

DEPARTAMENT MEDICINA PREVENTIVA I SALUT
PÚBLICA, CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ, TOXICOLOGIA
I MEDICINA LEGAL

ESTRÉS OXIDATIVO EN EL GLAUCOMA PRIMARIO DE
ÁNGULO ABIERTO. PREVENCIÓN DE LA CEGUERA POR
GLAUCOMA

VICENTE ZANÓN MORENO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18 de juliol de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Ignacio Vinuesa Silva
- D. Vicente Andrés García
- D. Vicente Vila Bou
- D. Pedro Martins de Almeida Melo
- D. Jose Ignacio González Arráez

Va ser dirigida per:

D^a. M^a Dolores Pinazo Durán

D. Antonio Sabater Pons

©Copyright: Servei de Publicacions

Vicente Zanón Moreno

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7344-6

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA



ESTRÉS OXIDATIVO EN EL GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO. PREVENCIÓN DE LA CEGUERA POR GLAUCOMA

Trabajo de investigación que presenta el Licenciado en Biología

Vicente Zanón Moreno
Para optar al grado de doctor

Dirección de la tesis: **Dra. Dña. M^a Dolores Pinazo Durán**

Prof. Dr. D. Antonio Sabater Pons

D. VICENTE CALIXTO ZANÓN MORENO, autor de la Tesis Doctoral titulada **“Estrés oxidativo en el glaucoma primario de ángulo abierto. Prevención de la ceguera por glaucoma”** ha sido investigador del proyecto del Instituto de Salud Carlos III /FIS (PI068162; 2006-2009) y del proyecto de la Escuela Valenciana de Estudios para la Salud (EVES) de la Generalitat Valenciana. 2003-2004

Ha sido beneficiario de una beca de investigación oftalmológica otorgada por Merck Sharp Dohme (España) entre los años 2003-2004, Novartis Ophthalmics enero y junio de 2004 y Thea laboratorios (España) entre los años 2005-2006.

Actualmente tiene un contrato de investigación oftalmológica asociado a Proyecto sobre la Prevención de la Ceguera por Glaucoma, otorgado por la Fundación Hospital Dr. Peset para la Investigación. (2007-2008)

**A mis padres,
Vicente y M^aÁngeles,
y mis hermanos,
Edu, M^aÁngeles y Laura, por su
amor y apoyo.**

**A mi “Xiao” Fang, por estar a mi
lado en todo momento.**

“La ocasión hay que crearla, no
esperar a que nos llegue”

Francis Bacon

Agradecimientos

A la Dra. M^a Dolores Pinazo Durán, alma de la Unidad de Investigación, sin la cual no habría sido capaz de realizar este trabajo. Gracias por creer en mí, por apoyarme desde el primer día y por estar siempre a mi lado, aún en la distancia. Gracias también por tu infatigable lucha contra todos los obstáculos que hemos encontrado en nuestro camino. Y como no, gracias por esas largas conversaciones amenizadas con una buena cervecita.

Al Dr. Antonio Sabater Pons por su apoyo y asesoramiento.

A la Dra. M^a Ángeles Moreno Nadal. Sabes de sobra lo que me ha costado terminar este trabajo y también que sin tu ayuda no habría sido posible. Gracias por darme ánimos en los momentos más duros y no permitir que desistiera.

Al Dr. Vicente Zanón Viguier. Gracias por todo tu apoyo desde el primer momento. Gracias también por tus siempre acertadas observaciones y críticas a mi trabajo, que me han ayudado a ir creciendo poco a poco, tanto personal como profesionalmente.

A Kike y Raquel por su constante apoyo y por sus amables consejos, y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, y por todos los que aún nos quedan por compartir.

A Sheila por aguantarme, que no es poco. Gracias por ser mi compañera en los momentos buenos y en los no tan buenos.

Al Dr. Pedro Melo por sus siempre acertados consejos, por su apoyo y ayuda desinteresada.

A la Dra. Manuela Mendes. Gracias por dedicarme parte de tu tiempo.

Al Dr. Vicente Vila Bou por sus inestimables consejos, observaciones y correcciones, que he procurado atender en la medida de lo posible.

Al Dr. Santiago Juan por su apoyo, por sus consejos y por amenizar nuestras charlas con ese sentido del humor tan envidiable.

A los Dres. Vicente Andrés y Silvia Sanz por ayudarnos siempre que lo hemos necesitado.

A los Dres. Ignacio Vinuesa, Antonio Alberte, Javier Cruz y a Chús, por convertirse en parte fundamental de nuestro equipo y prestarme su ayuda desde el primer momento.

Gracias a las doctoras Pepa Calvet, Catalina Palop y Catalina Navarro y a todas las enfermeras de oftalmología, tanto de consultas como de quirófanos.

Finalmente, gracias a Sonia March (MSD), Jaime Borrás (Thea Labs.) y Alejandro Valero (Imex Clinic) puesto que sin su ayuda, la realización de este trabajo no habría sido posible.

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca concedida por Merck Sharp and Dohme de España (2003-2004), una beca concedida por Laboratorios Thea (2005-2006) y una beca del Instituto de Salud Carlos III (FIS-FEDER PI061862, 2006-2009).

El presente trabajo se ha realizado sin ningún interés económico ni comercial.

Abreviaturas

Abreviaturas

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxiindolacético
5-HT	5-Hidroxitriptamina
ABTS	2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato]
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AMP	Adenosina Monofosfato
AOX	Antioxidante / s
AOXT	Actividad Antioxidante Total
AV	Agudeza Visual
BCA	Ácido Bicinconínico
CAPS	Ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico
CAT	Catalasa
CCK	Colecistoquinina
CGR	Células Ganglionares de la Retina
DA	Dopamina
DEC	Detección electroquímica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPNP	Esclerectomía profunda no perforante
EROS	Especies reactivas del oxígeno
FNO	Fibras del nervio óptico
FO	Fondo de ojo
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico

Abreviaturas

GC	Grupo Cataratas
GG	Grupo Glaucoma
GPAA	Glaucoma Primario de Ángulo Abierto
GPx	Glutation Peroxidasa
GSH	Glutation Reducido
GSHR	Glutation Reductasa
GSSG	Glutation oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTO	Hipertensión Ocular
HVA	Ácido Homovanílico
INT	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio
KDa	Kilodalton
MAO	Monoamino Oxidasa
MDA	Malonildialdehído
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm Hg	Milímetros de Mercurio
mmol	Milimol
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
O ₂ ⁻	Radical Superóxido

Abreviaturas

OH ⁻	Anión Hidroxilo
OH [·]	Radical Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido Nítrico
ONS	Óxido Nítrico Sintasa
p / v	peso / volumen
PARP	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa
PIO	Presión intraocular
PL	Peroxidación Lipídica
Pro-ox	Pro-oxidantes
RL	Radical / es Libre / s
SDS	Sodium Dodecil Sulfate
SE	Serotonina
SNARE	Soluble NSF Attachment Receptor
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico y Especies Reactivas
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
XOD	Xantina Oxidasa

Índice

Índice

I.	Introducción.....	16
1.	Glaucoma. Conceptos y datos generales.....	17
1.1.	Recuerdo anatómico.....	18
1.2.	Papila óptica.....	19
1.3.	Lesión glaucomatosa.....	20
1.4.	Humor acuoso.....	21
1.5.	Presión intraocular.....	22
1.6.	Clasificación del glaucoma.....	23
2.	Estrés oxidativo.....	25
2.1.	Formación de especies reactivas del oxígeno.....	25
2.2.	Principales radicales libres del oxígeno.....	27
2.3.	Antioxidantes.....	27
3.	Estrés Nitrosativo.....	30
4.	Neurotransmisores.....	32
4.1.	Catecolaminas.....	35
4.2.	Indolaminas.....	37
4.2.1.	Serotonina.....	37
4.2.2.	Ácido 5-Hidroxiindolacético.....	39
5.	Proteínas inductoras de apoptosis.....	40
5.1.	Caspasas.....	42
5.2.	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa.....	43
6.	Bibliografía.....	45
II.	Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	52
1.	Justificación.....	53
2.	Hipótesis.....	54

Índice

3. Objetivos.....	54
III. Material y métodos.....	56
1. Material.....	57
2. Metodología.....	62
2.1. Estrés oxidativo.....	62
2.1.1. Determinación de la actividad oxidante.....	62
2.1.2. Determinación de la actividad enzimática SOD.....	64
2.1.3. Determinación del estado antioxidante total.....	67
2.1.4. Determinación de la actividad enzimática GPx.....	69
2.2. Estrés nitrosativo.....	72
2.2.1. Óxido Nítrico Total.....	72
2.3. Determinación de neurotransmisores.....	76
2.4. Proteínas marcadoras de apoptosis.....	78
3. Análisis Estadístico.....	83
4. Bibliografía.....	84
IV. Resultados.....	88
1. Estudio preliminar.....	89
2. Características de los pacientes.....	93
2.1. Edad.....	93
2.2. Sexo.....	94
2.3. Raza.....	95
2.4. Intervención quirúrgica previa.....	96
3. Estrés oxidativo.....	96
3.1. Determinación del estado oxidativo (MDA).....	96
3.2. Determinación de la actividad de la enzima SOD.....	97

Índice

3.3. Determinación de la actividad antioxidante total.....	98
3.4. Determinación de la actividad de la enzima GPx.....	99
4. Estrés nitrosativo.....	100
4.1. Óxido nítrico.....	100
5. Neurotransmisores.....	101
5.1. Serotonina.....	102
5.2. Ácido 5-Hidroxiindolacético.....	102
5.3. Relación 5-HIAA/5-HT.....	102
6. Marcadores de apoptosis.....	103
6.1. Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa.....	103
V. Discusión.....	107
1. Sobre el diseño general del trabajo.....	109
De la enfermedad glaucomatosa.....	109
Del ámbito y de los sujetos del estudio.....	110
De la muestra empleada y las moléculas analizadas.....	112
2. Sobre los resultados obtenidos.....	114
2.1. Características generales de los individuos del estudio.....	115
2.2. Moléculas analizadas en el presente estudio.....	116
2.2.1. Actividad oxidativa.....	116
2.2.2. Actividad antioxidante.....	118
2.2.3. Óxido nítrico.....	120
2.2.4. Neurotransmisores. Serotonina y 5-HIAA.....	123
2.2.5. Marcadores de apoptosis: poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP).....	124
3. Sobre la posibilidad de aplicación biomédica de los resultados y su trascendencia en medicina preventiva.....	126

Índice

4. Bibliografía.....	129
VI. Conclusiones.....	136
VII. Anexos.....	139
1. Hoja de información al paciente.....	140
2. Nomograma HTO.....	143
3. Ficha ensayos laboratorio.....	144
4. Encuesta expertos glaucoma.....	145
5. Fichas resultados.....	146

Introducción

1. Glaucoma. Conceptos y datos generales.

El glaucoma es un síndrome multifactorial caracterizado por una elevada presión intraocular (PIO), una alteración de la cabeza del nervio óptico y una pérdida de campo visual. Cuando la pérdida de tejido del nervio óptico es significativa, los pacientes desarrollan la disminución del campo visual. Antes de que ésta sea cuantificable, pueden perder una cantidad importante de tejido del nervio óptico; por ello, es importante realizar un diagnóstico precoz sin esperar a la pérdida de campo visual¹.

Según datos de la OMS, es la segunda causa de ceguera en el mundo, por detrás de las cataratas (fig. 1); pero la ceguera producida por éstas es reversible, mientras que la ceguera glaucomatosa es, hoy por hoy, irreversible².

La prevalencia en la población está alrededor de un 2'4%. Se estima que 66'8 millones de personas en el mundo tienen glaucoma, de las cuales 6'7 millones presentan ceguera bilateral. En España existen unas 300.000 personas con glaucoma diagnosticado y aproximadamente 700.000 personas lo padecen sin diagnosticar. En Estados Unidos, la prevalencia del glaucoma de ángulo abierto es de 1,86%³⁻⁵.

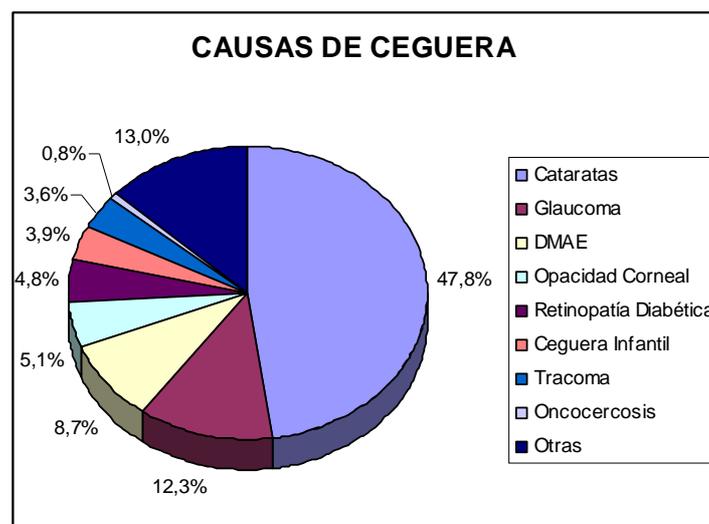


Fig 1.- Causas de Ceguera en el mundo. DMAE = Degeneración Macular Asociada a la Edad. Tomado de formularios de la OMS "Magnitude and causes of visual impairment" Nov. 2004.

Introducción

La alta prevalencia del glaucoma supone un elevado coste económico por concepto de consultas, hospitalización y otros gastos directos por la enfermedad. Además, hay que tener en cuenta el impacto socio-económico de la disminución en la productividad de las personas glaucomatosas por incapacidad visual. Por tanto, el glaucoma es un problema para la Salud Pública⁶.

El glaucoma entra en la denominación de la OMS para las *cegueras evitables*; es decir, es una enfermedad con un tratamiento específico que ha resultado ser eficaz, y su eficacia es mayor cuando la enfermedad se detecta en una fase más precoz. El objetivo de las sociedades oftalmológicas es centrar sus esfuerzos en lograr un diagnóstico lo más precoz de esta patología, antes de que el deterioro visual sea demasiado importante, para administrar el tratamiento más adecuado y, de este modo, cambiar el hecho de que una enfermedad evitable siga siendo una de las principales causas de ceguera en todo el mundo.

Es una enfermedad ligada a la edad, es decir, el riesgo aumenta conforme avanzan los años.

Otros factores de riesgo para el desarrollo y evolución del glaucoma son los antecedentes familiares, la hipertensión arterial, las enfermedades cardiovasculares, la miopía o la diabetes mellitus. Así mismo, las personas de raza negra presentan mayor riesgo de padecer la enfermedad⁷⁻⁹.

1.1. Recuerdo anatómico.

El órgano de la visión está compuesto por el globo ocular, vía óptica y los anexos.

El globo ocular lo componen 3 capas (fig. 2):

1. Externa. Compuesta por una zona anterior (córnea) y otra posterior (esclerótica). Da forma al globo ocular y protege a los elementos más internos.
2. Media. También llamada *úvea*. Es la capa vascular y en ella podemos distinguir una zona anterior (iris y cuerpo ciliar) y una zona posterior (coroides).

Introducción

3. Interna. Constituida por la retina. Es la capa más interna y contiene, entre otros elementos, las células fotorreceptoras, conos y bastones. Los conos son los responsables de la visión fotópica (diurna, en color) y los bastones son los responsables de la visión escotópica (nocturna, que no es en color). En esta capa se encuentran la *mácula óptica*, punto de mayor agudeza visual por presentar la mayor concentración de conos; y la *papila o disco óptico*, zona que no es sensible a la luz por carecer de células fotorreceptoras (zona ciega), y que es el punto de salida del nervio óptico¹⁰.

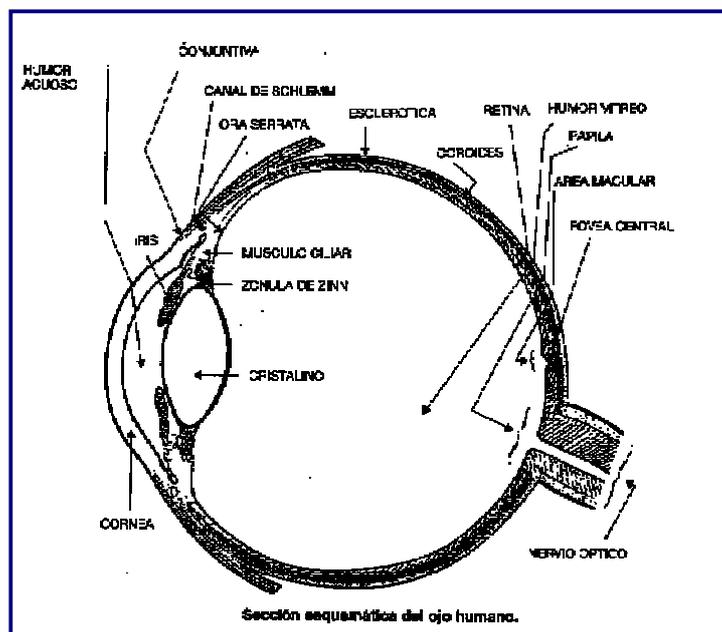


Fig 2.- Morfología del globo ocular. Tomado de <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol23/n1/revis1a.html>

1.2. Papila óptica.

La papila óptica es la parte del nervio óptico que penetra en el globo ocular y que podemos reconocer fácilmente. En este punto confluyen las fibras nerviosas de la retina, y partir de él salen las señales nerviosas hacia el cerebro.

