *Cataract Surgery: Techniques, Complications and Management*.
Philadelphia: WB Saunders, pp 327–340.
- Clark, W.L.; Kaiser, P.K. y Flynn, H.W. Jr (1999)
Treatment strategies and visual acuity outcomes in chronic postoperative
Propionibacterium acnes and endophthalmitis.
Ophthalmology **106**, 1665–1670.
- Cook, C.S. (2001)
Prenatal development of the eye and its adnexa.
En: Tasman, W. y Jaeger, E.A. (eds.) *Duane's Ophthalmology. Foundation. CD-Rom
edition. Vol 1*, chap 2. Philadelphia: LWW.
- Cook, C.S.; Ozaninic, V. y Jakobiec, F.A. (2001)
Prenatal development of the eye and its adnexa.
En: Tasman, W. y Jaeger, E.A. (eds.) *Duane's Ophthalmology. Foundation. CD-Rom
edition. Vol 1*, chap 2. Philadelphia: LWW.
- Cotlier, E. y Sharma, Y.R. (1981)
Aspirin and senile cataracts in rheumatoid arthritis.
Lancet **1**, 338.
- Csukas, S.C. y Green, K (1988)
Effects of intracameral hydrogen peroxide in the rabbit anterior chamber.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **29** (2), 335-339.

- Danielson, UH.; Esterbauer, H. y Mannervik, B. (1987)
Structure-activity relationship of 4-hydroxy-alkenals in the conjugation catalyzed by mammalian glutathione transferases.
Biochem. J. **247**, 707-713.
- Datiles, M.; Fukui, H. y Kuwabara, T. (1982)
Galactose cataract prevention with Sorbinil, an aldose reductase inhibitor: A light microscopic study.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **22**, 174.
- Daviel, J. (1753)
Sur une nouvelle methode de guerir la cataracte par l'extraction du cristallin [A method of curing cataract by extracting the crystalline lens].
Mem. Acad. Roy. Chir. (Paris) **2**, 337.
- Deguine, V.; Menasche, M.; Fraisse, L.; Pouliquen, Y. y Robert, L. (1998)
Free radical depolymerization of hyaluronan by maillard reaction products. Role in liquefaction of aging vitreous.
Int. J. Biol. Macromol. **22**, 17-22.
- Delamere, N.A.; Paterson, C.A. y Cotton, T.R. (1983)
Lens cation transport and permeability changes following exposure to hydrogen peroxide.
Exp. Eye Res. **37**, 45.
- Denlinger, J.L. y Balazs, E.A. (1980)
Replacement of the liquid vitreous with sodium hyaluronate in monkeys. I. Short-term evaluation.
Exp. Eye Res. **31**, 81.
- Diamond, J.G. y Kaplan, H.J. (1979)
Uveitis: Effect of vitrectomy combined with lensectomy.
Ophthalmology **86**, 1320.
- Díaz-Llopis, M.; Chipont, E.; Bosch-Morell, F.; Puertas, F. J.; Hermenegildo, C.; Navea, A. y Romero, F. J. (1993)
Efficacy of Ebselen (PZ-51) in experimental endotoxin-induced anterior uveitis.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **34**, S1050.
- Diaz-Valle, D.; Benitez del Castillo Sánchez, J.M.; Castillo, A.; Sayagues, O. y Moriche, M. (1998)
Endotelial damage with cataract surgery techniques.
J. Refract. Surg. **24**, 951-955.

Dick, H.B. y Schwenn, O. (2000)
Viscoelastics in Ophthalmic Surgery.
Heidelberg: Springer-Verlag, p. 34.

DiMattio, J. (1989)
Active transport of ascorbic acid into lens epithelium of the rat.
Exp. Eye Res. **49**, 873.

Diplock, A.T. (1985)
Fat soluble vitamins.
En: Heinemann (ed.). London: London, p. 319.

Dodick, J. y Christiansen, J. (1991)
Experimental studies on the development and propagation of shock waves created by the interaction of short Nd:YAG laser pulses with a titanium target: Possible implications for Nd:YAG laser phacolysis of the cataractous human lens.
J. Cataract Refract. Surg. **17**, 794–797.

Doly, M.; Droy-Lefaix, M.T. y Braquet, P. (1992)
Oxidative stress in diabetic retina.
EXS **62**, 299-307.

Dorey, C.K.; Khour, G.G; Synilita, L.A; Curran, S.A. y Weiter, J.J. (1989)
Superoxide production by porcine retinal pigment epithelium in vitro.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **30** (6),320-325.

Dougados, M. (2000)
Sodium hyaluronate therapy in osteoarthritis: arguments for a potencial beneficial structural effect.
Semin. Arthritis Rheum. **30**, 19-25.

Dua, H.S.; Benedetto, D.A. y Azuara-Blanco (2000)
A Protection of corneal endothelium from irrigation damage: a comparison of sodium hyaluronate and hydroxypropylmethylcellulose.
Eye **14** (1),88-92.