Presenta una depresión o excavación fisiológica, que suele ser inferior al 40% de su tamaño. La observación de la excavación papilar se utiliza para el diagnóstico del glaucoma, puesto que esta

Introducción

enfermedad presenta una excavación muy característica de tamaño superior al fisiológico y que es valorable morfológica y morfométricamente en la exploración del fondo de ojo (fig. 3).

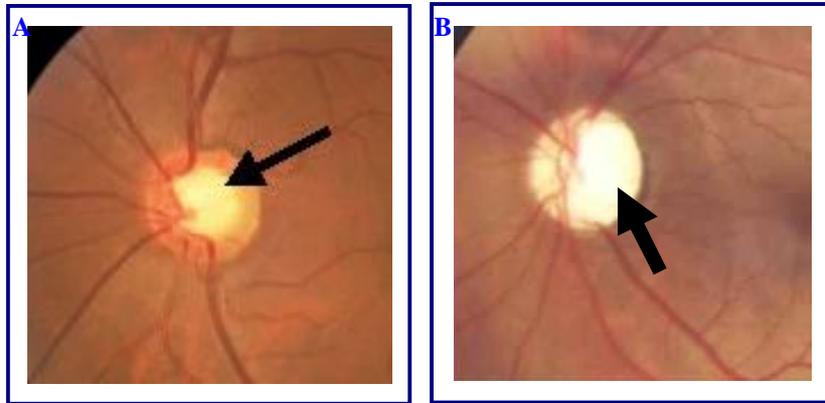


Fig 3.- Morfología de la papila óptica. Excavación papilar fisiológica (A) versus glaucomatosa (B). Foto A tomada de <http://www.retinapanama.com/paginas/terminol/e.htm>. Foto B tomada de <http://www.horusgo.comglaucoma.htm>

1.3. Lesión glaucomatosa.

La lesión del nervio óptico que acontece en el glaucoma produce una pérdida de la función visual. La agudeza visual central es más resistente a la lesión glaucomatosa, de modo que el inicio de la enfermedad está caracterizado por una pérdida de visión periférica y produciendo lo que se conoce como *visión de túnel*.

Sobre la lesión de la papila óptica existen dos teorías principales: la mecánica y la vascular¹¹.

- Teoría mecánica: propone que la compresión de los axones contra la lámina cribosa afecta el flujo axoplasmático y conduce a la muerte de los axones. En animales con PIO elevada, la compresión y la fusión de las placas de la lámina comprime los axones; la interrupción del flujo axoplasmático producida por esta compresión puede iniciar la apoptosis, conduciendo a la muerte celular programada.
- Teoría vascular: afirma que el flujo sanguíneo de la papila óptica está afectado. La isquemia resultante puede dificultar la nutrición de los axones y el flujo axoplasmático. En el nervio óptico normal, los vasos se autorregulan para acomodarse a las variaciones de presión de

Introducción

perfusión; una anomalía en esta autorregulación puede desempeñar un papel en la lesión glaucomatosa.

1.4. Humor acuoso.

El humor acuoso es el medio a través del cual el cuerpo proporciona alimento y elimina los desechos del segmento anterior del ojo; pues el cristalino, la córnea y el retículo trabecular no tienen riego sanguíneo, y necesitan un sistema de circulación alternativo.

Se produce en el cuerpo ciliar, circula por la cámara posterior, pasa a través de la pupila a la cámara anterior y sale a través del retículo trabecular (fig. 4).

Procede del plasma, y se diferencia de éste en que el acuoso está casi totalmente desprovisto de proteínas, contiene entre 10 y 50 veces más ascorbato, es hipertónico y ligeramente más ácido¹²⁻¹⁵.

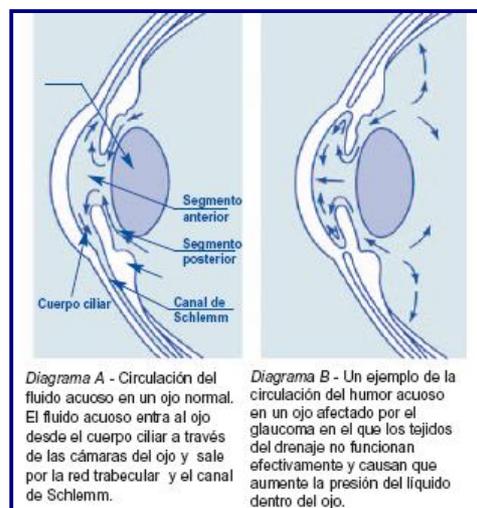


Fig 4.- Morfología de la cámara anterior. Homeostasis del humor acuoso. Tomado de "Preguntas y respuestas sobre el glaucoma. El ladrón silencioso de la vista. Pfizer Ophthalmics."

1.5. Presión intraocular.

La proporción entre la producción y la eliminación del acuoso determina la PIO (fig. 5). La elevación de la PIO se debe bien a una excesiva producción de acuoso (muy raro), bien a un defecto en el drenaje del mismo¹⁶.

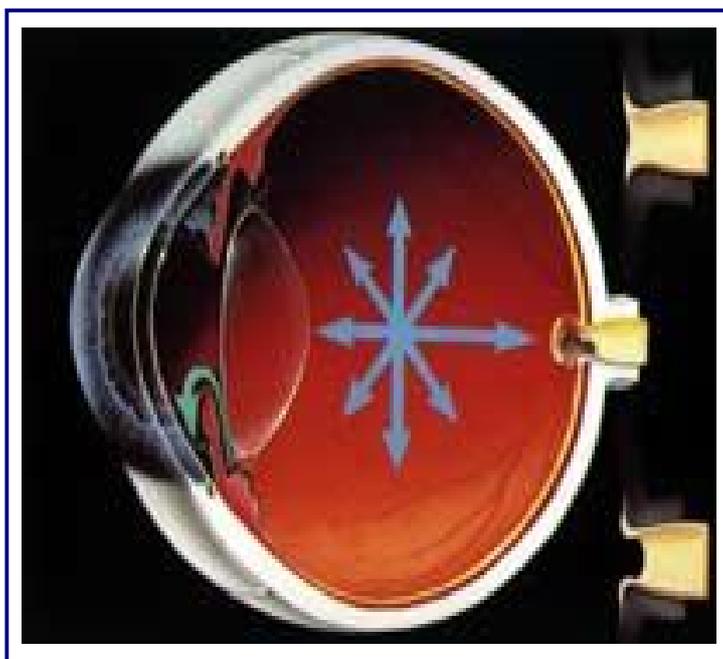


Fig 5.- Efectos de la presión intraocular en las estructuras del globo ocular. Proceso de autorregulación. Tomado de <http://hipocrates.tripod.com/ofthalmologia/glaucoma.htm>

Según aumenta la PIO el flujo sanguíneo se mantiene, gracias al mecanismo de autorregulación^{17,18}. Esto ocurre hasta que la presión llega a los 40 mm Hg., punto en el que la autorregulación no es suficiente y el flujo empieza a bajar. Pero algunos pacientes no son capaces de autorregular, y ante un aumento de la presión el flujo disminuye directamente. Estos son los pacientes con una predisposición para desarrollar glaucoma^{19,20}.

1.6. Clasificación del glaucoma.

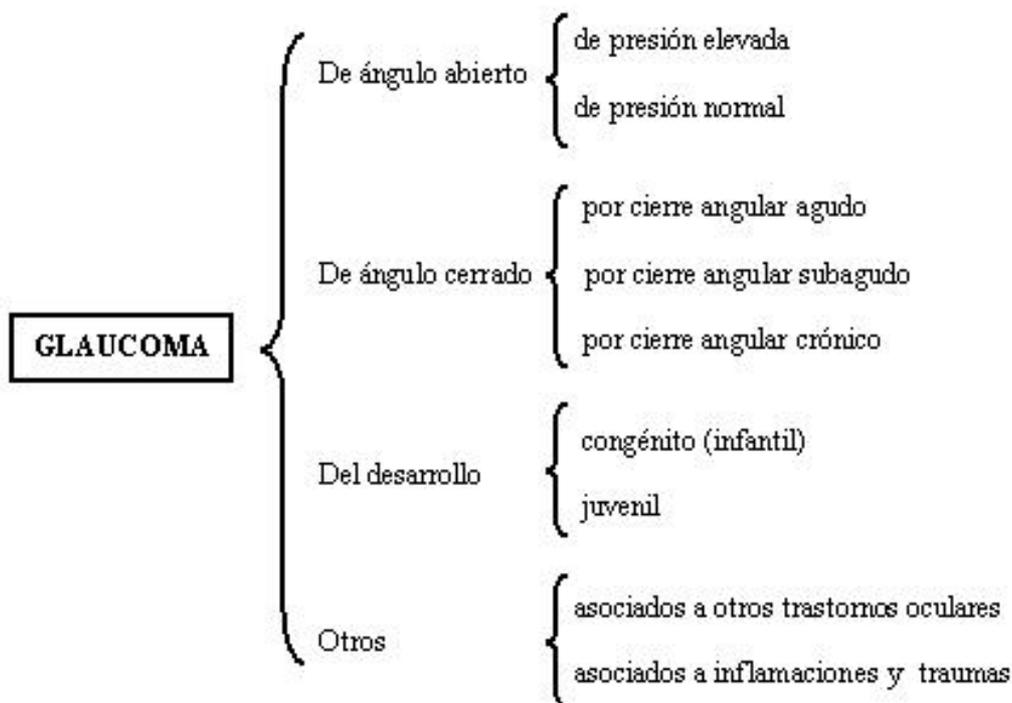
Tener una presión intraocular elevada no quiere decir necesariamente que el nervio óptico esté afectado; es decir, que la persona tenga glaucoma. Ciertamente, en la población, existen dos grupos de personas diferentes: aquellas con un nervio óptico *normal* y aquellas con un nervio óptico *lesionado*. En el primer grupo no se produce glaucoma, en el segundo sí.

Si esta división de la población, en función de tener lesionado o no el nervio óptico, la reorganizamos teniendo en cuenta la PIO, los grupos que obtenemos son:

- *Normal*: sin glaucoma ni hipertensión ocular. Nervio óptico normal y PIO entre 12-21 mm. Hg.
- *Hipertensión ocular*: sin glaucoma pero con PIO elevada. Nervio óptico normal y PIO >21 mm. Hg.
- *Glaucoma*: con glaucoma e hipertensión ocular. Lesión glaucomatosa del nervio óptico y PIO >21 mm. Hg.
- *Glaucoma normotensivo*: con glaucoma y sin hipertensión ocular. Lesión glaucomatosa del nervio óptico y PIO entre 12-21 mm. Hg.

En este punto podemos realizar una clasificación del glaucoma en función de la existencia de obstrucción en el sistema de drenaje (glaucoma de ángulo abierto y glaucoma de ángulo cerrado) o en función de su etiología (glaucoma primario y glaucoma secundario)²¹.

Por último, según sus causas²², el glaucoma puede clasificarse en:



El tipo más común de glaucoma es el primario de ángulo abierto (GPAA), que supone 60-70% de todos los casos. Es un tipo de glaucoma crónico, de progresión lenta y asintomático, por lo que el diagnóstico es tardío y se realiza cuando el paciente ya ha perdido el 40-50% de las fibras nerviosas del nervio óptico, cuando la pérdida de visión ya es importante²³⁻²⁵.

La relación entre la PIO y las lesiones glaucomatosas del nervio óptico es indiscutible, pero la existencia de un tipo de glaucoma con PIO normal (glaucoma normotensivo) indica que otros factores deben desempeñar un papel importante en la patogenia del glaucoma. Entre los mecanismos que pueden estar relacionados con la etiopatogenia del glaucoma y la homeostasis del humor acuoso, están entre otros la formación de radicales libres y el estado de las defensas antioxidantes, el óxido nítrico y los compuestos tóxicos derivados de él, los neurotransmisores y algunas proteínas inductoras de apoptosis, como la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) o la caspasa-3.

2.- Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL) y la eliminación de estos por medio de las defensas antioxidantes²⁶⁻²⁹ (fig. 6). Las células no utilizan todo el oxígeno que les llega, y un 2% de ese oxígeno que no utilizan es transformado en las sustancias tóxicas que se conocen como radicales libres.

Los procesos de estrés oxidativo no generan síntomas específicos, de ahí su peligrosidad. Si no es tratado, el estrés oxidativo acelera el envejecimiento y favorece la aparición de ciertas enfermedades en cuya génesis o desarrollo intervienen de forma decisiva los radicales libres.

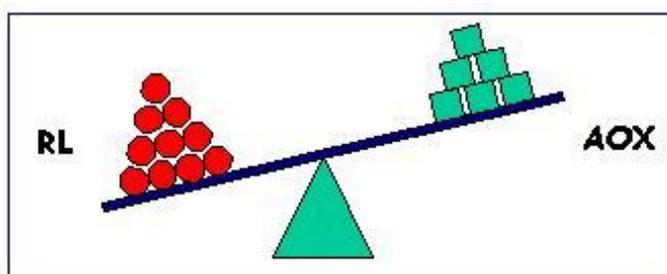


Fig 6.- Esquema del desequilibrio entre los radicales libres (RL) y los antioxidantes (AOX)

2.1.- Formación de especies reactivas del oxígeno.

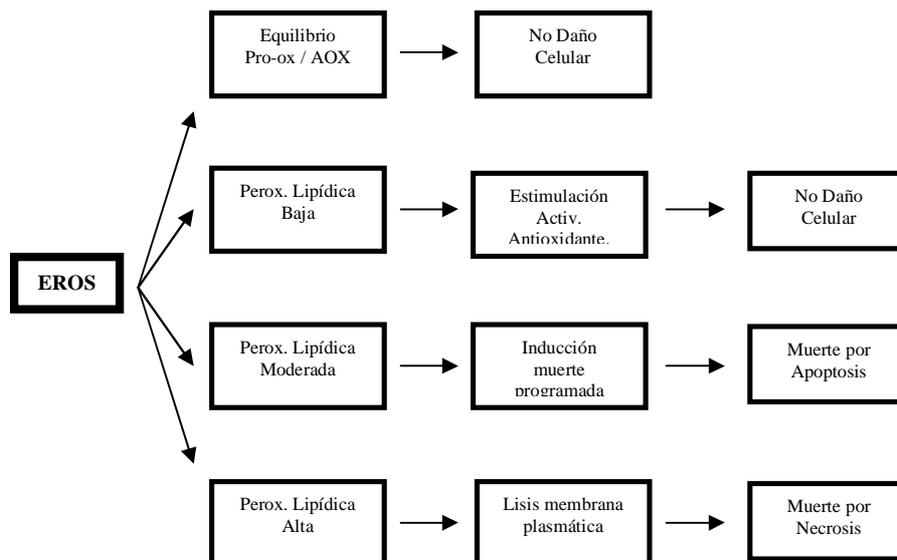
En todo organismo se producen los RL, especies reactivas del oxígeno (EROS), como productos del metabolismo celular. Un RL es una molécula altamente inestable y muy reactiva. Inestable por tener un electrón desapareado en su último orbital electrónico y reactiva porque, debido a esa inestabilidad, tenderá a estabilizarse, cediendo o captando un electrón de otra molécula, que se convertirá en RL a su vez. De este modo, se produce una reacción en cadena que, de no detenerse, causará daños a nivel celular y tisular (fig. 7), induciendo lesiones de consecuencias directas sobre la salud.³⁰⁻³⁴.

Introducción



Fig. 7.- Dianas de los radicales libres.

Los RL producen daños en las membranas plasmáticas celulares, atacando a los lípidos mediante la vía de la *peroxidación lipídica* (PL). El daño producido en la célula variará en función del nivel de PL, de modo que si el grado de peroxidación lipídica es elevado puede llegar a producirse la lisis de la membrana plasmática celular³⁵.



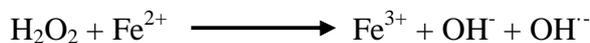
2.2. Principales radicales libres del oxígeno.

Las principales EROS son³⁶⁻³⁸:

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El más frecuente y peligroso. Se forma por la reducción covalente del oxígeno, y también por acción de enzimas como la xantina oxidasa. A partir de este radical puede originarse el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), mediante la reacción de Haber-Weiss:



Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se forma por la acción de la enzima superóxido dismutasa sobre el anión superóxido. Interviene en la formación del radical hidroxilo por medio de la reacción de Haber-Weiss descrita anteriormente, y también por la reacción de Fenton:



Anión hidroxilo (OH^{\cdot}). Es considerado una de las especies oxidantes más dañinas por su vida media corta y alta reactividad. Puede formarse fácilmente por la reacción de Haber-Weiss entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, catalizada por un metal de transición, y también por la reacción de Fenton.

2.3.- Antioxidantes.

El organismo dispone de sus propios medios de defensa contra los RL, las defensas antioxidantes. Estos antioxidantes pueden ser aportados por la dieta (exógenos) o pueden ser producidos por el propio organismo (endógenos)^{39,40}. Los principales antioxidantes exógenos son las

vitaminas E y C y los β -carotenos. La defensa antioxidante endógena podemos dividirla en 3 niveles, que quedan reflejados en el organigrama siguiente:

1. Defensa enzimática (SOD, GPx, CAT...)
2. Defensa química (ácido úrico, bilirrubina, albúmina...)
3. Defensa por proteínas reparadoras del ADN



Entre las enzimas antioxidantes, las principales son la superóxido dismutasa (SOD), la glutathion peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT). La acción de estas enzimas está esquematizada en la figura 8.

1. **SOD**: es la primera enzima de defensa antioxidante, catalizando la reacción de dismutación del RL anión superóxido (O_2^-). Se han identificado cuatro clases de SOD: una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn. Las demás presentan cofactores mononucleares de Fe, Mn o Ni. En humanos existen tres tipos de SOD: una mitocondrial (dependiente de manganeso, Mn-SOD), una citosólica (dependiente de cobre y cinc, Cu/Zn-SOD) y una extracelular (EC-SOD)⁴¹.

Introducción



2. GPx: formada por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un residuo de seleno-cisteína (esencial para su actividad enzimática). Reacciona frente a peróxidos lipídicos, usando glutatión reducido (GSH)⁴².



3. CAT: actúa frente al peróxido de hidrógeno. Enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas, conteniendo cuatro de ferro-protoporfirina por molécula. Esta enzima presenta una elevada capacidad de reacción, pero una baja afinidad por el sustrato sobre el que ejerce su acción. En presencia de dadores de protones (metanol, ácido fórmico, fenoles) presenta actividad peroxidasa⁴³. La reacción química tiene lugar en dos etapas:

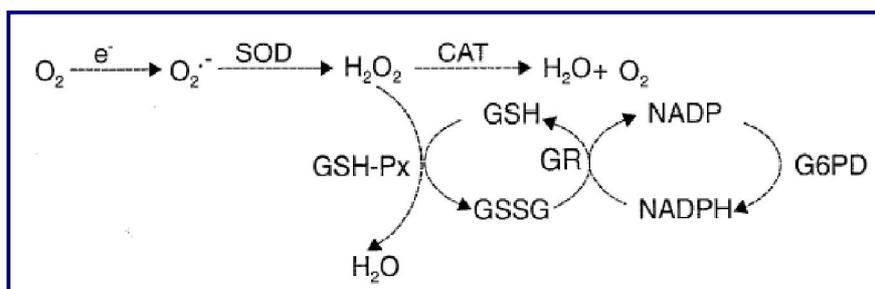


Fig 8.- Acción de enzimas antioxidantes sobre los radicales libres del oxígeno. Tomado de "Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. Free Radical Biol Med 1990; 8: 583-599"

Por lo tanto, el inicio del daño celular viene determinado por el desequilibrio entre las fuerzas oxidantes y las defensas antioxidantes a favor de las primeras. Este mecanismo, conocido como estrés oxidativo, fue introducido en biomedicina como factor a mitad del siglo XX.

En 1953 Rebeca Gerschman⁴⁴, científico de Argentina, impartiendo un seminario relacionó por primera vez en la historia los RL con las causas de enfermedades en el hombre, basándose en la abundancia del oxígeno, su accesibilidad, potencial termodinámico y baja velocidad de reacción del mismo, comentando la posible existencia de fenómenos de toxicidad relacionadas con él.

Más tarde, Daniel Gilbert⁴⁵ y, ya en 1969, McCord y Fridovich⁴⁶ analizaron que la toxicidad del oxígeno se debe a la formación de RL, describiendo los dos últimos la función de la enzima antioxidante superóxido dismutasa, creciendo de manera exponencial el volumen de publicaciones científicas en torno a la teoría fisiopatológica de los RL, cuyo interés ha llegado hasta nuestros días.

Es en este punto donde se debe considerar que las EROS se forman en condiciones fisiológicas en proporciones bien controlables por los mecanismos defensivos celulares; pero que cuando esta producción se incrementa de forma sustancial, se induce el proceso patológico de desequilibrio entre las fuerzas oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante, que se conoce como *estrés oxidativo*.

3.- Estrés nitrosativo.

Además del estrés oxidativo existe el estrés nitrosativo, que se produce por acción del óxido nítrico y especies tóxicas del nitrógeno y que también puede inducir daño celular y tisular⁴⁷.

El óxido nítrico (ON) es una molécula que ayuda a la supervivencia de los organismos por participar activamente en procesos tales como el desarrollo del sistema nervioso central, activación de la respuesta inmune, regulación de la presión sanguínea, etc.

Introducción

Posee muy diversas funciones en los organismos⁴⁸, como su efecto vasotónico inhibiendo la contracción del músculo cardíaco y del endotelio vascular favoreciendo la vasodilatación. Disminuye la interacción de las plaquetas con los vasos sanguíneos. Protege la mucosa gástrica al disminuir el mecanismo de sangrado gastrointestinal. Produce una elevación rápida de la oxigenación tisular en todo el organismo sin producir hipotensión sistémica. Participa como neurotransmisor.

Pero no siempre resulta beneficioso, también puede resultar perjudicial cuando se pierde el control de sus niveles óptimos, relacionándose en este caso con enfermedades tales como la hipertensión arterial, procesos neurodegenerativos (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson), disfunciones del sistema inmune o dislipemias⁴⁹.

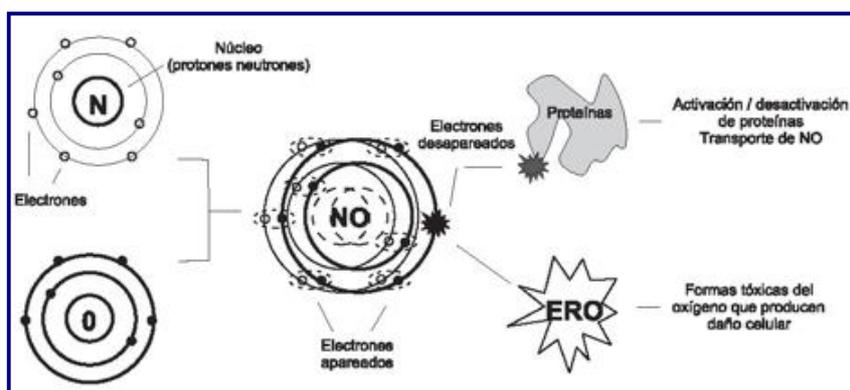


Fig 9.- Formación de la molécula de óxido nítrico (NO) por unión de un átomo de nitrógeno (N) y uno de oxígeno (O). El NO, al tener un electrón desapareado, puede reaccionar con otras moléculas con electrones desapareados, como proteínas o especies reactivas del oxígeno (ERO). Tomado de Lira V, Arredondo R. Óxido nítrico: un héroe disfrazado de villano. Elementos 2004; 53: 11-17

Del mismo modo, al tener un electrón desapareado puede comportarse como un radical libre (fig. 9) y generar, en presencia de oxígeno o especies reactivas del oxígeno, formas tóxicas (ej. Peroxinitrito), causando daños sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos conforme se muestra en el esquema siguiente^{50,51}.



4.- Neurotransmisores.

Un neurotransmisor es una biomolécula, sintetizada generalmente por las neuronas, que se libera a partir de vesículas existentes en la neurona presináptica, hacia la porción sináptica y produce un cambio en el potencial de acción de la neurona postsináptica.

Los neurotransmisores son las principales sustancias de las sinapsis (fig. 10). Entre los procesos bioquímicos asociados con la neurotransmisión cabe destacar la síntesis del neurotransmisor por las neuronas presinápticas (a veces con participación de la neuroglía). Según la naturaleza del neurotransmisor se puede sintetizar en el cuerpo o terminaciones neuronales.

A través del interior del axón fluye una corriente de sustancias libres o encerradas en vesículas, que pueden ser precursores tanto de los neurotransmisores o sus enzimas, llamada flujo axonal. El neurotransmisor se almacena en las vesículas sinápticas, liberándose por exocitosis (proceso calciodependiente) de manera que al llegar un impulso nervioso a la neurona presináptica, ésta abre los canales de calcio entrando el ión en la neurona y liberándose el neurotransmisor en el espacio sináptico. El calcio, además de iniciar la exocitosis, activa el traslado de las vesículas a los lugares de su liberación con la ayuda de proteínas de membrana plasmática y de la membrana vesicular. Cuando entra el calcio en la neurona, se activa la enzima calmodulina (proteínquinasa, encargada de fosforilar a la sinapsina I situada en la membrana de las vesículas y que las une a los filamentos de actina).

Este conjunto de proteínas constituyen el complejo SNARE, que forma un poro en la membrana plasmática que permite la fusión de ambas membranas y la salida del contenido vesicular

Introducción

al espacio sináptico y activa el receptor del neurotransmisor situado en la membrana plasmática de la neurona postsináptica.

Los neuroreceptores pueden ser:

- a) Receptores ionotrópicos que inducen respuesta rápida al abrir o cerrar canales iónicos, que producen despolarizaciones o generando potenciales de acción o respuestas excitatorias o producen hiperpolarizaciones o respuestas inhibitorias
- b) Receptores metabotrópicos que liberan mensajeros intracelulares, como AMP cíclico, calcio, y fosfolípidos por el mecanismo de transducción de señales.

Posteriormente se inician las acciones del segundo mensajero y finalmente se produce la inactivación del neurotransmisor, bien por degradación química o por reabsorción en las membranas. En el espacio sináptico existen enzimas específicos que inactivan al neurotransmisor. Además las neuronas presinápticas tienen receptores para el neurotransmisor que lo recaptan introduciéndolo y almacenándolo de nuevo en vesículas para su posterior vertido.

Es importante reflejar que hay superfamilias de receptores para cada uno de los diferentes tipos de neurotransmisores. De ellos, los más conocidos son los de la acetilcolina, la norepinefrina, la dopamina y la serotonina. El gas óxido nítrico es también considerado como un neurotransmisor, y se caracteriza por un mecanismo de acción particular que no cumple todas las características de los demás neurotransmisores.

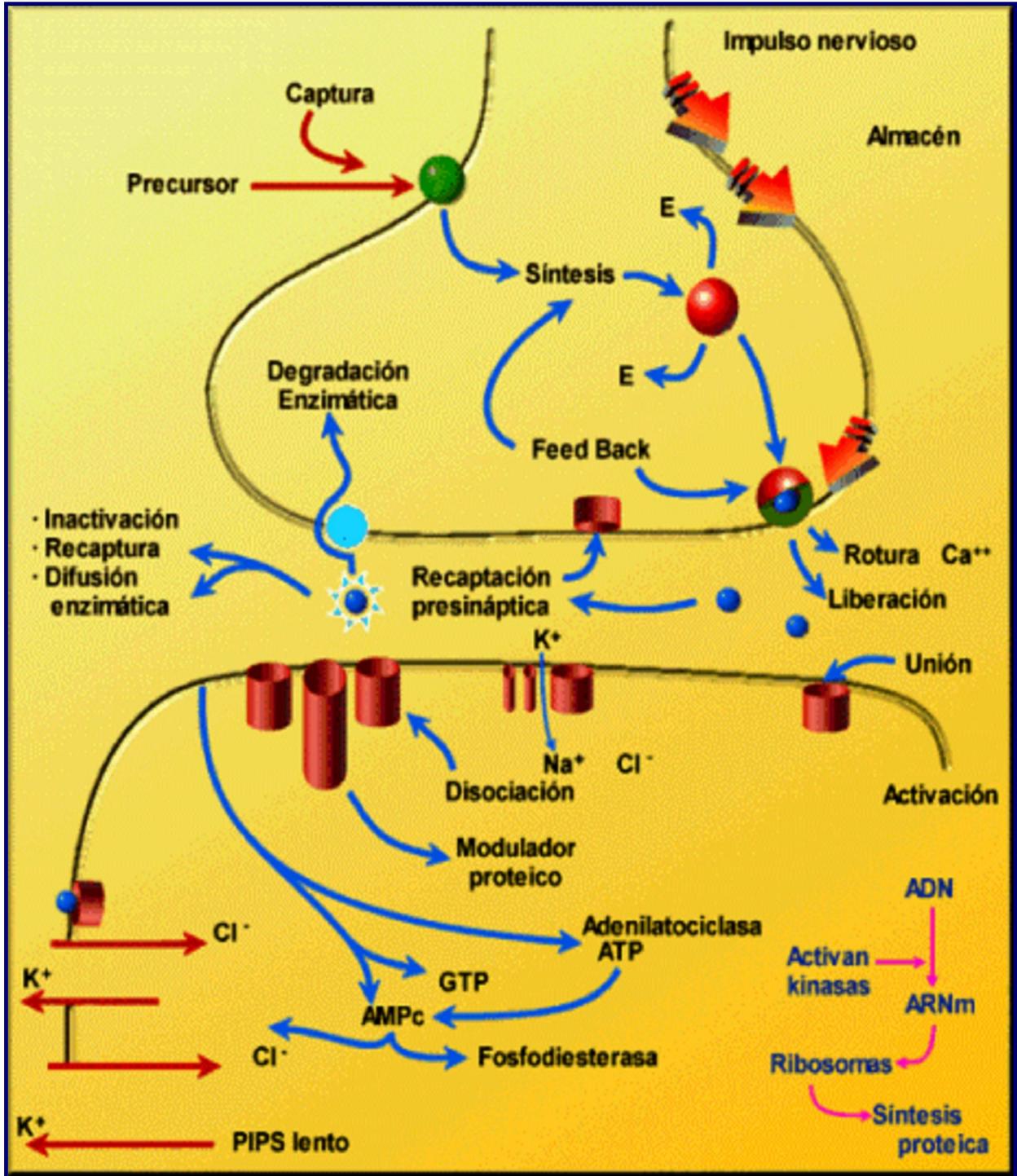


Fig 10.- Esquema de una sinapsis. Tomado de Gómez-Jarabo G. Farmacología de la conducta. Manual básico para terapeutas y clínicos. Madrid. Síntesis Psicología. 1997.

Introducción

	Catecolaminas	Dopamina	Adrenalina	Noradrenalina			
Monoaminas	Indolaminas	Serotonina					
Histamina							
Ésteres	Acetil-Colina						
Aminoácidos	Excitatorios	Glutamato	Aspartato				
	Inhibitorios	Glicina	GABA	Taurina			
Neuripéptidos	Somatostatina	Encefalina	Neurotensina	Neuropéptido Y	CCK	VIP	Sustancia P
Gases	Óxido Nítrico						

CCK = Colecistoquinina; VIP = Péptido Intestinal Vasoactivo; GABA = Ácido Gamma Amino Butírico

Las monoaminas son los principales neurotransmisores del Sistema Nervioso Central (SNC). Reciben el nombre por presentar en su estructura un grupo amino (NH_2). Proceden de aminoácidos precursores y podemos clasificarlas en dos grupos: catecolaminas e indolaminas⁵².

4.1. Catecolaminas.

Las principales son la dopamina, la adrenalina (epinefrina) y la noradrenalina (norepinefrina). Se sintetizan a partir de la tirosina (fig. 11). Pueden ejercer una función hormonal cuando se producen en la glándula suprarrenal, o ejercer como neurotransmisores cuando son producidas en las terminaciones nerviosas⁵³.

La Dopamina (DA) es una catecolamina natural que funciona como neurotransmisor activando los 5 tipos del receptor D1, D2, D3, D4, D5, y sus variantes⁵⁴. Se sintetiza, a partir de la tirosina, en varias zonas del cerebro incluyendo la sustancia negra. Es considerada como una neurohormona, liberada por el hipotálamo.

Se ha demostrado que niveles bajos de DA pueden conducir a depresión⁵⁵. Es precursor de la adrenalina y noradrenalina y es un compuesto intermediario en el metabolismo de las tiroxinas.

Introducción

El ácido homovanílico (HVA) es el principal metabolito de la dopamina (fig. 12). Suele usarse como reactivo para detectar enzimas oxidantes, y sus niveles en cerebro y fluido cerebroespinal suelen utilizarse como marcadores de estrés metabólico⁵⁶.