Duker, J.; Belmont, J. y Benson, W. (1991)
Inadvertent globe perforation during retrobulbar and peribulbar anesthesia: Patient characteristics, surgical management and visual outcome.
Ophthalmology **98**, 519–526.

Duncan, G. y Bushell, A.R. (1979)
Relationships between colour, sodium and protein content in individual senile cataractous lenses.
Ophthalmic Res. **11**, 397.

- Edelhauser, H.; Gonnering, R. y Van Horn, D. (1978)
Intraocular irrigation solutions. A comparative study of BSS plus and lactated Ringer's solution.
Arch. Ophthalmol. **96**, 516-520.
- Edge, R. y Navon, S. (1999)
Scleral perforation during retrobulbar and peribulbar anesthesia: Risk factors and outcome in 50,000 consecutive injections.
J. Cataract Refract. Surg. **25**, 1237-1244.
- Eggeling, P.; Pleyer, U.; Hartmann, C. y Rieck, P.W. (2000)
Corneal endothelial toxicity of different lidocaine concentrations.
J. Cataract Refract. Surg. **26**(9), 1403-1408.
- Epstein, D.L. y Kinoshita, J.H. (1970)
The effect of diamide on lens glutathione and lens membrane function.
Invest. Ophthalmol. **9**, 629.
- Ernster, L. (1986)
Oxygen as an environmental poison.
Chemica Scripta **26**, 525-534.
- Esterbauer, H.; Jörgschaer, R. y Zollner, H. (1991)
Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.
Free Radic. Biol. Med. **11**, 81-128.
- Esterbauer, H. (1993)
Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.
Am. J. Clin. Nutr. **57**, 779S-785S.
- Fahey, R. C, Buschbacher, R.M. y Newton, G.L. (1987)
The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms.
J. Mol. Evol. **25**, 81-88.
- Fecondo, J.V. y Augusteyn, R.C. (1983)
Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in human cataratous lenses.
Exp. Eye Res. **36**, 15-23.
- Flaherty, J.T. y Weisfeldt, M.L. (1988)
Reperfusion injury.
Free Radical Biol. Med. **5**, 409-419.

- Fridovich, I. (1978)
The biology of the oxygen radicals. The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutase provide an important defense.
Science **201**, 875-880.
- Garner, W.H.; Garner, M. y Spector, A. (1983)
H₂O₂-induced uncoupling of bovine lens Na⁺,K⁺-ATPase.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) **80**, 2044.
- Giblin, F.J.; Mc Ready, J.; Kodama, T. y Reddy, V. (1984)
A direct correlation between the levels of ascorbic acid and H₂O₂ in aqueous humor.
Exp. Eye Res. **38**, 87-93.
- Gillow, T.; Scotcher, S. y Deutsch, J. (1999)
Efficacy of supplementary intracameral lidocaine in routine phacoemulsification under topical anesthesia.
Ophthalmology **106**, 2173–2177.
- Gills, J.; Cherchio, M. y Raanan, M. (1997)
Unpreserved lidocaine to control discomfort during cataract surgery using topical anesthesia.
J. Cataract Refract. Surg. **23**, 545–550.
- Ghosh, P. (1994)
The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid.
Clin. Exp. Rheumatol. **12**, 75-82.
- Gimbel, H. (1990)
Posterior capsule tears using phacoemulsification: Causes, prevention and management.
Eur. J. Implant. Refract. Surg. **10**, 63–69.
- Goldberg, R. y Toole, B. (1987)
Hyaluronate inhibition of cell proliferation
Arthritis and Rheumatism **30**, 769-777.
- Gomez, S.; Herreras, J.M.; Merayo, J.; García, M.; Argüeso, P. y Cuevas, M.D. (2001)
Effect of hyaluronic acid on corneal haze in a photorefractive experimental model.
J. Refract. Surg. **17**, 549-554.
- Goosey, J.D.; Tuan, W.M. y García, C.H. (1984)
A lipid peroxidative mechanism for posterior subcapsular cataract formation in the rabbit. A possible model for cataract formation in tapetoretinal diseases.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **25**, 608-612.

Green, D.R. y Reed, J.C. (1998)

Mitochondria and apoptosis.

Science **281**, 1309-1312.

Greenwald, R.A. y Moy, W.W. (1980)

Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid.

Arthritis and Rheumatism **23**, 455-463.

Guyton, D. (1987)

Preoperative visual acuity evaluation.

Int. Ophthalmol. Clin. **27**, 140.

Habig, W.H. (1983)

Glutathione S-transferases: versatile enzymes of detoxification.

En: Nygerard, O.F. y Simic, M.G. (eds.). *Radioprotectors and anticarcinogens*. New York: Academic Press, pp.169-190.

Hall, E.D. y Braughler, J.M. (1989)

Central nervous system trauma and stroke. II. Physiological and pharmacological evidence for involvement of oxygen radicals and lipid peroxidation.

Free Radic. Biol. Med. **6**, 303-313.

Hall, E.D.; Braughler, J.M.; Yonkers P.A.; Smith S.L.; Linseman, K.L.; Means, E.D.; Scherch, H.M.; von voigtlander, P.E.; Lahti, R.A. y Jon jacobs, E. (1991)

U-78517F: A potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia.