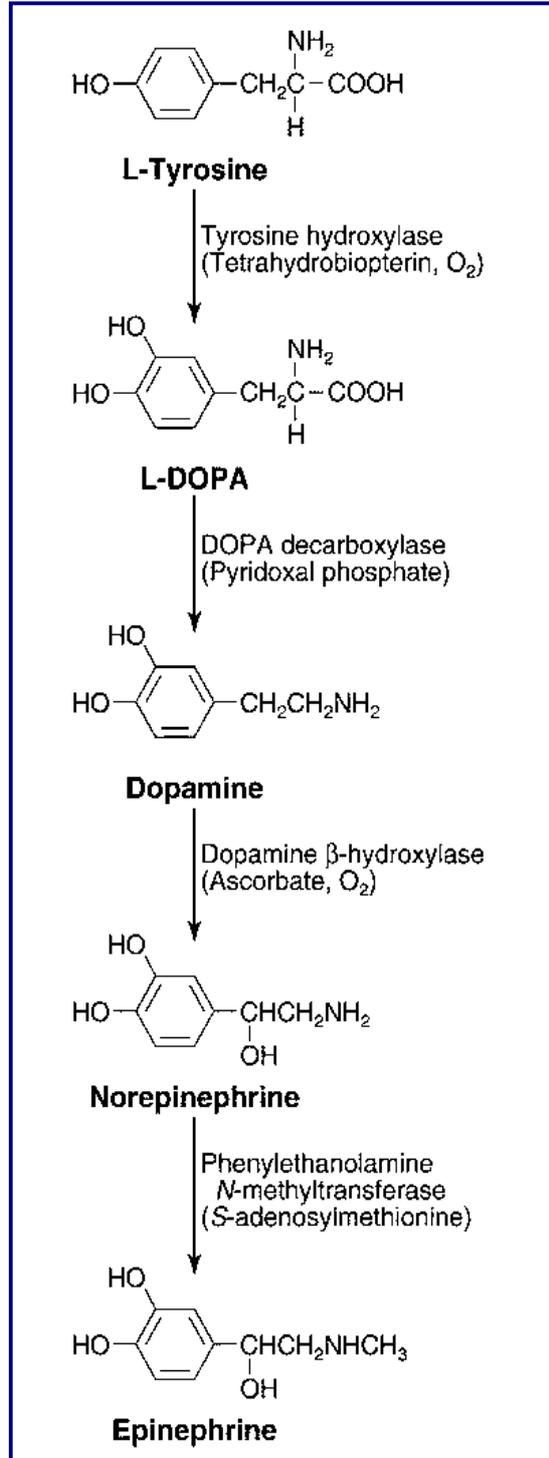


Fig 11.- Síntesis de las principales catecolaminas. Tomado de www.uandes.cl/dinamicas/Farmacología%20clase%204.%20Adrenérgicos.ppt

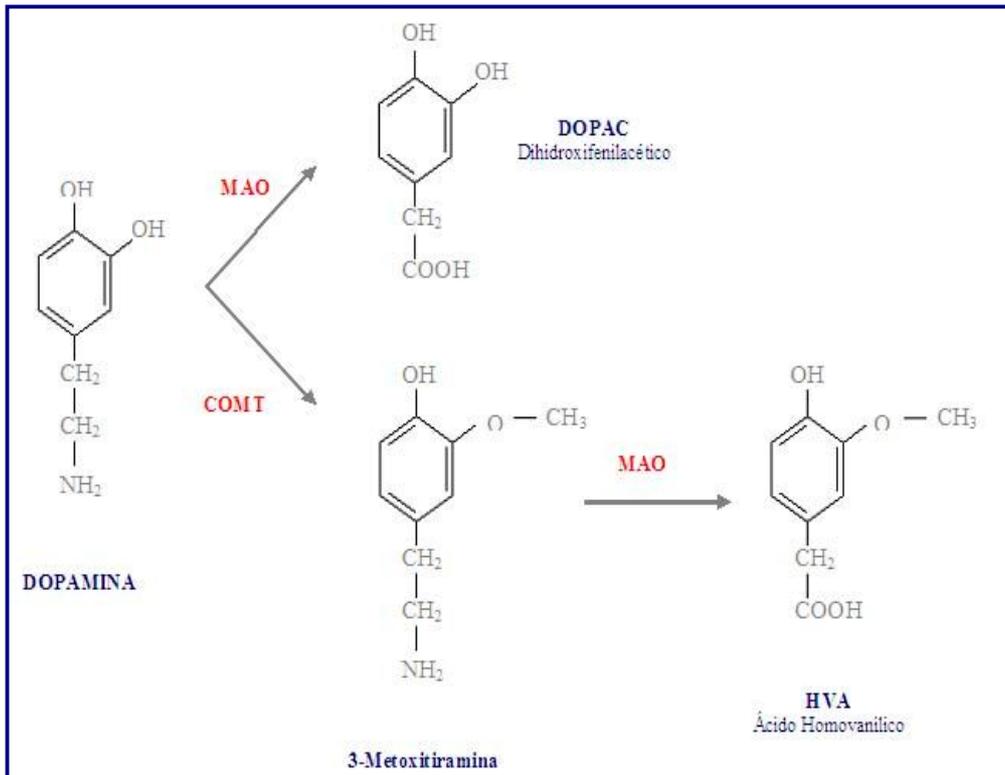


Fig 12.- Reacciones bioquímicas en la degradación de la dopamina.

4.2. Indolaminas.

Pertenecen al grupo de las monoaminas y están representadas por la serotonina.

4.2.1. Serotonina.

La serotonina (SE) es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el cerebro. De hecho muchas estructuras del SNC están inervadas por neuronas serotoninérgicas, de las cuales casi todas se inician en los núcleos del RAPE. Las acciones de la serotonina están mediadas a través de receptores, que pueden ser excitatorios o inhibitorios⁵⁷. La diferencia entre ellos y la distribución del sistema serotoninérgico en el cerebro hace de la serotonina un candidato excelente para la neuromodulación. El receptor 5-HT1A pertenece a la familia de los receptores inhibitorios unidos a proteína G. La posibilidad de estimular o inhibir este receptor amplía las posibilidades diagnósticas y

Introducción

farmacológicas de muchos procesos, incluyendo aquellos que cursan con activación de la neurotoxicidad.

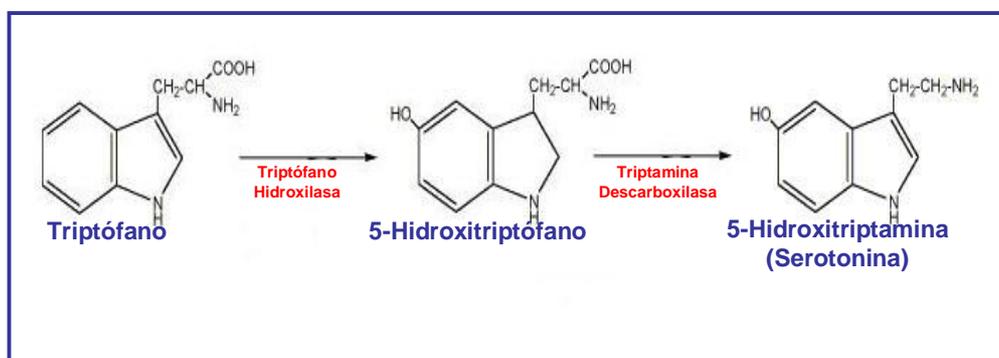


Fig 13.- Esquema de las reacciones que tienen lugar en el proceso de biosíntesis de la serotonina.

La SE (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una monoamina sintetizada en las neuronas serotoninérgicas del SNC y en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Tiene una función fundamentalmente inhibitoria. Afecta al funcionamiento vascular y la frecuencia del latido cardíaco y regula la secreción de hormonas, como la del crecimiento. Niveles bajos de SE pueden asociarse a aumento de agresividad y comportamientos comprometidos, depresión, desórdenes obsesivos-compulsivos, fibromialgia, trastorno bipolar, ansiedad, migraña etc. Fue identificada en 1948 e inicialmente asociada a efectos vasoconstrictores. Más tarde se identificó como 5-hidroxitriptamina (5-HT). En el organismo la SE se sintetiza a partir del triptófano^{58,59} (fig. 13). La figura 14 muestra la estructura tridimensional de la serotonina.

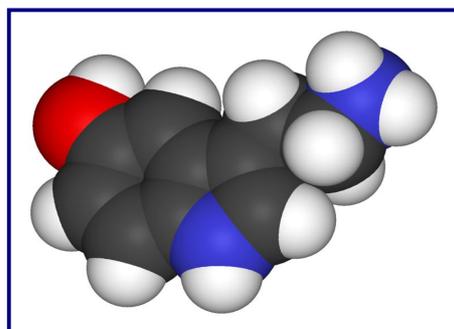


Fig 14.- Estructura 3D de la molécula de la serotonina. Tomada de <http://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin>

4.2.2. Ácido 5-Hidroxiindolacético.

Es el principal metabolito de la degradación de la serotonina, por acción de las enzimas MAO y aldehído deshidrogenasa (fig. 15). Constituye casi el 100% del metabolismo de la serotonina en el cerebro, por lo que la velocidad de recambio de la serotonina cerebral se estima mediante la velocidad de incremento del 5-HIAA⁵⁷.

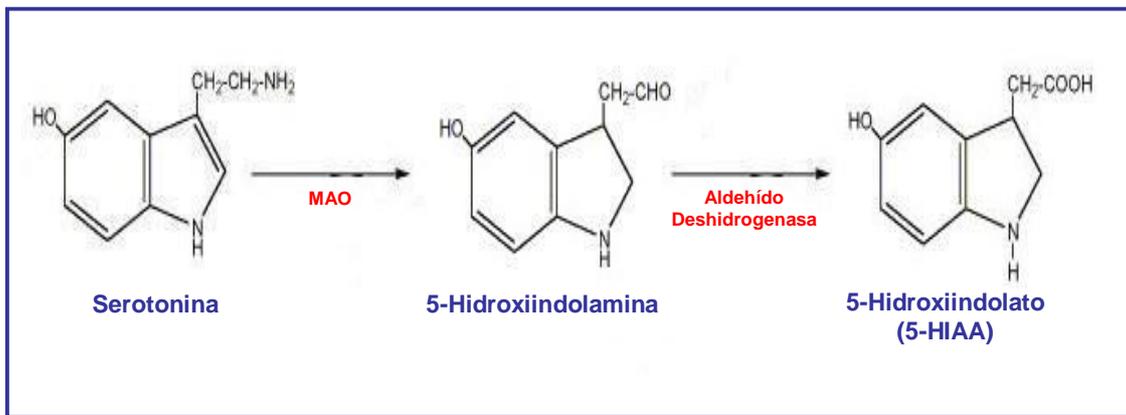


Fig 15.- Degradación de la serotonina y formación de 5-hidroxiindolato.

Por tanto, el estudio de los neurotransmisores y las características de la respuesta inducida por ellos puede ayudar al conocimiento de las causas que llevan a la degeneración del nervio óptico y la aparición de la neuropatía óptica glaucomatosa^{60,61}. Este concepto deriva del conocimiento de la neurotoxicidad inducida por el glutamato, mecanismo bien establecido en relación al glaucoma⁶². No obstante cabe la posibilidad de que otros neurotransmisores también desempeñen una función en los mecanismos patogénicos de esta enfermedad, entre los que cabría considerar a la dopamina, la serotonina, y sus metabolitos principales (ácido homovanílico y 5-hidroxiindolato), que podrían actuar bien de forma directa por sus efectos específicos, o bien como señales intercelulares.

5.- Proteínas inductoras de apoptosis.

La apoptosis o “suicidio celular” es un tipo de muerte celular en el que la célula muere de manera natural; es decir, es la célula la que decide morir. A diferencia de la necrosis, proceso de muerte celular patológica (a causa de una agresión o enfermedad que altera la función celular), en la apoptosis la célula recibe una señal química que le indica que debe morir (por no ser ya necesaria o suponer una amenaza para el organismo)⁶¹.

En respuesta a esa señal, se inician una serie de mecanismos enzimáticos dirigidos a la destrucción de las estructuras vitales para la supervivencia de la célula (ADN y proteínas). La membrana celular no se rompe en este proceso, y la célula será fagocitada impidiendo que la señal se extienda a células vecinas⁶² (fig. 26)

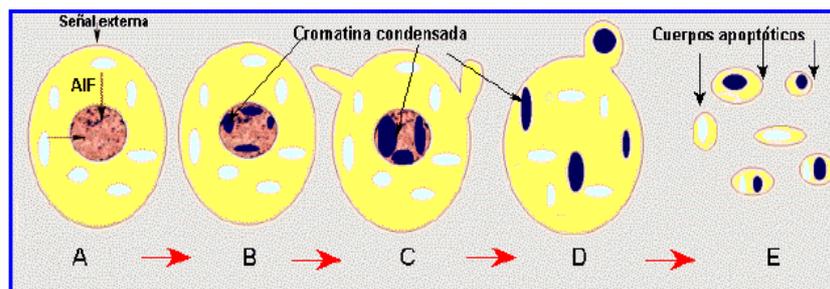


Fig. 16.- Fases del proceso de muerte celular por apoptosis. Obtenido de http://www.biologia.edu.ar/cel_euca/regulacion.htm

Existen 2 vías de señalización por las cuales puede iniciarse la muerte celular por apoptosis⁶³ (fig. 17):

1. Vía intrínseca: también llamada vía mitocondrial. En esta vía, el estímulo para el inicio de la apoptosis proviene del interior celular.
2. Vía extrínseca: conocida también como vía de *receptores de muerte*. La señal para el inicio de la apoptosis viene de fuera de la célula.

Introducción

En ambas vías se van activando sucesivamente una serie de proteínas, que constituyen la maquinaria apoptótica, y que conducen a la célula a su muerte por apoptosis.

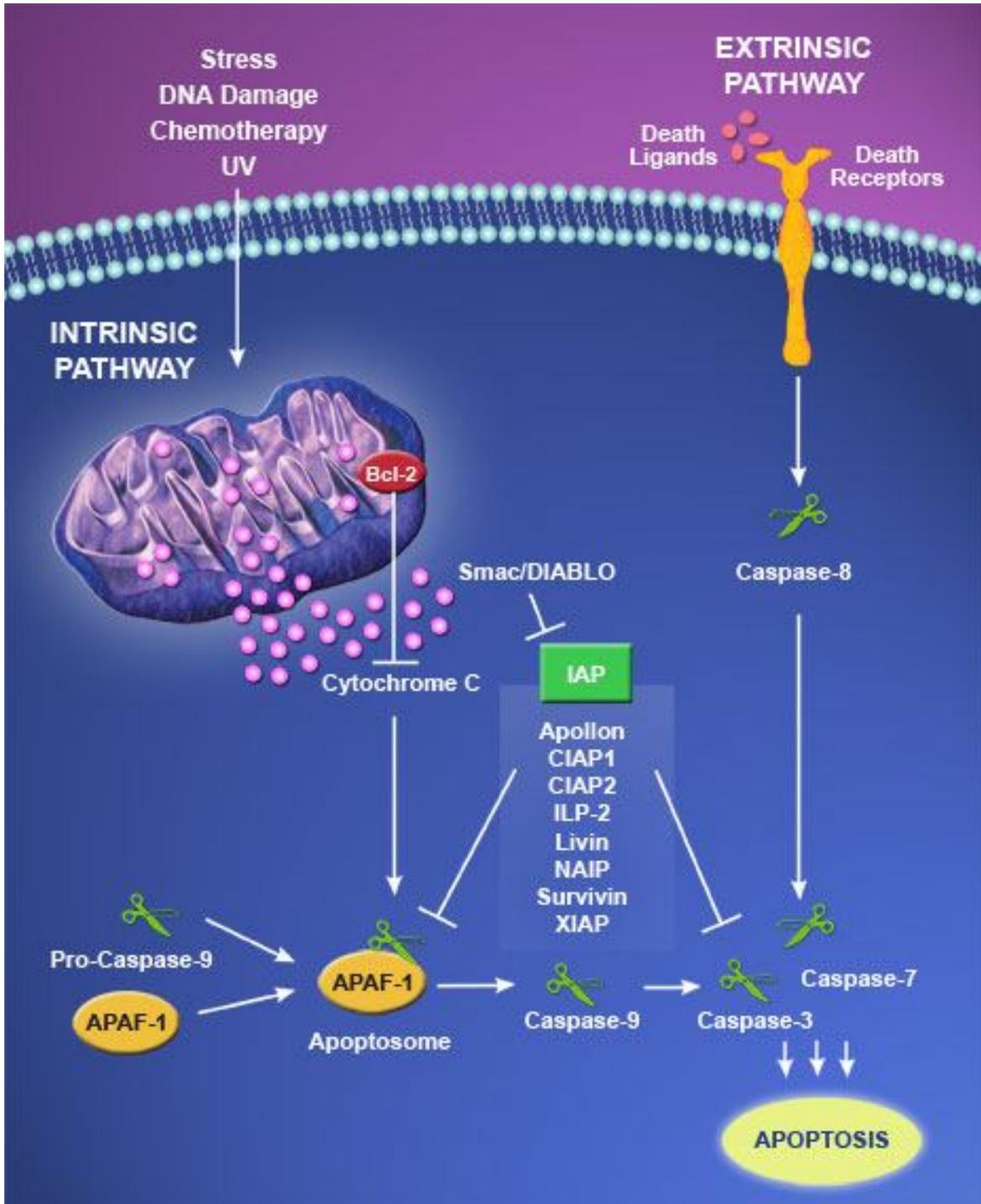


Fig. 17.- Esquema de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Obtenida de http://www.imgenex.com/emarketing/081606_LivinorSurvivin/apoptosis-pathway6.jpg

Introducción

Pero puede darse el caso de que una vez iniciada la apoptosis, ésta se detenga y el organismo se vea obligado a quedarse con la célula enferma (que enfermará a otras), o puede ocurrir que se produzca un proceso de apoptosis acelerado que elimine células que no deberían morir. Es en estos casos cuando el organismo enferma.

Diversos estudios han demostrado, en modelos experimentales de glaucoma, que el mecanismo de muerte de las células ganglionares de la retina puede ser la apoptosis^{64,65}.

Varios autores coinciden al afirmar que una sobreestimulación del receptor NMDA (N-Metil-D-Aspartato) en respuesta a un aumento en los niveles de glutamato, provoca la apertura de los canales de calcio y, por consiguiente, una sobrecarga intracelular de este catión. Este aumento del calcio intracelular activa a la enzima óxido nítrico sintasa (ONS) y se produce un aumento en los niveles de óxido nítrico. Este exceso de óxido nítrico se desviará a la producción de peroxinitrito, compuesto altamente tóxico para el organismo y que induce muerte celular por apoptosis en las células fotorreceptoras de la retina, mediada por la proteína caspasa-3⁶⁶⁻⁶⁸.