J. Pharmacol. Exp. Ther. **258**, 688-694.

Halliwell, B. y Gutteridge, J M.C. (1989)

Free Radicals in Biology and Medicine.

Oxford: Clarendon Press, pp.23-90.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. y Cross, C. (1992)

Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? Review article.

J. Lab. Clin. Med. **119** (6), 598-620.

Hartmann, C.H. y Rieck, P. (1989)

A new test for endothelial viability. The Janus green photometry technique.

Arch. Ophthalmol. **107**, 1511-15.

Hartmann, C.H.; Rieck, P.A; Pharmakakis, L. y Bergmann, L. (1989)

Un nouveau test in vitro de la viabilité endotheliale.

Ophtalmologie. **3**, 16-8.

- Hayashi, K.; Hayashi, H.; Nakao, F.; Hayashi, F. (1996)
Risk factors for corneal endothelium injury during phacoemulsification.
J Cataract Refract. Surg. **22**, 1079-84.
- Hermenegildo, C.; Raya, A.; Romá, J. y Romero, F. J. (1993)
Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels.
Neurochem. Res. **18**, 893-896.
- Higueras, V.; Raya, A.; Rodrigo, J.M.; Serra, M.A.; Roma, J. y Romero, F.J. (1994)
Interferon decreases serum lipid peroxidation products of hepatitis C patients.
Free Radic. Biol. Med. **16**, 131-133.
- Hiller, R.; Sperduto, R.D. y Ederer, F. (1986)
Epidemiologic associations with nuclear, cortical and posterior subcapsular cataracts.
Am. J. Epidemiol. **124**, 916.
- Hitchings, R.A. y Chisholm, I.H. (1975)
Incidence of aphakic macular edema: A prospective study.
Br. J. Ophthalmol. **59**, 444-450.
- Hockenbery, D.M.; Oltvai, Z.N.; Yin, X-M.; Millman, C.L. y Korsmeyer, S.J. (1993)
Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis.
Cell **75**: 241-251.
- Hockwin, O. y Ohrloff, C. (1981)
Enzymes in normal, aging and cataractous lenses.
In: Bloemendal, H. (ed): *Molecular and Cellular Biology of the Eye Lens*. New York: John Wiley & Sons, pp 367-414.
- Hockwin, O. y Schmitt, C. (1990)
The worth of anti-cataract drugs.
Fortschr. Ophthalmol. **87**, S9-S13.
- Hoenders, H.J. y Bloemendal, H. (1981)
Aging of the lens.
In: Bloemendal, H. (ed.): *Molecular and Cellular Biology of the Lens*. New York: John Wiley & Sons. pp 279-326.
- Holst, A.; Rolfsen, W.; Svensson, B.; Ollinger, K. y Lundgren, B. (1993)
Formation of free radicals during phacoemulsification.
Curr. Eye Res. **12**, 359-365.

- Hull, D.S.; Green, K.; Boyd, M. y Wynn, H.R. (1977)
Corneal endothelium bicarbonate transport and the effect of carbonic anhydrase inhibitors on endothelial permeability fluxes and corneal thickness.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **16**, 883.
- Hull, D.S (1981)
Hydrogen peroxide and corneal endothelium.
Acta Ophthalmologica **5**, 409-421.
- Hull, D.S.; Green, K.; Thomas, L. y Alderman, N. (1984)
Hydrogen peroxide-mediated corneal endothelial damage: induction by oxygen free radical,
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **2**, 1246-1253.
- Hull, D.S. (1990)
Oxygen free radicals and corneal endothelium.
Trans. Am. Ophthalmol. Soc. **8**, 463-511.
- Jaffe, N.S.; Jaffe, M.S. y Jaffe, G.F. (1989)
Cataract surgery and its complications (5th ed.)
St. Louis: Mosby, pp 249-252.
- Jaffe, N.S. (1999)
Thirty years of intraocular lens implantation: The way it was and the way it is.
J. Cataract Refract. Surg. **25**, 455-459.
- Jamieson, D.; Chance, B.; Cadenas, E. y Boveris, A. (1986)
The relation of free radical production to hyperoxia.
Ann. Rev. Physiol. **48**, 703-719.
- Janero, D. R. (1990)
Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.
Free Radical Biol. Med. **9**, 515-540.
- Jedziniak, J.A.; Nicoli, D.F. y Baram, H. (1978)
Quantitative verification of the existence of high-molecular-weight protein aggregates in the intact normal human lens by light-scattering spectroscopy.
Invest. Ophthalmol. Visual Sci. **17**, 51.
- Jensson, H.; Guthenberg, C.; Ålin, P. y Mannervik, B. (1986)
Rat glutathione transferase 8-8 an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxy-alk-2-enals.
FEBS Lett. **203**, 207-209.

- Johnson S.H.; Kratz, R.P. y Olson, P.F. (1984)
Iris transillumination defect and microhyphema syndrome.
Am. Intraocular Implant. Soc. J. **10**, 425.
- Joussen, A.M.; Barth, U.; Cubuk, H. y Koch, H. (2000)
Effect of irrigating solution and irrigation temperature on the cornea and pupil during phacoemulsification.
J. Cataract Refract. Surg. **26**, 392-397.
- Kador, P.F. (1983)
Overview of the current attempts toward the medical treatment of cataract.
Ophthalmology **90**, 352.
- Kleiman, N.J. y Norgul, B.V. (2001)
Lens.
En: Tasman, W. y Jaeger, E.A. (eds.) *Duane's Ophthalmology. Foundation. CD-Rom edition.* Vol 1, chap 15. Philadelphia: LWW.
- Kappus, H. y Sies, H. (1981)
Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation.
Experientia **37**, 1233-1241.
- Kaye, G. (1969)
Stereologic measurement of cell volume fraction of rabbit corneal stroma.
Arch. Ophthalmol. **82**, 792.
- Kelman, C. (1967)
Phaco-emulsification and aspiration, a new technique of cataract removal: A preliminary report.
Am. J. Ophthalmol. **64**, 23-35.
- Kelman, C. (1994)
The history and development of phacoemulsification.
Int. Ophthalmol. Clin. **34**, 1-12.
- Kerr J.F.; Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972)
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer **26**, 239-257.
- Kim, E.K.; Geroski, D.H. y Holley, G.P. (1992)
Corneal endothelial cytoskeleton changes in F-actin with age, diabetes, and following cytochalasin.
Am. J. Ophthalmol. **114**, 329.

- Kinoshita, J.H. (1964)
Selected topics in ophthalmic biochemistry.
Arch. Ophthalmol. **72**, 554.
- Kluck, R.M.; Bossy-Weltzel, E.; Green, D.R. y Newmeyer, D.D. (1997)
The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.
Science **275**, 1132-1136.
- Klyce, S.D. (1981)
Stromal lactate accumulation can account for corneal edema osmotically following epithelial hypoxia in the rabbit.
J. Physiol. **321**,49.
- Kosower, N. S. y Kosower, E. M. (1978)
The glutathione status of cells.
Int. Rev. Cytol. **54**, 109-160.
- Krawicz, T. (1961)
Intracapsular extraction of intumescent cataract by application of low temperature.
Br. J. Ophthalmol. **4**, 279–283.
- Largilliere, C. y Melancon, S.B. (1988)
Free malondialdehyde determination in human-plasma by high-performance liquid-chromatography.
Anal. Biochem. **170**, 123-126.
- Lennon, S.V.; Martin, S. y Cotter, T.G. (1991)
Dose dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli.
Cell Prolif. **25**, 203-204.
- Lerman, S. (1980)
Radiant Energy and the Eye.
New York: Macmillian, p. 69.
- Leske, M.C, Chylack, L.T. y Wu, S.Y. (1991)
The lens opacities case-control study: Risk factors for cataract.
Arch. Ophthalmol. **109**, 244.
- Lesmasters, J.L.; DiFuisseppi, J.; Nieminen, A.L. y Herman, B. (1989)
Blebbing, free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes.
Nature **325**, 78-81.

- Linseman, K.L.; Larson, P.; Braugher, J.M. y McCall, J.M. (1993)
Iron-initiated tissue oxidation: lipid peroxidation, vitamin E destruction and protein thiol oxidation.
Biochemical Pharmacology **45**, 1477-1482.
- Lou, M.F.; Xu, G.T. y Zigler, J.S. Jr (1996)
Inhibition of naphthalene cataract in rats by aldose reductase inhibitors.
Curr. Eye Res. **15**, 423.
- Madsen, K.; Schenholm, M.; Jahnke, G. y Tengblad, A. (1989)
Hyaluronate binding to intact corneas and cultured endothelial cells.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **30**, 2132-7.
- Mamalis, N. (2003)
Is smaller better?
J. Cataract Refract. Surg. **29**, 1049-1050.
- Mathias, R.T.; Rae, J.L. y Baldo, G.J. (1997)
Physiological properties of the normal lens.
Physiol. Rev. **77**, 21.
- Martínez, M.C.; Bosch-Morell, F.; Raya, A.; Romá, J.; Aldasoro, M.; Vila, J.; Lluch, S. y Romero, F. J. (1994)
4-Hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, induces relaxation of human cerebral arteries.
J. Cerebral Blood Flow Metab. **14**, 693-696.
- Mazzocco, TR.; Rajacich, G.M.; Epstein, E. (1986)
Soft Implant Lenses in Cataract Surgery.
Thorofare, NJ: Slack Inc., p. 60.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969)
Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein).
J. Biol. Chem. **244**, 6049-6055.
- McCord, J. M. (1985)
Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury.
N. Eng. J. Med. **312**, 159-163.
- McCord, J. M. (1987)
Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation.
Fed. Proc. **46**, 2402-2406.
- McCarty, C.A. y Taylor H.R. (1996)
Recent developments in vision research: Light damage in cataract.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **37**, 1720-1723.