5.1. Caspasas.

Las caspasas (cisteinil-aspartato proteasas) son proteínas que participan activamente en la ruptura de otras proteínas y son mediadores fundamentales en procesos de apoptosis⁶⁹. Se han identificado 11 tipos diferentes de caspasas en humanos⁷⁰ (fig. 18). De ellas, unas participan en procesos inflamatorios mediante la activación de determinadas citoquinas (caspasas inflamatorias), y otras en procesos de muerte celular programada. Estas últimas se pueden clasificar en base a la función que presentan en las distintas cascadas de señalización en las que median⁷¹:

- Caspasas iniciadoras: activan las formas inactivas de las efectoras.
- Caspasas efectoras: procesan otras proteínas que mediarán en los procesos de apoptosis.

Introducción

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis ha de recibir *señales de muerte*, por ejemplo niveles elevados de oxidantes en el interior celular. Estos estímulos apoptóticos conducen a la activación de las caspasas iniciadoras (por autoproteólisis), que activarán a las efectoras, las verdaderas ejecutoras de la apoptosis.

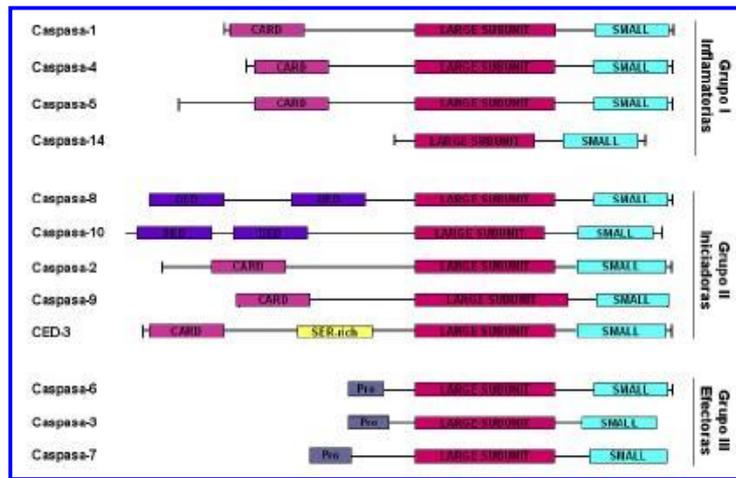


Fig. 18.- Clasificación de las caspasas identificadas en humanos. Obtenida de "Marcé Roca, S. Bases moleculares de la apoptosis inducida por drogas en neoplasias linfoides. Dolors Colomer Pujol (dir), Carles Enric Bastús (dir). Universidad de Barcelona, Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica. Tesis Doctoral. ISBN 84-690-3093-0"

5.2. Poli (ADP-ribosa) polimerasa.

La poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) es una proteína de aproximadamente 116 KDa que, en células no apoptóticas, tiene una importante función en reparación del ADN. En estas células, se encarga de la síntesis de polímeros de ADP-ribosa que se unirán a distintas proteínas (topoisomerasas, histonas, polimerasas, etc) inhibiendo la replicación y transcripción del ADN y permitiendo la reparación del mismo⁷².

En cambio, en células apoptóticas la PARP es diana de una de las caspasas efectoras, la caspasa-3. Esta caspasa proteoliza a la PARP, escindiéndola en dos fragmentos (fig. 19). Uno de 85 KDa., que contiene el dominio C-terminal o catalítico, y otro de 16 KDa., que contiene el dominio

Introducción

N-terminal o de unión al ADN. La proteólisis de la enzima PARP impide la reparación del ADN y permite que la célula entre en apoptosis⁷³.

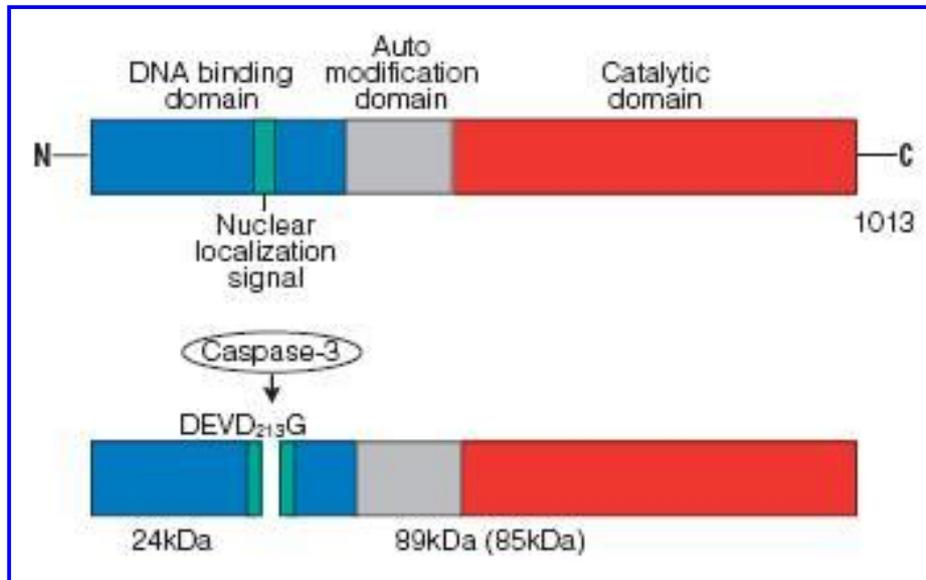


Fig. 19.- Fragmentación de la enzima Poli ADP-Ribosa Polimerasa por la Caspasa-3. Obtenido de “Knaapen M, De Bie M, Muhring J, Kockx M. Cleaved PARP as a marker for apoptosis in tissue sections. *Promega Notes* 1999; 72: 7-9”

BIBLIOGRAFÍA

1. Alward. Glaucoma: los requisitos en oftalmología. Madrid; Ediciones Harcourt S.A.; 2001; 11-12
2. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Parajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. Bull World Health Organ 2004; 82: 844-851
3. Quigley HA. Number of people with glaucoma worldwide. Br J Ophthalmol 1996; 80: 389-393
4. Carretero M. Tratamiento del glaucoma. Avances Farmacológicos 2002; 21: 172-174
5. Friedman DS, et al. Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States. Arch Ophthalmol 2004; 122: 532-538
6. Traverso CE, et al. Direct costs of glaucoma and severity of the disease: a multinational long term study of resource utilisation in Europe. Br J Ophthalmol 2005; 89: 1245-1249
7. Flammer J. Glaucoma. Barcelona; MRA Ediciones; 2004; 80-93
8. Pasquale LR, Kang JH, Manson JE, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE. Prospective study of type 2 diabetes mellitus and risk of primary open-angle glaucoma in women. Ophthalmology 2006; 113: 1081-1086
9. Fechtner RD, Khouri AS. Evolving global risk assessment of ocular hypertension to glaucoma. Curr Opin Ophthalmol 2007; 18: 104-109
10. Catalano RA, Nelson LB. Pediatric Ophthalmology. A text atlas. Connecticut; Appleton & Lange; 1994; 1-8
11. Halpern DL, Grosskreutz CL. Glaucomatous optic neuropathy: mechanisms of disease. Ophthalmol Clin North Am 2002; 15: 61-68. Review
12. Shields MB. Glaucoma. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana; 1987; 15-24

Introducción

13. Macknight AD, McLaughlin CW, Peart D, Purves RD, Carre DA, Civan MM. Formation of the aqueous humor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27: 100-106
14. Gabelt BT, Kaufman PL. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24(5): 612-637. Review
15. To CH, Kong CW, Chan CY, Shahidullah M, Do CW. The mechanism of aqueous humour formation. *Clin Exp Optom* 2002; 85: 335-349
16. Hornova J. Intraocular fluid, its function, production and drainage. *Cesk Slov Oftalmol* 2003; 59: 60-62
17. Flammer J, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21: 359-393. Review
18. Stefansson E, Pedersen DB, Jensen PK, la Cour M, Kiilgaard JF, Bang K, Eysteinnsson T. Optic nerve oxygenation. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24: 307-332. Epub 2004 Dec 20. Review
19. Grieshaber MC, Flammer J. Blood flow in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2005; 16: 79-83. Review
20. Fuchsjäger-Mayrl G, et al. Ocular blood flow and systemic blood pressure in patients with primary open-angle glaucoma and ocular hypertension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 834-839
21. Shields MB. Glaucoma. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana; 1987; 147-148
22. Discapnet. El portal de la discapacidad. Fundación ONCE. Fondo Europeo de Desarrollo Regional. <http://salud.discalpnet.es/Castellano/Salud/Enfermedades/EnfermedadesDiscapitantes/G/Glaucoma/Paginas/cover%20glaucoma.aspx>
23. Kosoko-Lasaki O, Gong G, Haynatzki G, Wilson MR. Race, ethnicity and prevalence of primary open-angle glaucoma. *J Natl Med Assoc* 2006; 98: 1626-1629

Introducción

24. Izzotti A, Di Marco B, De Flora S, Sacca S. Open angle glaucoma: epidemiology, pathogenesis and prevention. *Recenti Prog Med* 2006; 97: 37-45. Review
25. Flammer J. *Glaucoma*. Barcelona; MRA Ediciones; 2004; 45-48
26. Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev Cubana Cardiol* 2000; 14: 55-60
27. Favier A. Oxidative stress in human diseases. *Ann Pharm Fr* 2006; 64: 390-396
28. Trushina E, McMurray CT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 2007; [Epub ahead of print]
29. Seifried HE. Oxidative stress and antioxidants: a link to disease and prevention? *J Nutr Biochem* 2007; 18: 168-171
30. Hansberg W. Biología de las especies oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico* 2002; XXVI: 19-54
31. Boveris A. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm* 2005; 46: 85-89
32. Vaquero F, et al. Revisión del papel de los radicales libres en la secuencia isquemia-revascularización. *Angiología* 1995; 47: 213-226
33. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-USmar VM, Landar A. Free radicals, mitochondria and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res* 2006; 99: 924-932
34. Anderson RE, Kretzer FL, Rapp LM. Free radicals and ocular disease. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 73-86
35. Therond P. Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann Pharm Fr* 2006; 64: 383-389. Review
36. Sery TW, Petrillo R. Superoxide anion radical as an indirect mediator in ocular inflammatory disease. *Curr Eye Res* 1984; 3: 243-252

Introducción

37. Venereo JP. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 2002; 31: 126-133
38. Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1611-1626. Review
39. Korc I, Bidegain M, Martell M. Radicales libres. *Bioquímica y sistemas antioxidantes. Implicancia en la patología neonatal. Rev Med Uruguay* 1995; 11: 121-135
40. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-86. Review
41. García-Triana B, García-Morales O, Clapes S, Rodes L, García-Piñeiro JC. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasa. *Rev Cub Invest Biomed* 1995; 14: 0-0
42. Cisneros E, Pupo J, Céspedes EM. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutation Peroxidasa. *Rev Cub Invest Biomed* 1997; 16: 10-15
43. Céspedes EM, Hernández-Lantigua I, Llópiz N. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Rev Cub Invest Biomed* 1996; 15: 0-0
44. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-626
45. Gilbert DL. The role of pro-oxidants and antioxidants in oxygen toxicity. *Radiat Res* 1963; Suppl 3: 44-53
46. McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055

Introducción

47. Lancaster JR Jr. Nitroxidative, nitrosative and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 1160-1174
48. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992; 266 (5): 68-71
49. Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. Role of peroxynitrite anion in different diseases. *Rev Invest Clin* 2006; 58: 350-358
50. Pacher P, Beckman JS, Liandet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424. Review
51. Radi R. Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 720-721
52. Sonzini B. Neurotransmisores. Guías de Neuro. <http://www.guiasdeneuro.com.ar/neurotrans.htm>
53. Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr* 2007; 137 (6 Suppl 1): 1539S-1547S
54. Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2007; 112 (12): 583-597. Review
55. Ricci LC, Wellman MM. Monoamines: biochemical markers of suicide? *J Clin Psychol* 1990; 46: 106-116
56. Marcelis M, Suckling J, Hofman P, Woodruff P, Bullmore E, van Os J. Evidence that brain tissue volumes are associated with HVA reactivity to metabolic stress in schizophrenia. *Schizophr Res* 2006; 86 (1-3): 45-53.
57. Puig MV, Celada P, Artigas F. Serotonergic control of prefrontal cortex. *Rev Neurol* 2004; 39 (6): 539-547. Review
58. Tovar JA. Programa del Curso “Neurobioquímica”. Departamento de Nutrición y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.

Introducción

<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/>

[Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/serotonina.htm](http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/neurobioquimica/serotonina.htm)

59. Muñoz H, Vargas A. Síndrome serotoninérgico. *Med Unab* 2004; 7: 144-150
60. Contreras NA, Mancillas LG. El papel de la serotonina en la dependencia al alcohol. Bases e implicaciones clínicas. *Médica Sur* 2005; 12: 3-10
61. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM* 2003; 22: 100-106
62. Cascales M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal Real Acad Nal Farm* 2003; 69: 36-64
63. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res* 2007; 17: 759-771
64. Guo L, Salt TE, Maass A, Luong V, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF. Assessment of neuroprotective effects of glutamate modulation on glaucoma-related retinal ganglion cell apoptosis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 626-633
65. Mittag T, Schmidt KG. Mechanisms of neuroprotection against glaucoma. *Ophthalmologie* 2004; 101: 1076-1086
66. Nucci C, Tartaglione R, Rombolà L, Morrone LA, Fazzi E, Bagetta G. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat. *Neurotoxicology* 2005; 26: 935-941
67. Nelson EJ, Connolly J, McArthur P. Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol Cell* 2003; 95: 3-8
68. Dohi K, Ohtaki H, Inn R, Ikeda Y, Shioda HS, Aruga T. Peroxynitrite and caspase-3 expression after ischemia/reperfusion in mouse cardiac arrest model. *Acta Neurochir Suppl* 2003; 86: 87-91
69. Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspases: apoptosis inducing molecules. *Gac Med Mex* 2003; 139: 493-499
70. <http://es.wikipedia.org/wiki/Caspasa>

Introducción

71. Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* 2004; 13: 1979-1987
72. Pérez Mdel R, Dubner D, Michelín S, Gisone P, Carosella E. Telomeres and genomic damage repair. Their implication in human pathology. *Medicina (B Aires)* 2002; 62: 593-603
73. Affar EB, Germain M, Winstall E, Vodenicharov M, Shah RG, Salvesen GS, Poirier GG. Caspase-3-mediated processing of poly(ADP-ribose) glycohydrolase during apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 2935-2942

Justificación, Hipótesis y Objetivos

Justificación

El glaucoma es una de las principales causas de ceguera en el mundo. Afecta a siete millones de personas en el mundo, pero esta cifra se eleva sustancialmente si consideramos a aquellos individuos que padecen glaucoma aún sin diagnosticar, es decir lo que denominaríamos glaucomas latentes.

Es una enfermedad ligada a la edad, y por lo tanto en los próximos años el número de individuos con glaucoma aumentará considerablemente, en relación directa al aumento de la expectativa de vida de la población. Ante esta perspectiva, las estrategias socio-sanitarias encaminadas a la prevención de la ceguera por glaucoma deberían ser objetivo prioritario para la salud pública mundial.

Existen diversas teorías etiopatogénicas que defienden la función primordial de la hipertensión ocular en la pérdida de visión de los pacientes glaucomatosos y que a su vez relacionan el aumento de la tensión intraocular con la pérdida de células ganglionares de la retina y fibras del nervio óptico, es decir con la progresión de las lesiones neurodegenerativas, siendo el mayor exponente la atrofia óptica y la ceguera irreversible.

Sin embargo, el debate que surge al valorar la importancia individual de estas teorías y la preponderancia de unas sobre otras es de gran actualidad. No hay acuerdo unánime en cual de ellas es la causa y cual o cuales de ellas contribuyen a manifestar los efectos.

En este sentido hay que tener en cuenta la existencia de un glaucoma normotensivo, que igualmente conduce a la ceguera, y que tomándolo como modelo apoyaría el hecho de que deben existir otros factores que también contribuyan, con el aumento de la presión intraocular, a la progresión del daño glaucomatoso. En ausencia de datos determinantes, el estudio de estos factores puede ayudarnos a conocer y controlar mejor la evolución de la enfermedad y, por tanto, prevenir la ceguera por glaucoma.



Fig. 20.- Esquema de los mecanismos etiopatogénicos del GPAA

Hipótesis

En este proyecto de Tesis Doctoral pretendemos analizar en pacientes con GPAA la teoría mecánica y la teoría vascular del glaucoma, evaluando los mecanismos de estrés oxidativo, estudiando la implicación de diversas moléculas en la homeostasis del humor acuoso, e investigando la función de los neurotransmisores en las señales que relacionan la hipertensión ocular (HTO) con la muerte por apoptosis de las células ganglionares de la retina y la pérdida subsecuente de las fibras del nervio óptico, que conducen a la atrofia óptica y la ceguera glaucomatosa.

Objetivos

Para llevar a cabo el estudio de estos factores y su relación con los mecanismos etiopatogénicos del glaucoma, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar el estrés oxidativo en el humor acuoso de pacientes con GPAA.
 - 1.1. Formación de especies reactivas del oxígeno (EROS) por la vía de la peroxidación lipídica y sus metabolitos reactivos (malonildialdehído, MDA).

Justificación, Hipótesis y Objetivos

- 1.2. Actividad de los enzimas de defensa antioxidante superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y actividad antioxidante total (AOXT).
2. Medir la concentración de Óxido Nítrico (ON)
3. Estudiar la expresión y cuantificación de Neurotransmisores en el humor acuoso de pacientes en estadio quirúrgico de su enfermedad glaucomatosa (Serotonina: SE).
4. Estudiar la expresión y cuantificación de proteínas implicadas en apoptosis en el humor acuoso en sujetos intervenidos de GPAA (poli (ADP-ribosa) polimerasa: PARP).