Meister, A. y Anderson, M. E. (1983)
Glutathione.
Annu. Rev. Biochem. **52**, 711-760.

Merin, S. (1974)
Congenital cataracts.
In: Goldberg, M.F. (ed): *Genetic, Metabolic Eye Disease*. Boston: Little, Brown & Co.,
p. 337.

Michels, M. y Sternberg, P. (1990)
Operating microscope-induced retinal phototoxicity: pathophysiology, clinical
manifestations and prevention.
Surv. Ophthalmol. **34**, 237-252.

Miquel, J.; Quintanilha, A. T. y Weber, H. (1989)
CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine.
Boca Ratón, FL: CRC Press, p 23.

Mishima, S. (1968)
Corneal thickness.
Surv. Ophthalmol. **13**, 57.

Nagamatsu, M.; Nickander, K.; Schmelzer, J.D.; Raya, A.; Wittrock, D.A.; Tritschler,
H. y Low, P.A. (1995)
Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal
nerve conduction in experimental diabetic neuropathy.
Diabetes Care **18**, 1160-1167.

Nakamura, M.; Nakano T. y Hikida, M. (1994)
Effects of oxidized glutathione and reduced glutathione on the barrier function of the
corneal endothelium.
Cornea **13**, 493-495.

Natarajan, V.; Scribner, W.M. y Taher, M.M. (1993)
4-Hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in
vascular endothelial cells.
Free Radical Biol. Med. **15**, 365-375.

Navea, A.; Puertas, F. J.; Cortés, V.; Díaz-Llopis, M. y Romero, F. J. (1992)
El sistema glutatión y otros sistemas antioxidantes. Su relación con el desarrollo de
cataratas. 2. Correlación anatomopatológica y bioquímica de los grados de madurez de
la catarata senil y diabética.
St. Ophthal. **11**, 119-124.

- Nelson, J.S. (1980)
Vitamin E.
En: Machlin, L.J. (ed.) *A Comprehensive Treatise*. New York: Marcel Dekker, pp.397-427.
- Nirankari, V.S.; Karesh, J. y Lakhanpal, V. (1981)
Pseudo-vitreous hemorrhage: A new intraoperative complication of sodium hyaluronate.
Ophthalmic Surg. **12**, 503.
- Nirankari, V.S.; Shanton, D.V.; Lakhangar, V. y Richards, R.D. (1981)
Superoxide radical scavenging agents in treatment of alkali burns. An experimental study.
Arch. Ophthalmol. **99**, 886-887.
- Ohrloff, C. y Hockwin, O. (1986)
Superoxide dismutase (SOD) in normal and cataratous human lenses.
En: Courtois, Y.; Facheux, B.; Knook, D.L. y Treton, J.A. (eds). *Modern trends in aging research*. Paris: INSERM-EURAGE, pp: 365-371.
- Oltvai, Z.N.; Milliman, C.L. y Korsmeyer, S.J. (1993)
Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.
Cell **74**, 609-619.
- Osher, R. (1994)
Clear lens extraction.
J. Cataract Refract. Surg. **20**, 674.
- Parel, J.; Gelender, H. y Trefers, W. (1986)
Phaco-Ersatz: Cataract surgery designed to preserve accommodation.
Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. **224**, 165-173.
- Pearce, J.L. (1977)
Experience with 194 posterior chamber lenses in 20 months.
Trans. Ophthalmol. Soc. (UK) **97**, 258-264.
- Petit, P.X.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Mignotte, B. y Kroemer, G. (1996)
Mitochondria and programmed cell death: back to the future.
FEBS Lett. **396**, 7-13.
- Pharmakakis, L.; Hartmann, Ch.; Hilgers, R.D.; Bergmann, L. y Koliopoulos, I. (1995)
Correlation study of two methods for evaluating corneal endothelial damage in vitro: The Janus Green photometry technique versus cell counting.
Ophthalmic Res. **27**, 67-73.

- Piest, K.L.; Kincaid, M.C. y Tetz, M.R. (1987)
Localized endophthalmitis: A newly described cause of the so-called toxic lens syndrome.
J. Cataract Refract. Surg. **13**, 498–509.
- Presti, D. y Scott, J.E. (1994)
Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl (OH.) radicals is dependent on hyaluronan molecular mass.
Cell Biochem. Funct. **12**, 281-288.
- Price, F. Jr. y Whitson, W. (1994)
Suprachoroidal hemorrhage in penetrating keratoplasty.
Ophthalmic Surg. **25**, 521–525
- Prince, J.H. (1964)
Rabbit in eye Research
Springfield, IL: Charles C. Thomas Publisher, Ltd., pp 4-98.
- Puckett, T.R.; Peele, K.A.; Howard, R.S y Kramer, K.K. (1995)
Intraocular irrigating solutions: a randomized clinical trial of balanced salt solution plus and dextrosa bicarbonate lactated Ringer's solution.
Ophthalmology **102**, 291-296.
- Pulse, K.; Brand, R.; Cohen, S. y Guillon, M. (1990)
Hypoxic effects on corneal morphology and function.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **31**, 1542.
- Reed, J.W. (1992)
Clinical and pathologic findings of aphakic peripheral corneal edema: Brown-Mc Lean syndrome.
Cornea **11**, 577.
- Reed, J.C. (1994)
Bcl-2 and the regulation of programmed cell death.
J. Cell Bio. **124**: 1-6.
- Reddy, V.N, Giblin, F.J. y Matsuda, H. (1980)
Defense system of the lens against oxidative damage.
En: Srivasta, S.K. (ed.): *Red blood cell and lens metabolism. Developments in biochemistry*, **9**, North-Holland: Elsevier, pp.: 139-154.
- Reddy, V.N. y Giblin, F.J. (1984)
Metabolism and function of glutathione in the lens.
En: Nugent, J y Whelan, J. (eds.): *Human Cataract Formation, Ciba Foundation Symposium* **106**, London: Pitman, pp 65-87.