Por lo tanto el fin de este trabajo es analizar los posibles mecanismos etiopatogénicos del GPAA, encontrar un marcador o marcadores biológicos de la progresión del GPAA y ofrecer la posibilidad de abordar nuevas estrategias terapéuticas que nos ayuden en la prevención de la ceguera por atrofia óptica glaucomatosa.

Material y Métodos

1. Material

Para llevar a cabo este Proyecto de Tesis Doctoral, hemos diseñado un trabajo a desarrollar en pacientes y con el cual abordamos las teorías etiopatogénicas del glaucoma. Para ello, se obtuvieron intraoperatoriamente muestras del humor acuoso para determinar, mediante ensayos bioquímicos, la actividad oxidativa y antioxidante y diversas moléculas implicadas en la homeostasis del humor acuoso, en relación a la etiopatogenia del glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA).

Seleccionamos aleatoriamente, y siguiendo los criterios de inclusión y exclusión establecidos para este estudio 938 pacientes de ambos sexos y edades comprendidas entre los 40 y 90 años de edad (71 ± 8 años) que acudieron a las consultas de oftalmología del Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia), Centro de Especialidades de Monteolivete (Valencia) y Hospital Punta de Europa (Algeciras, Cádiz) entre los años 2003-2007. Estos individuos fueron divididos en dos grupos:

- 1) Grupo Glaucoma: aquellos que necesitaban cirugía antiglaucomatosa (GG, n = 461). Todos estos pacientes presentaban glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA). Ninguno presentaba otra patología ocular.
- 2) Grupo Cataratas: individuos que necesitaban cirugía de cataratas (GC, n = 477). Estos pacientes constituyeron el grupo comparativo, no control, y no presentaron patologías oculares diferentes de esta.

De estos 938 individuos, 105 (46 GG, 59 GC) se perdieron por errores en la conservación y/o procesamiento de las muestras obtenidas de ellos. Todos los individuos fueron seleccionados en base a los criterios de inclusión y exclusión diseñados para el estudio. El listado de los criterios de

exclusión y las características demográficas de los sujetos seleccionados, se muestran en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2. Criterios de exclusión
Grupo Glaucoma Primario de Angulo Abierto (GG)
Tener un tipo de glaucoma diferente del primario de ángulo abierto u otra patología ocular.
Edad < 41 años o > 90 años. Padeecer cáncer o Enf. Degenerativa.
Grupo Cataratas (GC)
Tener cualquier patología ocular diferente de las cataratas.
Edad <41 años o > 90 años. Padeecer cáncer o Enf. Degenerativa

Tabla 3: Características demográficas de los grupos de estudio			
	Grupo Glaucoma	Grupo Cataratas	p-valor**
N	415 (46)	418 (59)	
Hombres	190	179	
Mujeres	225	239	
IM*	0,844	0,749	
Edad media	70,548	71,309	0,196

*IM: Índice Masculinidad (n° Hombres / n° Mujeres)

** Prueba T para muestras independientes

Entre paréntesis se muestra el número de sujetos perdidos para el estudio

Cuando los pacientes acudían a las consultas eran sometidos a un examen oftalmológico completo: agudeza visual, fondo de ojo, retinografías, presión intraocular, campimetría y análisis de fibras nerviosas por GDx. En los pacientes con cataratas se realizó la campimetría y el análisis GDx sólo cuando su agudeza visual lo permitió. Las figuras 21 y 22 son ejemplos de campos visuales y GDx.

Material y Métodos



Fig 21.- Ejemplo de campo visual. Imagen A: campo visual normal; imagen B: campo visual afectado.

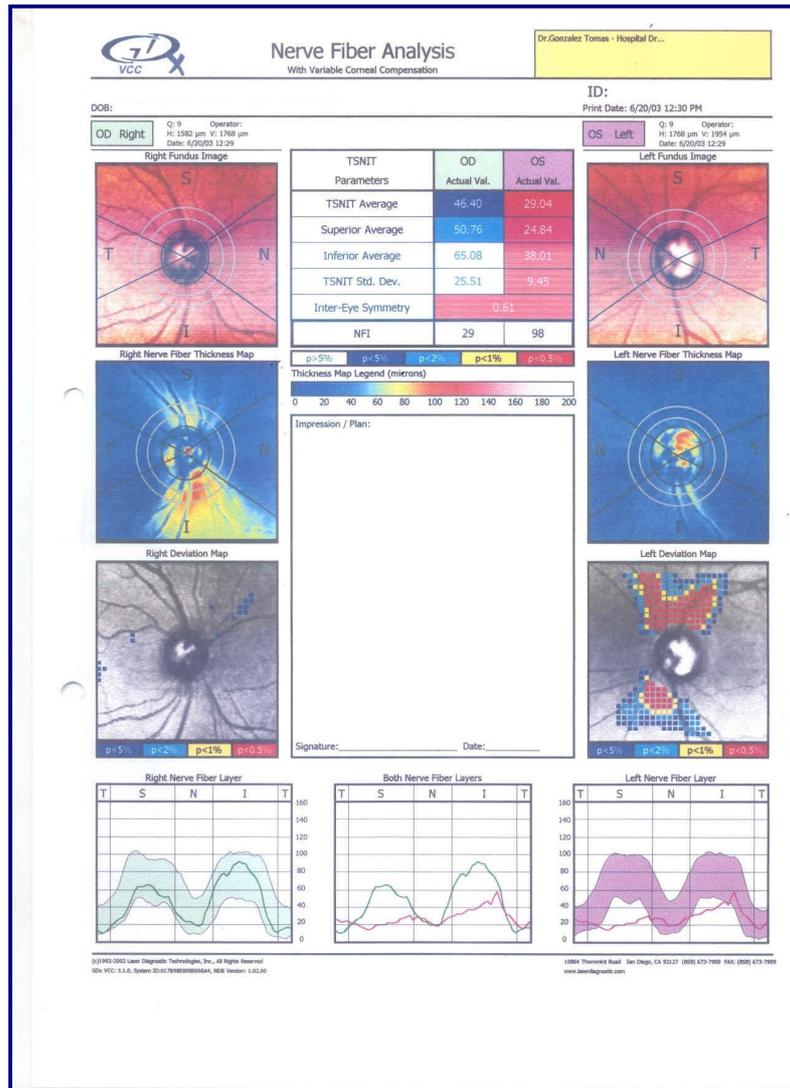


Fig 22.- Ejemplo de GDx. Ojo derecho normal; ojo izquierdo muestra pérdida de fibras nerviosas.

Material y Métodos

La historia clínica indicó la fecha del diagnóstico, la duración del proceso y la evolución de las cifras de PIO, de los campos visuales y del análisis por medio del GDx. Además se valoraron tratamientos hipotensores anteriores y el número, tipo y eficacia del/los tratamientos actuales. Según el criterio del oftalmólogo y el riesgo de progresión de la enfermedad se recomendó la cirugía antiglaucomatosa previo informe al paciente y firma del consentimiento correspondiente. Se plasmó el tipo de cirugía realizada y el criterio para la elección de la técnica quirúrgica.

El criterio quirúrgico para la intervención de cataratas se tomó en función de las necesidades del paciente (vida laboral activa o no), de la edad y de la agudeza visual.

Ya en el quirófano, y tras paracentesis de inicio, se recogió en criotubo una muestra de humor acuoso de cada paciente (0.20-0.25 mL) usando una jeringa de 27g y un microscopio quirúrgico Zeiss (fig. 23).

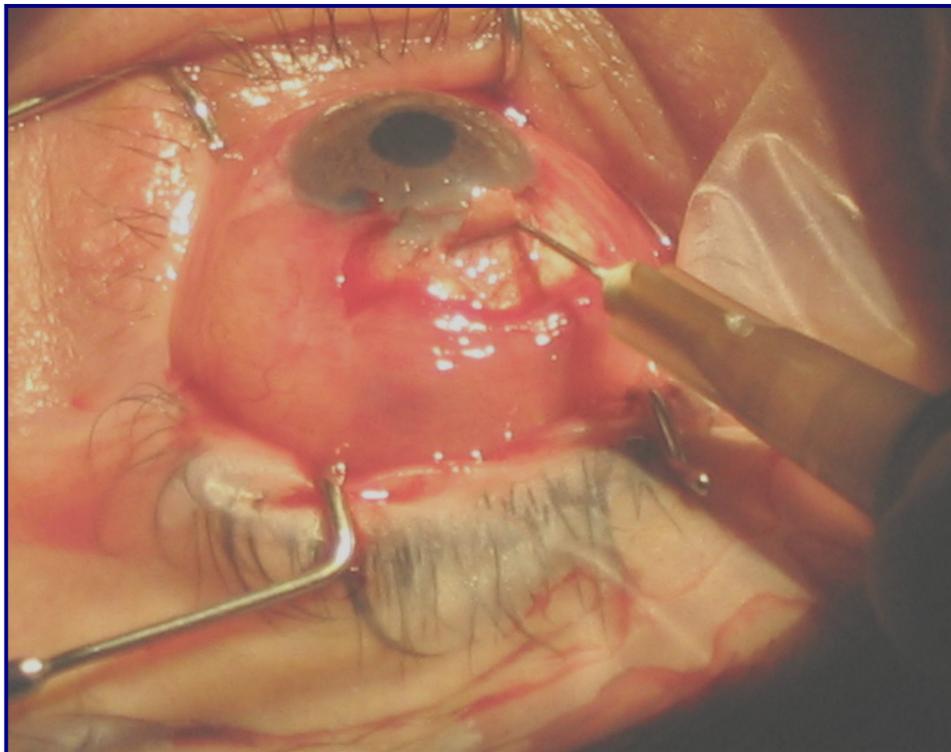


Fig 23.- Muestra la técnica de extracción del humor acuoso mediante una jeringa estéril, al inicio de la cirugía.

Material y Métodos

El procedimiento de extracción de muestras siguió un protocolo establecido por nosotros. Las muestras de cada uno de los centros del estudio fueron obtenidas intraoperatoriamente, depositadas en criotubos, identificadas y congeladas a -20°C hasta concluir la cirugía, transportándolas posteriormente en nieve carbónica al laboratorio de la Unidad de Investigación Oftalmológica (Valencia) o al laboratorio de análisis clínicos del Centro correspondiente, donde fueron congeladas y almacenadas a -80°C en un congelador NUAIRE UN-6514E (fig. 24) y en su momento transportadas en condiciones óptimas para muestras congeladas, hasta recogerlas y almacenarlas en el laboratorio de la Unidad de Investigación Oftalmológica (Valencia) donde se mantuvieron hasta el procesamiento.



Fig 24.- Congelador vertical para almacenamiento y conservación a -80°C de las muestras del estudio. Unidad Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia”

2. Metodología

En primer lugar realizamos un estudio preliminar en 90 pacientes de ambos sexos según los criterios de inclusión y exclusión y que fueron distribuidos en los dos grupos de estudio, grupo de pacientes intervenidos de glaucoma (n = 50) y grupo operado de cataratas (n = 40). Registramos todos los datos de la anamnesis y de la exploración oftalmológica, los datos individuales y las características de la enfermedad, así como la extracción del humor acuoso intraoperatoriamente, para realizar los ensayos bioquímicos para determinación del estado oxidativo y antioxidante total. Este trabajo preliminar¹ fue esencial para validar la recogida de datos y poner en marcha los protocolos de las técnicas enzimático-colorimétricas para la determinación del estrés oxidativo. Una vez conformado el diseño del estudio procedimos a realizar estas y las demás determinaciones de las moléculas que pretendemos estudiar en relación a la enfermedad glaucomatosa.

A continuación describimos las técnicas bioquímicas empleadas.

2.1. Estrés Oxidativo

2.1.1. Determinación de la actividad oxidante.

Mediante la medida del malonildialdehído (MDA) como producto de la peroxidación lipídica, siguiendo la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA) y especies reactivas²⁻⁴ que reaccionan con él (TBARS). Este producto se denomina de ahora en adelante con los caracteres internacionales MDA-TBARS.

Primero preparamos en tubos eppendorf los patrones, de concentraciones crecientes de MDA, a partir de MDA stock (1,1,3,3-Tetraetoxipropano, SIGMA), según se muestra la siguiente tabla y según ensayos publicados anteriormente⁵⁻⁷.

Tabla 4. Preparación de los patrones para la determinación de MDA			
	MDA (μM)	V_{MDA} (μL)	V_{PBS} (μL) [*]
P1	0	0	60
P2	1	30	30
P3	3	9	51
P4	5	15	45
P5	10	30	30

* PBS 0.01M

Una vez preparados, pasamos 50 μL de cada uno de los patrones a tubos de vidrio, en los que realizaremos el resto de la técnica.

Las muestras a analizar las tenemos almacenadas en criotubos. De ellos, cogemos un volumen de 50 μL que pasamos también a tubos de vidrio. Una vez tenemos los distintos patrones y muestras en estos tubos de vidrio, continuaremos con la técnica, realizando los siguientes pasos:

1. Añadir 80 μL de Sodium Dodecil Sulfate 7% (SDS)
2. Añadir 800 μL de HCl 0.1 N
3. Añadir 120 μL de ácido fosfotúngstico 1%
4. Añadir 400 μL de TBA 0.67%. Se forma el complejo MDA-TBA (fig. 25)
 - Mezclar, tapar y calentar a 98°C durante 1 hora (en oscuridad)
5. Añadir 800 μL de n-butanol
 - Centrifugar a 2800g durante 10 minutos

⇒ Cargar 250 μL en placa microtiter y leer la fluorescencia (Fluoroscán Ascent FL, figura 26). Longitud de onda de excitación 544 nm, emisión 593 nm.

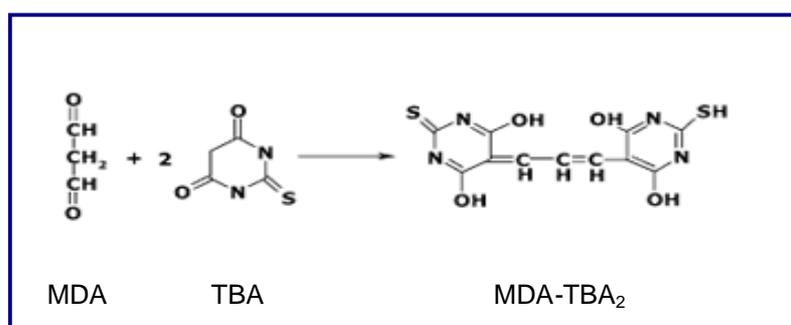


Fig 25.- Esquema de la reacción entre el malonildialdehído y el ácido tiobarbitúrico. Tomada de Northwest Life Science Specialties L.L.C.

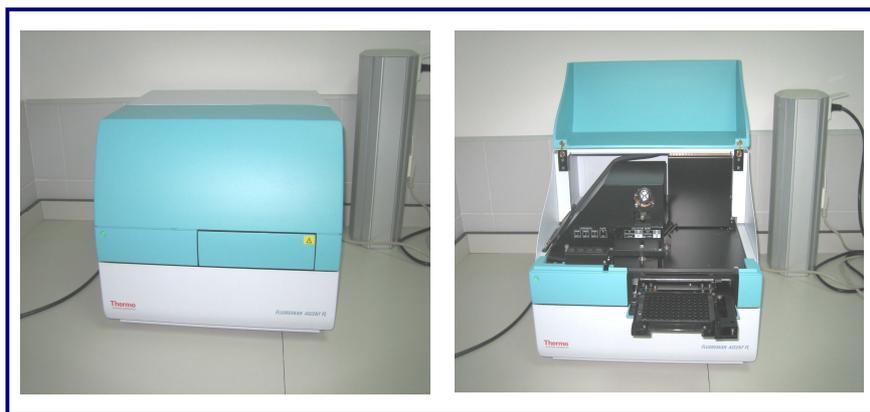


Fig 26.- Fluorímetro Fluoriscan Ascent FL usado en la determinación del MDA.

2.1.2. Determinación de la actividad enzimática SOD.

Con un preparado comercial de Laboratorios Randox S.L. (RANSOD, ref. SD125). La enzima superóxido dismutasa cataliza la reacción de dismutación del anión superóxido, generando oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.

En esta técnica, producimos anión superóxido a partir de xantina y xantina oxidasa (XOD). El anión superóxido reacciona con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (INT), formándose colorante formazán (fig. 27), cuya intensidad de color puede medirse por espectrofotometría (absorbancia 505 nm, Dynatech MR 7000), según descripciones anteriores⁸.

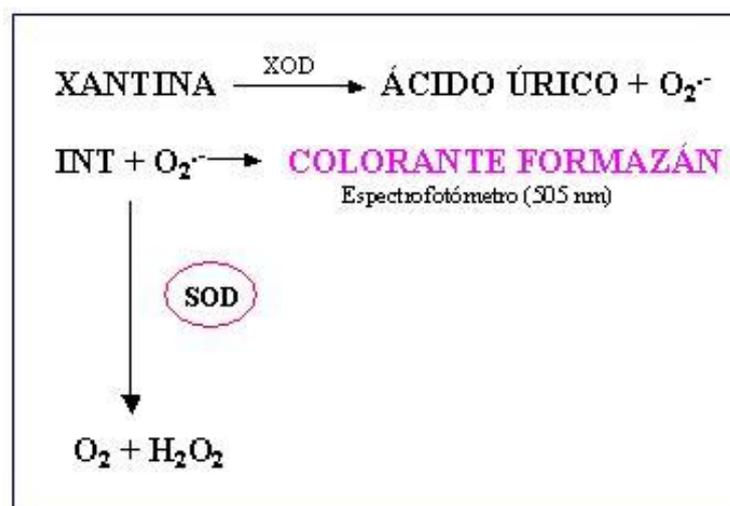


Fig 27.- Reacciones bioquímicas en la determinación de la actividad antioxidante SOD.

Material y Métodos

La presencia de SOD reducirá la formación de este colorante, de manera proporcional a su concentración^{9,10}.

El kit incluye los siguientes reactivos:

	Concentración Inicial		Concentración Inicial
SUSTRATO MIXTO		TAMPÓN	
Xantina	0.05 mmol/L	CAPS	40 mmol/L, pH = 10.2
I.N.T.	0.025 mmol/L	EDTA	0.94 mmol/L
XANTINA OXIDASA	80 U/L	PATRÓN	5.40 U/mL

Necesario pero no suministrado en el kit: Muestra Diluyente (0,01 mol/L Tampón Fosfato, pH = 7.0)

Antes de proceder con el ensayo hay que preparar las soluciones del modo que se indica a continuación:

1. Sustrato Mixto. Reconstituir un vial de Sustrato Mixto 1 con 20 mL de Tampón.
2. Tampón. Listo para usar.
3. Xantina Oxidasa. Reconstituir el contenido de un vial de Xantina Oxidasa con 10 mL de agua bidestilada.
4. Patrones. Reconstituir el contenido de un vial de Patrón con 10 mL de agua bidestilada.

Posteriormente las diluciones de este patrón se prepararon con muestra diluyente. Para construir la curva patrón se hicieron las siguientes diluciones:

Tabla 6. Preparación de los patrones para la determinación de la actividad de la enzima antioxidante SOD		
PATRONES	Vol. Solución Patrón	Vol. Muestra Diluyente
S6	Patrón neto	-----
S5	5 mL S6	5 mL
S4	5 mL S5	5 mL
S3	5 mL S4	5 mL
S2	3 mL S3	6 mL
S1	-----	Muestra diluyente neta

Los pasos que seguimos en esta técnica son los siguientes:

- Preparar un patrón con concentración conocida de SOD.
- Cargar en una placa multipocillos (96 pocillos) 10 μ L de cada uno de los patrones y de las muestras.
- Añadir 340 μ L de Sustrato Mixto (xantina + INT) y mezclar bien.
- Añadir 50 μ L de XOD y mezclar.

⇒ Leer la absorbancia A_1 (550 nm) al cabo de 30 segundos y empezar a cronometrar el tiempo simultáneamente. Leer la absorbancia A_2 (550 nm) al cabo de 3 minutos (fig. 28).

Para el cálculo de la concentración de SOD, aplicamos las siguientes fórmulas:

$(A_2 - A_1)/3 = \Delta A/\text{min de patrón o muestra}$
$\text{patrones: \% inhibición} = 100 - [(\Delta A_{\text{patrón}/\text{min}} \times 100)/(\Delta A_{S1/\text{min}})]$
$\text{muestras: \% inhibición} = 100 - [(\Delta A_{\text{muestra}/\text{min}} \times 100)/(\Delta A_{S1/\text{min}})]$

Material y Métodos

Con estos valores, realizamos la recta patrón (% inhibición frente al Log_{10} de la concentración de SOD). Extrapolamos en la recta el porcentaje de inhibición para cada muestra y obtenemos el Log_{10} la concentración de SOD. Hacemos el antilogaritmo y obtenemos la concentración de SOD (U/mL) para cada muestra. Multiplicar, si es necesario, por el factor de dilución.

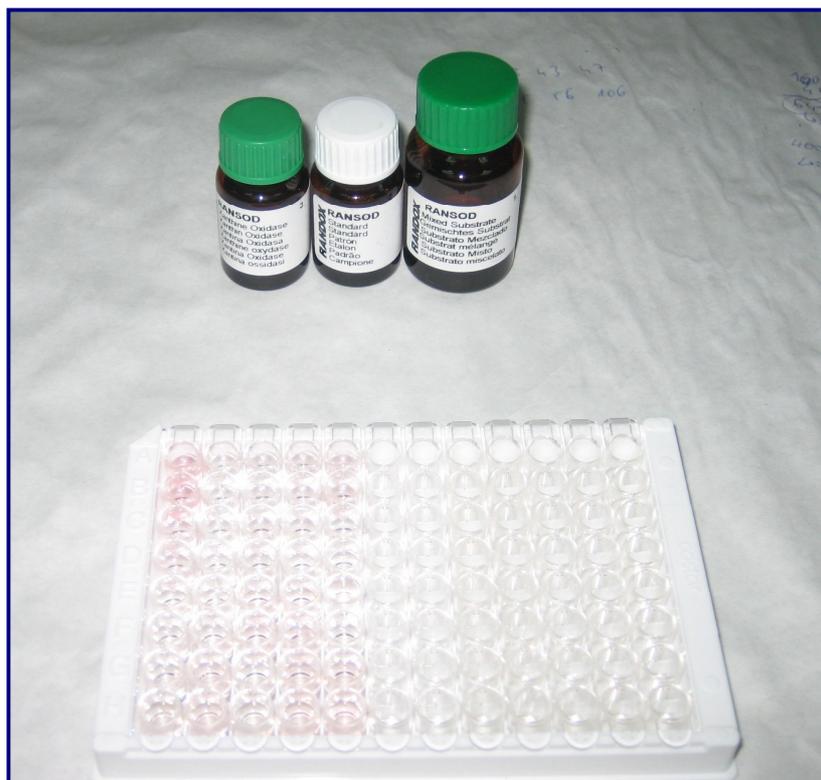


Fig 28.- La fotografía muestra la placa instantes antes de realizar la primera lectura de absorbancia.

2.1.3. Determinación del estado antioxidante total.

Siguiendo una técnica enzimático-colorimétrica mediante un preparado comercial de Laboratorios Randox S.L. (Total Antioxidant Status, ref. NX2332). En esta técnica se hace reaccionar la ferrilmioglobina y el ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolín sulfonato]) para obtener el radical catión ABTS, que presenta color verde-azulado, cuya intensidad de color puede medirse en espectrofotómetro a 600 nm (Dynatech MR 7000; figs. 29 y 30). La presencia de

antioxidantes inhibe la formación de este catión, de modo que se producirá una reducción en la intensidad de la coloración, proporcional a la concentración de antioxidantes de la muestra¹¹⁻¹⁴.

Fig 29.- Fotografía del lector de placas Dynatech MR7000 utilizado en la determinación del estado antioxidante total.

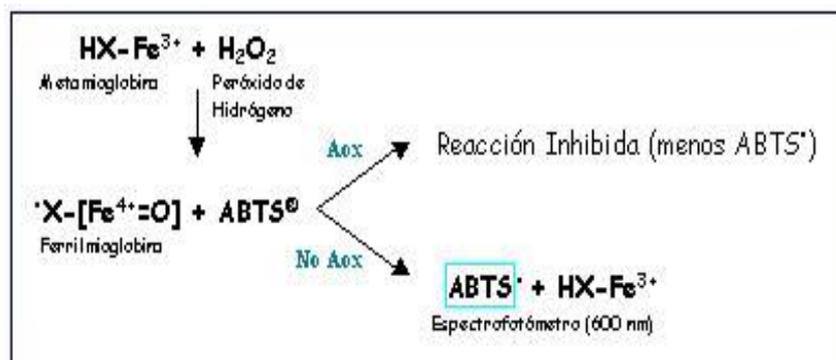


Fig 30.- Reacciones bioquímicas que tienen lugar en la determinación del estado antioxidante total.

Los reactivos incluidos en el kit son los que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7. Reactivos incluidos en el kit TOTAL ANTIOXIDANT STATUS, de Laboratorios RANDOX S.L.			
	Concentración Inicial		Concentración Inicial
TAMPÓN		CROMÓGENO	
Tampón fosfato salino	80 mmol/L, pH = 7.4	Metamioglobina	6.1 µmol/L
SUSTRATO		ABTS	610 µmol/L
Peróxido de hidrógeno	250 µmol/L	PATRÓN*	Lote específico

*6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-ácido carboxílico

La preparación de los reactivos se hizo de la siguiente manera:

1. Tampón. Listo para usar
2. Cromógeno. Reconstituir un vial de cromógeno con 10 mL de tampón
3. Sustrato. Diluir 1 mL de sustrato con 1.5 mL de tampón
4. Patrón. Reconstituir un vial de patrón con 1 mL de agua destilada.

Material y Métodos

Una vez preparados los reactivos, procedemos con la técnica, basándonos en ensayos previos¹⁵:

- Cargar en placa multipocillos (96 pocillos) 10 μL de patrón, blanco y de cada una las muestras.
- Añadir 250 μL de cromógeno
 \Rightarrow Mezclar y leer la absorbancia A1 (600 nm)
- Añadir 50 μL de sustrato
 \Rightarrow Mezclar y leer la absorbancia A2 (600 nm) después de exactamente 3 minutos

Una vez leídas las absorbancias, calcular la diferencia entre A2 y A1.

$$A2 - A1 = \Delta A \text{ de muestra/patrón/blanco}$$

La concentración del antioxidante total se calculó con la siguiente fórmula, siendo el “Factor” = concentración del patrón / ($\Delta A_{\text{blanco}} - \Delta A_{\text{patrón}}$)

$$\text{Antioxidante total (mmol/L)} = \text{Factor} \times (\Delta A_{\text{Blanco}} - \Delta A_{\text{Muestra}})$$

2.1.4. Determinación de la actividad enzimática glutathion peroxidasa.

El ensayo lo realizamos mediante un preparado comercial de Laboratorios Randox S.L. (RANSEL, ref. RS506), basado en el método de Paglia y Valentine¹⁶. La GPx cataliza la oxidación del glutathion reducido (GSH) por hidropéroxido de cumene, produciéndose de esta forma glutathion oxidado (GSSG). Este GSSG es inmediatamente reducido, en presencia de la enzima glutathion

Material y Métodos

reductasa (GSHR) y NADPH, que se oxidará a NADP^+ . Medimos la disminución de absorbancia a 340 nm. (Dynatech MR 7000).

En el kit se incluyen los siguientes reactivos (fig. 31):

Tabla 8. Reactivos incluidos en el kit RANCEL, de Laboratorios RANDOX S.L.	
	Concentración Inicial
TAMPÓN	
Tampón fosfato salino	0.05 mmol/L, pH = 7.2
EDTA	4.3 mmol/L
REACTIVO	
Glutation	4 mmol/L
Glutation Reductasa	≥ 0.5 U/L
NADPH	0.34 mmol/L
HIDROPERÓXIDO CUMENE	0.18 mmol/L
AGENTE DILUYENTE	



Fig 31.- Fotografía del kit y los reactivos que incluye.

Material y Métodos

Preparación de los reactivos:

1. Reactivo. Reconstituir un vial con 30 mL de tampón.
2. Tampón. Listo para usar.
3. Hidroperóxido cumene. Diluir 10 μL con 10 mL de agua bidestilada y mezclar vigorosamente.
4. Agente diluyente. Reconstituir un vial con 200 mL de agua bidestilada.

Procedimiento:

- Cargar en placa microtiter 20 μL de agua destilada (Blanco)
- Cargar 20 μL de muestra
- Añadir 1 mL de reactivo
- Añadir 40 μL de hidroperóxido de cumene
 - \Rightarrow Mezclar y leer A1 después de 1 minuto
 - \Rightarrow Leer A2 y A3 después de 1 y 2 minutos respectivamente

Para los cálculos, primero calculamos el $\Delta A_{340}/\text{min}$ y restamos el valor del blanco al de la muestra. Luego aplicamos la siguiente fórmula:

$$\text{GPx (U/L)} = 8412 \times \Delta A_{340}/\text{min}$$

2.2. Estrés nitrosativo.

2.2.1. Óxido Nítrico Total.

La determinación del óxido nítrico total la realizamos mediante un preparado comercial de *R&D Systems*. El ON es un compuesto con una vida media muy corta, por lo que no podemos utilizar métodos convencionales de detección. En cambio, como la mayor parte del ON en el organismo se encuentra en forma de nitrito y nitrato, podemos utilizar la concentración de estos aniones para realizar una medida cuantitativa de la producción global de ON. Lo primero que haremos es convertir el nitrato a nitrito mediante la enzima nitrato reductasa. Posteriormente, convertiremos todo el nitrito en un cromóforo, producto de la reacción de Griess (fig. 32), que absorbe luz visible a 540-570 nm¹⁷⁻¹⁹. (Personal Lab Junior, Biochem Immunosystems)

Reactivos incluidos en el kit:

- Nitrato reductasa.
- Tampón de almacenamiento nitrato reductasa.
- NADH.
- Nitrato estándar.
- Tampón concentrado (10X).
- Reactivo de Griess I.
- Reactivo de Griess II.

Es conveniente diluir las muestras con tampón (1X) antes de proceder con el ensayo (relación 1:2). También es recomendable ultrafiltrar las muestras para eliminar las proteínas, ya que éstas interfieren en la reacción de Griess.

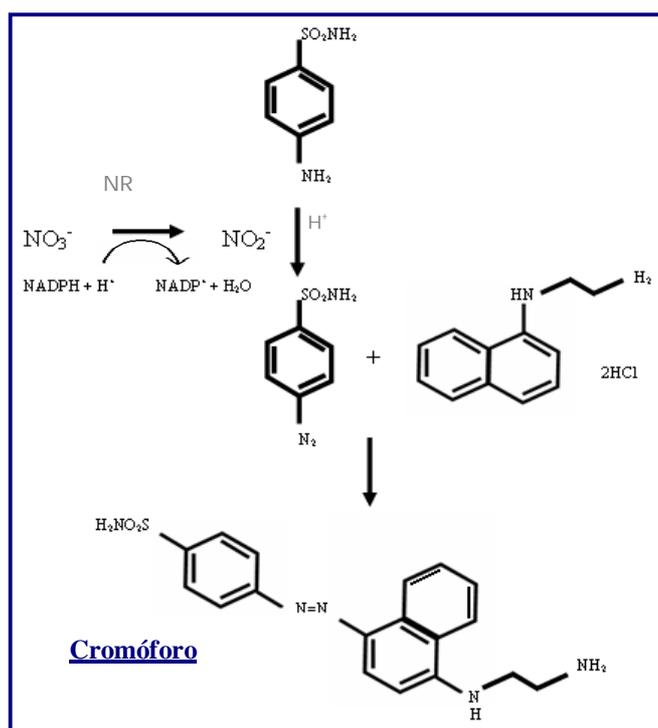


Fig. 32.- Esquema de la conversión de nitrato en nitrito y reacción de Griess.

Antes de empezar con la técnica, hemos de preparar los reactivos del modo que explicamos a continuación:

1. Tampón (1X). Diluir 30 mL de tampón concentrado (10X) en agua destilada hasta un volumen de 300 mL.
2. NADH.
 - ⇒ Reconstituir un vial de NADH con 1 mL de agua destilada. Esperar 3 minutos y agitar en vórtex. Mantener tapado en hielo durante la realización del ensayo.
 - ⇒ Inmediatamente antes de usar, diluir 900 μL de NADH con 1.8 mL de agua destilada. Vórtex. Mantener en hielo durante la realización del ensayo.

3. Nitrato Reductasa.

⇒ Reconstituir el vial de Nitrato Reductasa con 1 mL de tampón de almacenamiento nitrato reductasa. Agitar en vórtex vigorosamente y mantener durante 15 minutos a temperatura ambiente. Agitar otra vez y mantenerlo otros 15 minutos a temperatura ambiente. Agitar y mantener en hielo durante la realización del ensayo.

⇒ Inmediatamente antes de usar, diluir la nitrato reductasa de la siguiente forma:

- Nitrato Reductasa (μL) = (n° pocillos + 2) x 5
- Tampón (μL) = volumen paso “a” x 4
- Añadir volúmenes “a” y “b” a tubo y agitar (vórtex)
- Guardar en hielo y usar dentro de los 15 minutos siguientes a la dilución

4. Nitrato Estándar. Preparar según el esquema que muestra la figura 33:

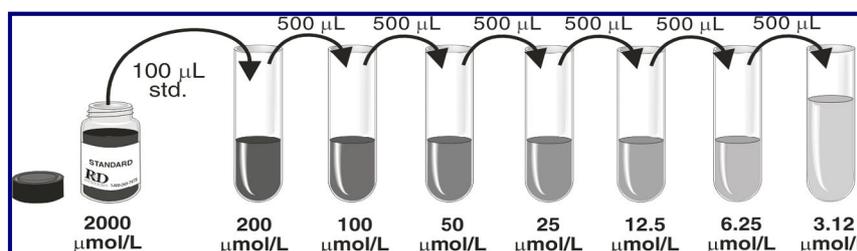


Fig 33.- Muestra la técnica de preparación de los patrones para determinación del ON.. Tomada de R&D Systems

Una vez preparados los diferentes reactivos que utilizaremos, seguimos el siguiente procedimiento (en placa de 96 pocillos):

- Añadir 200 µL de Tampón (1X) a los pocillos “blanco”
- Añadir 50 µL de Tampón (1X) a los pocillos “estándar cero”
- Añadir 50 µL de cada “estándar” o “muestra” (diluida) a los restantes pocillos
- Añadir 25 µL de NADH a todos los “estándares” y “muestras”

Material y Métodos

5. Añadir 25 μL de Nitrato Reductasa a todos los “estándares” y “muestras”. Mezclar bien.
6. Incubar durante 30 minutos a 37°C.
7. Añadir 50 μL de Reactivo de Griess I a todos los pocillos excepto a los “blancos”
8. Añadir 50 μL de Reactivo de Griess II a todos los pocillos excepto a los “blancos”.
Mezclar bien.
9. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
10. Determinar la densidad óptica mediante lector de placas a 540-570 nm. (fig. 34)

Una vez determinada la densidad óptica creamos la curva estándar, representando la densidad óptica frente a la concentración de nitrito total ($\mu\text{moles/L}$).