- Richard, M.J.; Guiraud, P.; Meo, J. y Favier, A. (1992)
High performance liquid chromatography separation of malondialdehyde thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cell) using a commercially available reagent.
J. Chromatogr. **577**, 9-18.
- Riesz, P. y Kondo, T. (1992)
Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications.
Free Radic. Biol. Med. **13**, 247-270.
- Ridley, H. (1953)
Further observations on intraocular acrylic lenses in cataract surgery.
Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. **57**, 98-106.
- Riley, M.V.; Ng, M.C.; Yates, E.M.; Soppet, D.R. y Whitehart, D.R. (1980)
Oxidized glutathione in the corneal endothelium
Exp. Eye Res. **30**, 607-609.
- Riley, M.V. (1980)
Relation of intracellular levels and redox state of glutathione to endothelial function in the rabbit cornea.
Exp Eye Res. **30**, 11-17.
- Riley, M.V. (1982)
Transport of ions and metabolites across the corneal endothelium.
In: McDevitt, D.S. (eds). *Cell Biology of the Eye*. New York: Academic Press, pp 53-95.
- Riley, M.V. y Giblin, F.J. (1983)
Toxic effects of hydrogen peroxide on corneal endothelium.
Curr. Eye Res. **2**, 451-458.
- Rodríguez-Galietero, A.; Belda, J.I.; Quijada, A.; Muñoz, G.; Bosch, F.; Romero, F.J.; Díaz-Llopis, M. (1997)
Endothelial protective effect of the synthetic antioxidant L-NAME in a model of endotoxin-induced uveitis.
IOVS **38**, S189.
- Rogers, K.M. y Augusteyn, R.C. (1978)
Glutathione reductase in normal and cataractous human lenses.
Exp. Eye Res. **27**, 719-721.

- Romero, F.J.; Almar, M.M.; Gath, I.; Thomas, H. y Oesch, F. (1988)
Organ distribution of some glutathione-related enzymatic activities in the rat. Ubiquity of GSH S-transferases detoxifying 4-hydroxy-alkenals.
International Symposium on Oxygen Free Radicals: Biochemical, Physiological and Clinical Aspects, Buenos Aires, **Abst. 9**.
- Romero, F.J.; Puertas, F.J.; Hermenegildo, C.; Monsalve, E.; Segura-Aguilar, J.; Menezo, J.L.; Navea, A. y Díaz, M. (1989)
El sistema glutatión y otros sistemas antioxidantes: su relación con el desarrollo de cataratas. 1. Contenido de glutatión y actividad de enzimas relacionados en humor acuoso y cristalino de enfermo cataratoso.
Arch. Soc. Esp. Oftalm. **2**, 75-82.
- Romero, F.J. y Galaris, D. (1990)
Compartmentation of glutathione in subcellular pools.
En: Viña, J. (ed). *Handbook of Glutathione: Metabolism and physiological functions*. Boca Raton, FL: CRC press, pp. 29-38.
- Romero, F.J., Romero, M.J., Bosch-Morell, F., Martínez, M.C., Medina, P. y Lluch, S. (1997)
4-Hydroxynonenal-induced relaxation of human mesenteric arteries.
Free Radical Biol. Med. **23**, 521-523.
- Rossi, M.A.; Fidale, F.; Garramone, A.; Esterbauer, H. y Dianzani, M.U. (1990)
Effect of 4-hydroxyalkenals on hepatic phosphatidylinositol-4,5-biphosphate-phospholipase C.
Biochem. Pharmacol. **39**, 1715-1719.
- Rubin, G. (1988)
Reliability and sensitivity of clinical contrast sensitivity tests.
Clin. Vis. Sci. **2**, 169.
- Rubowitz, A.; Assia, E.I.; Rosner, M. y Topaz, M. (2003)
Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **44**, 1866-1870.
- Schramm, H.; Robertson, L.W. y Oesch, F. (1985)
Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat.
Biochem. Pharmacol. **34**, 3735-3739.
- Schendel, S.; Montal, M. y Reed, J.C. (1998)
Bcl-2 family proteins as ion channels.
Cell Death Diff. **5**, 372-380.

- Schubert, H.; Denlinger, J.L. y Galzs, E.A. (1981)
Na-hyaluronate injected into the anterior chamber of the owl monkey: Effect on IOP and range of disappearance.
IOVS **9**, S118.
- Selley, M.L., Bourne, D.J., Bartlett, M.R., Tymms, K.E., Brook, A.S., Duffield, A. M. y Ardlie, N.G. (1992)
Occurrence of (E)-4-Hydroxy-2-nonenal in plasma and sinovial fluid of patients
Ann. Rheumatic Dis. **51**, 481-484
- Sevanian, A. y Hochstein, P. (1985)
Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems.
Ann. Rev. Nutr. **5**, 365-390.
- Sharma, A. y Coles, W.H. (1989)
Kinetics of corneal epithelial maintenance and graft loss.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **3**, 1962.
- Shearing, S. (1978)
A practical posterior chamber lens.
CLAO J **4**, 114-117.
- Shimada, E. y Matsumura, G. (1975)
Viscosity and molecular weight of hyaluronic acids.
J. Biochem. **78**, 513-517.
- Shimmelpfennig, B.H. (1984)
Direct and indirect determination of nonuniform cell density distribution in human corneal endothelium.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **25**, 223-229.
- Shimmura, S.; Tsubota, K.; Oguchi, Y.; Fukumura, D.; Suematsu, M. y Tsuchiya, M. (1992)
Oxiradical-dependent photoemission induced by a phacoemulsification probe.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **33**, 2904-2907.
- Siems, W.G.; Hapner, S.J. y VanKuijk, F.J.G.M. (1996)
4-Hydroxynonenal inhibits Na⁺-K⁺-ATPase.
Free Radical Biol. Med. **20**, 215-223.
- Sies, H. (1985)
Oxidative stress: introductory remarks.
London: Academic Press, pp. 1-8.

- Sies, H. (1991)
Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants.
London: Academic Press, p. 98.
- Smolek, M.K. y Klyce, S.D. (2001)
Cornea
En: Tasman, W. y Jaeger, E.A. (eds.) *Duane's Ophthalmology. Foundation. CD-Rom edition*. Vol 1, chap 8. Philadelphia: LWW.
- Snyder, M.; Cionni, R. y Osher, R. (1998)
Management of intraoperative complication.
En: Gills, J. (ed). *Cataract Surgery: The State of the Art*. Thorofare, NJ: Slack Inc., pp 139–156.
- Speaker, M.; Gueirleio, P. y Riet, J. (1991)
A case controlled study of risk factors for intraoperative surrachoroidal expulsive hemorrhage.
Ophthalmology **98**, 202–210.
- Spector, A. (1982)
Aging of the lens and cataract formation.
En: Sekuler, R., Cline, D., Dismukes, K. (eds). *Aging and Human Visual Function*. New York: Alan R. Liss, pp: 27-43.
- Spector, A. (1984)
The search for a solution to senile cataracts--Proctor lecture.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **25**, 130.
- Spector, A. (1985)
Aspects of the biochemistry of cataract.
En: Maisel, H. (ed). *The Ocular Lens: Structure, Function, and Pathology*. New York: Marcel Dekker. pp: 405-438.
- Spector, A. y Garner, W.H. (1981)
Hydrogen peroxide and human cataract.
Exp. Eye Res. **33**, 673-681.
- Stark, W. y Streeten, B. (1984)
The anterior capsulotomy of extracapsular cataract extraction.
Ophthalmic Surg. **15**, 911–917.
- Steller, H. (1995)
Mechanisms and genes of cellular suicide.
Science **267**, 1445-62.

- Stewart-Dehaan, P.J.; Dzialoszynski, J. y Trevithick, J.R. (1999)
Modeling cortical cataractogenesis XXIV: Uptake by the lens of glutathione injected into the rat.
Mol. Vis. **5**, 37.
- Stiemke, M.M.; McCartney, M.P.; Cantu-Crouch D. y Edelhauser, H.F. (1991a)
Maturation of the corneal endothelial tight junction.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **3**, 2757.
- Stiemke, M.M.; Edelhauser, H.F. y Geroski, D.H. (1991b)
The developing corneal endothelium: Correlation of morphology, hydration, and Na/K ATPase pump site density.
Curr. Eye. Res. **10**, 145.
- Sugar, A. y Schertzer, R. (1999)
Clinical course of phacomulsification wound burns.
J Cataract Refract. Surg. **25**, 688–692.
- Suzuki, Y. y Yamaguchi, T. (1993)
Effects of hyaluronic acid on macrophage phagocytosis and active oxygen release.
Agents Actions **38**, 32-37.
- Szweda, L.I.; Uchida, K.; Tsai, L. y Stadtman, E.R. (1993)
Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Selective modification of an active-site lysine.
J. Biol. Chem. **268**, 3342-3347.
- Takahashi, H.; Sakamoto, A.; Takahashi, R.; Ohmura, T.; Shimmura, S. y Ohara, K. (2002)
Free radicals in phacoemulsification and aspiration procedures.
Arch. Ophthalmol. **120**, 1348-1352.
- Taniguchi, N.; Pickett, C.B. y Griffith, O.W. (1993)
Oxy radicals and antioxidative responses in cancer.
Cancer Res. **53**, 3207-3210.
- Taylor, A. y Hobbs, M. (2001)
200' assesement of nutricional influences on risk for cataract.
Nutrition **17**, 845-57.
- Taylor, H.R.; West, S.K. y Rosenthal, F.S. (1988)
Effect of ultraviolet radiation on cataract formation.
N. Engl. J. Med. **31**, 1429.

- Tetz, M.; O'Morche, D. y Gwin, T. (1988)
Posterior capsular opacification and intraocular lens decentration. Part II: Experimental findings on a prototype circular intraocular lens design.
J. Cataract Refract. Surg. **14**, 614–623.
- Thoft, R.A. y Friend, J. (1983)
The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **24**, 1442.
- Thylefors, B.; Négrel, A.D.; Pararajasegaram, R. y Dadzie, K.Y. (1994)
Available data on blindness. WHO programme for the prevention of blindness.
Geneva, Switzzeland: WHO.
- Topaz, M.; Motiei, M.; Assia, E.; Meyerstein, D.; Meyerstein, N. y Gedanken, A. (2002)
Acoustic cavitation in phacoemulsification: chemical effects, modes of action and cavitation index.
Ultrasound Med. Biol. **28**, 775-84.
- Uchida, K. y Stadtman, E.R. (1992)
Modification of Histidine residues in proteins by reaction with 4-Hydroxynonenal.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **89**, 4544-4548.
- Ursini, F.; Maiorino, M.; Valente, M.; Ferri, L. y Gregolin, C. (1982)
Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides.
Biochem. Biophys. Acta **710**, 197-211.
- Van Der Kraaij, A.M.M.; de Jonge, H.R.; Esterbauer, H.; de Vente, J.; Steinbusch, H. W.M. y Foster, J.F. (1990)
Cumene hydroperoxide, an agent inducing lipid peroxidation, and 4-hydroxy-2,3-nonenal, a peroxidation product, cause coronary vasodilatation in perfused rat hearts by a cyclic nucleotide independent mechanism.
Cardiovasc. Res. **24**, 144-150.
- Van Heyningen, R. (1959)
Formation of polyols by the lens of the rat with sugar cataract.
Nature **184**, 194.
- Van Vleet, J.F, Boon, G.D. y Ferrans, V.J. (1981)
Induction of lesions of selenium-vit E deficiency in weanling swine fed, silver, cobalt, tellurium, zinc, cadmium and vanadium.
Am. J. Vet. Res. **42**, 789-799.

- Varma, S.D. (1987)
Ascorbic acid and the eye with special reference to the lens.
En: Burns J J, Rivers JM, Machlin LJ (eds). *Third Conference on Vitamin C*. Annals of the New York Academy of Sciences. New York: New York Academy of Sciences, pp: 280-306.
- Ventura, A.C.; Walty, R. y Bohnke, M. (2001)
Corneal thickness and endothelial density before and after cataract surgery.
Br. J. Ophthalmol. **85**, 18-20.
- Verzella, F. (1990)
Refractive microsurgery of the lens in high myopia.
Refract. Corneal Surg. **6**, 273-275.
- Viña, J.; Viña, J.R. y Saez, G.T. (1986)
Glutathione: metabolism and physiological functions.
Life Chem. Rep. **4**, 1-35.
- Watsky, M.A.; McDermott, M.L. y Edelhauser, H.F. (1989)
In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: The effect of age, cataract surgery, and diabetes.
Exp. Eye Res. **49**, 751.
- Watsky, M.A.; McCartney, M.D.; McLaughlin, B.J. y Edelhauser, H.F. (1990)
Corneal endothelial functions and the effects of ouabain.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **31**, 933.
- West, S.K. y Valmadrid, C.T. (1995)
Epidemiology of risk factors for age-related cataract.
Surv. Ophthalmol. **39**, 323-334.
- Witz, G. (1989)
Biological interactions of alpha,beta-unsaturated aldehydes.
Free Radical Biol. Med. **7**, 333-349.
- Wolf, M.; Cautrecasas, P. y Sahyoun, N. (1985)
Interaction of protein kinase C with membranes is regulated by Ca^{2+} , phorbol esters and ATP.
J. Biol. Chem. **260**, 15718-81.
- Yeagle, P.L. (1989)
Lipid regulation of cell membrane structure and function.
FASEB J. **3**, 1833.

Ytteborg, J. y Dohlman, C.H. (1965)

Corneal edema and intraocular pressure: II. Clinical results.

Arch. Ophthalmol. **7**, 477.

Zelenka, P.S. (1984)

Lens lipids.

Curr. Eye Res. **3**, 1337.

Ziegler, D.; Hanefeld, M.; Ruhnau, K.J.; Meissner, H.P.; Lobisch, M. y Gries, F.A. (1995)

Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN study).

Diabetologia, **38**, 1425-1433.