Para calcular la concentración de nitrito total en las muestras, extrapolamos los distintos valores de densidad óptica en la curva estándar y multiplicamos por el factor de dilución.



Fig 34.- Personal Lab Junior utilizado en la determinación del Óxido Nítrico

2.3. Determinación de Neurotransmisores

Seguimos el mismo método para la determinación de los diferentes neurotransmisores. La única diferencia fue el estándar utilizado en cada caso. El ensayo se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección electroquímica (DEC), basándose en una modificación del método de Ali²⁰⁻²⁶.

Los reactivos que usamos fueron:

1. Metanol para HPLC (Panreac)
2. Ácido Hepatosulfónico (Fluka)
3. Ácido Perclórico (Merck)
4. EDTA Sodium (Merck)
5. Bifosfato potásico (Merck)
6. Ácido Fosfórico (Aldrich)
7. Agua ultrapura (18.2 MΩ/cm)
8. Estándar (Sigma)
 - 8.1. 5-Hidroxitriptamina (5-HT, Serotonina)
 - 8.2. 5-Hidroxiindolato (5-HIAA)

Previamente al análisis, las muestras de humor acuoso fueron diluidas con ácido perclórico 0,2N (1:3 v/v) y filtradas con un microfiltro de Nylon de 0,2 μm (COSTAR) por centrifugación a 10.000 rpm y 4°C durante 5 minutos.

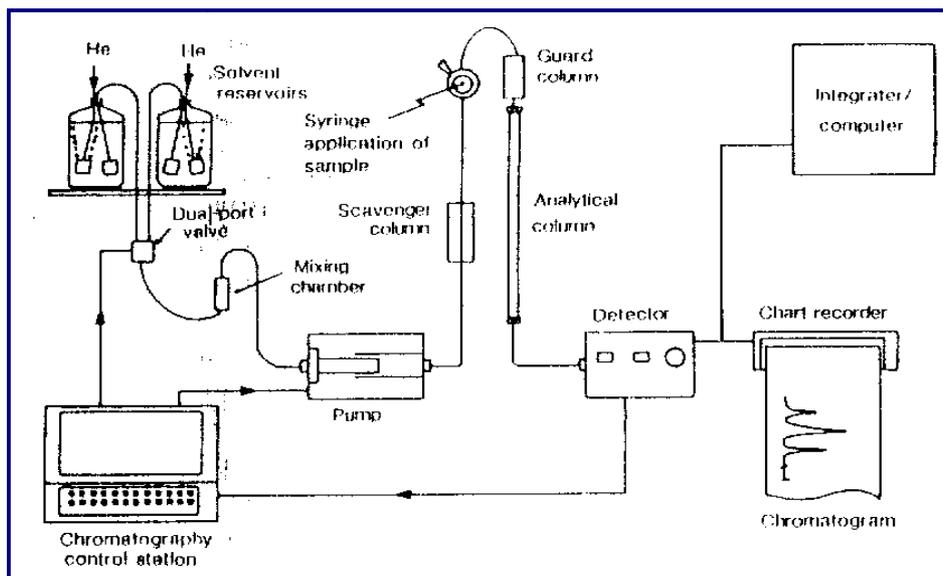


Fig 35.- Esquema del funcionamiento de un HPLC. Tomado de <http://webs.uvigo.es/neuroquimica/pdf-html/fund%20microd.htm>

El análisis se llevó a cabo con cromatógrafo HPLC Wilson Medical Electronics, equipado con un autoinyector LC-234 y un detector electroquímico LC-142, bajo condiciones de fase invertidas con una columna de 3 mm Supelcosil LC 7,5 cm x 4,6 cm. La figura 35 muestra el funcionamiento de un HPLC, y la figura 36 el esquema de una válvula de inyección.

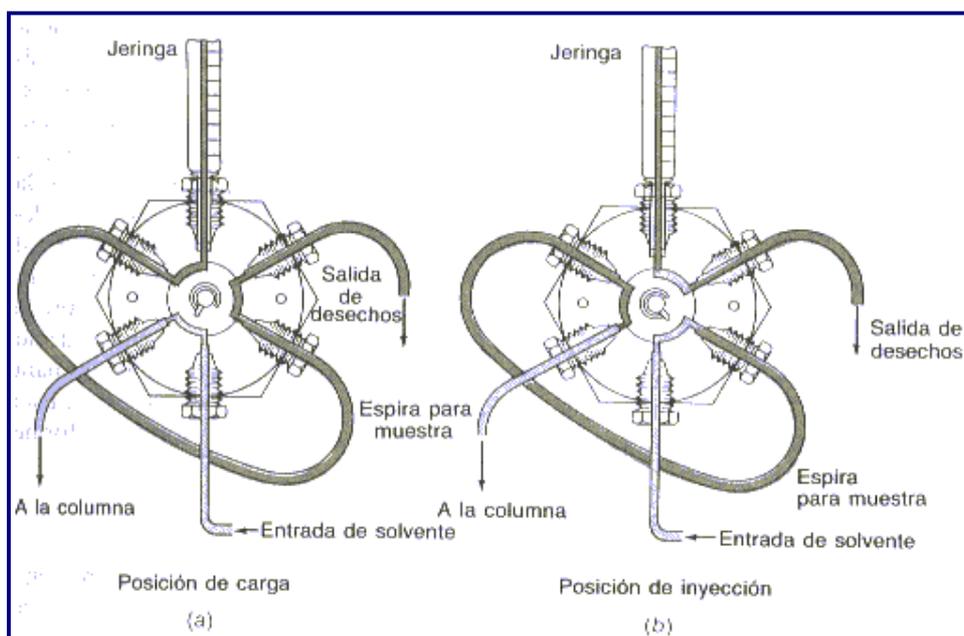


Fig 36.- Válvula de inyección de un HPLC. Tomada de <http://webs.uvigo.es/neuroquimica/pdf-html/fund%20microd.htm>

La identificación se realizó por comparación con los tiempos de retención estándar, determinados por inyecciones de una mezcla estándar a intervalos concretos entre el análisis de las muestras.

La cuantificación se realizó usando las curvas estándar con 5-HT ($r=0,0004$) y 5-HIAA ($r=0,0003$). Las muestras fueron inyectadas por duplicado y el resultado se expresó en ng/mL de humor acuoso.

2.4. Proteínas marcadoras de apoptosis.

La determinación de estas proteínas, en concreto PARP, la realizamos mediante la técnica de Western Blot.

Antes de proceder con la técnica, realizamos un análisis de las muestras para determinar la concentración total de proteínas en cada una de ellas, puesto que en la técnica de Western Blot hemos de cargar 30 μg de proteína / muestra.

La determinación de proteínas la llevamos a cabo mediante la técnica del ácido bicinconínico (BCA, SIGMA). Se trata de un método similar al de Lowry²⁷, y se basa en la formación, bajo condiciones de alcalinidad, de un complejo Cu^{2+} -proteína, seguido de una reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} . Entonces, el BCA reacciona con el cobre reducido para formar un compuesto que absorbe luz a 560 nm, lo que podremos medir por espectrofotometría²⁸⁻³³.

El kit incluye los siguientes reactivos:

- Reactivo A: 1 mL de solución que contiene BCA, carbonato sódico, tartrato sódico y bicarbonato sódico, en hidróxido sódico 0.1 N (pH = 11.25)
- Reactivo B: 25 mL de solución que contiene un 4% (p / v) de sulfato de cobre (II) pentahidratado.

Material y Métodos

- Estándar de proteína: 5 ampollas, de 1 mL cada una, que contienen una solución de 1.0 mg / mL de BSA (suero de albúmina bovina) en cloruro sódico 0.15 M, con 0.05% de azide sódico como conservante.

A partir del estándar de proteína debemos preparar una serie de estándares de diferentes concentraciones de BSA. El modo de preparar estos estándares se muestra en la tabla siguiente.

#	[BSA] $\mu\text{g} / \text{ml}$	Volumen BSA (ml)	Volumen H_2O (ml)
1	1000	75	0
2	800	60	15
3	600	45	30
4	400	30	45
5	200	15	60
6	0	0	75

Del mismo modo, debemos preparar una solución con los reactivos A y B, mezclando 50 partes de reactivo A con 1 parte de reactivo B. Una vez preparada la solución A+B y los estándares, procedemos a realizar el análisis, en una placa de 96 pocillos, del modo que se detalla a continuación:

1. Añadir a los pocillos correspondientes 25 μL de muestra / estándar.
2. Añadir 200 μL de solución A+B a cada pocillo. La relación entre este volumen y el volumen del paso anterior ha de ser 8:1.
3. Incubar a 60°C durante 1 hora.
4. Medir la absorbancia a 562 nm (pueden usarse filtros entre 545-590 nm).

Construimos una curva estándar (absorbancia frente a concentración de BSA, figura 37) y, a partir de ella, calcularemos la concentración en cada una de las muestras, teniendo en cuenta el factor de dilución (en el caso de que hayamos tenido que diluir la muestra).

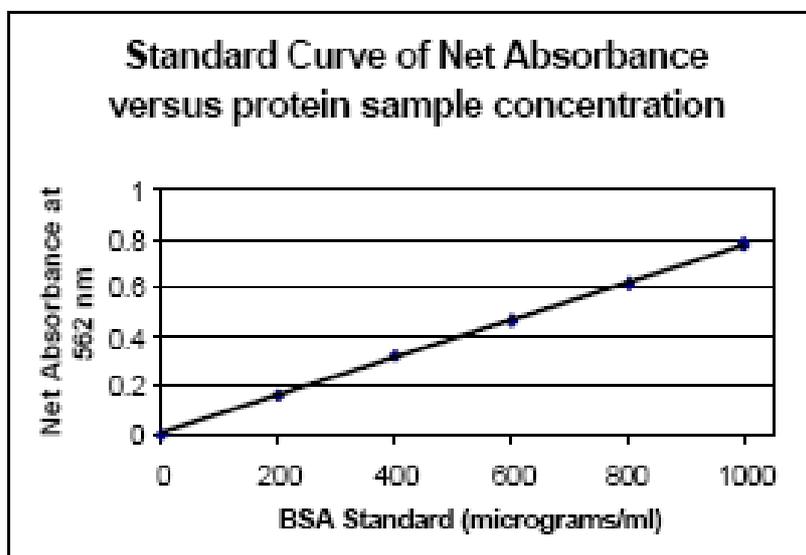


Fig. 37.- Ejemplo de curva estándar en la técnica del ácido bicinónico para el análisis de proteínas Tomado del folleto incluido en el kit de SIGMA, código BCA1 y B9643 .

Una vez determinada la concentración de proteínas de las muestras, realizamos el western blot para la determinación de el marcador de apoptosis^{34,35} (PARP-1) del modo siguiente:

1. Electroforesis:

- Se usaron geles de acrilamida 4-12% Bis-Tris Novex (Invitrogen, NP0323BOX).
- En cada pocillo se cargaron 30 μ g de proteína en tampón de carga (Invitrogen S.A., NuPAGE LDS Sample Buffer 4X, NP0007).
- Previamente, las muestras fueron hervidas a 100°C durante 3 minutos.
- Se usó un marcador de peso molecular de Invitrogen S.A. (MagicMark XP Western Standard, LC5602).

- Se corrió la electroforesis a 150 V durante 90 minutos en el aparato PowerEase 500 Power Suply (Invitrogen S.A., EI8700).

2. Transferencia:

- Una vez terminada la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia.
- Todo el material debía estar empapado de tampón de transferencia 1X (Invitrogen S.A., NuPAGE Transfer Buffer 20X, NP0006).
- Utilizamos una membrana de nitrocelulosa de Invitrogen S.A. (LC2001), con un tamaño de poro de 0.45 μm .
- El montaje del dispositivo de transferencia se realizó con sumo cuidado para evitar la presencia de burbujas, que pueden interferir en este proceso (fig. 38).

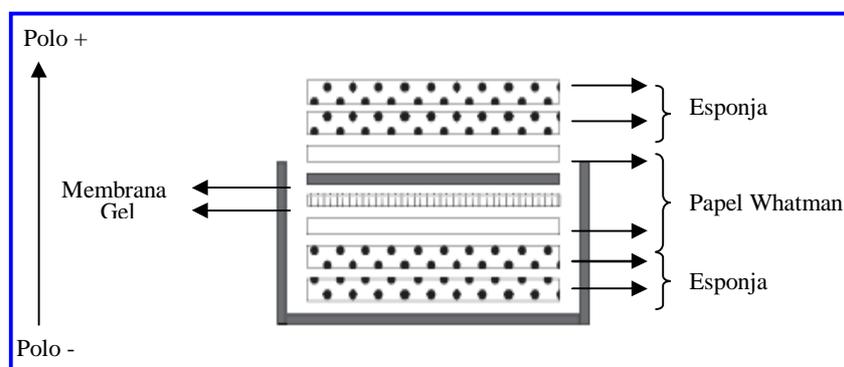


Fig. 38.- Esquema de la preparación del dispositivo de transferencia. Tomado de "General information and protocols for using the NuPAGE[®] electrophoresis system. Version E. October 2003. IM-1001. Invitrogen S.A."

- La transferencia se realizó a 30 V durante 1 hora, utilizando el aparato PowerEase 500 Power Suply (EI8700) de Invitrogen S.A.

3. Inmunodetección de las proteínas:

⇒ Para la detección de la proteína, utilizamos un kit de Invitrogen S.A. (WesternBreeze Chromogenic Kit Anti-Rabbit, WB7105), y antes de proceder con la técnica, hemos de preparar las soluciones que necesitaremos:

1. Solución de Bloqueo:	agua ultrafiltrada	14 mL
	diluyente A	4 mL
	diluyente B	2 mL
	<hr/>	
	TOTAL	20 mL
2. Diluyente Anticuerpo Primario:	(relación de 1:1000 a 1:5000)	
	10 mL de Solución de Bloqueo	
	10 µL de Anticuerpo Primario	
Solución de Lavado del		
3. Anticuerpo:	agua ultrafiltrada	150 mL
	Solución de Lavado del Anticuerpo	
	(16X)	10 mL
	<hr/>	
	TOTAL	160 mL

- Sumergir la membrana en 10 mL de Solución de Bloqueo durante 30 minutos en agitación, y decantar.
 - Realizar 2 lavados con 20 mL de agua destilada durante 5 minutos, y decantar.
 - Incubar con 10 mL de Solución de Anticuerpo Primario durante 1 hora, y decantar.
- Se utilizó el anticuerpo primario PARP H-250 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7150).

Material y Métodos

- 4 lavados de 5 minutos con 20 ml de Solución de Lavado del Anticuerpo, y decantar.
- Incubar la membrana con 10 mL de Solución de Anticuerpo Secundario durante 30 minutos, y decantar.
- 4 lavados de 5 minutos con 20 ml de Solución de Lavado del Anticuerpo, y decantar.
- 3 lavados de 2 minutos con 20 mL de agua destilada, y decantar.
- Incubar la membrana con 5 ml de Cromógeno hasta que las bandas violetas se revelen. De 1 a 60 minutos.
- 3 lavados de 2 minutos con 20 mL de agua destilada, y decantar.
- Secar la membrana con papel de filtro en un ambiente cálido o bajo una lámpara de infrarrojos.

Una vez realizado el western blot se analizaron los resultados según el criterio utilizado por la OMS, según el cual basta con detectar la proteína visualmente³⁶.

3. Análisis estadístico

Los resultados de este estudio han sido procesados mediante el programa SPSS v 11.5 mediante la aplicación del test de Chi cuadrado para las comparación de las variables categóricas y mediante el test T de Student y el ANOVA para la comparación de las variables continuas, y cuyas metodologías estadísticas (tomando $p < 0,05$ como significación estadística y utilizando el coeficiente de Pearson para el análisis de la correlación) fueron tomadas como base para la realización de todo el estudio, tanto en lo que respecta al refuerzo de los conceptos oftalmológicos de evolución de la enfermedad glaucomatosa y programación quirúrgica, como para la validación de la muestra de los sujetos y la comprobación de la realización de los ensayos bioquímicos y las técnicas de Western Blot e inmunoblotting y estudio cuantitativo de la expresión de las proteínas estudiadas en el humor acuoso de los pacientes del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zanon-Moreno V, et al. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2008; 17: 263-268
2. Jentzsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 251-256
3. Lefevre G, et al. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann Biol Clin (Paris)* 1998; 56: 305-319. Review
4. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540. Review
5. Melo P, Rodrigues LG, Pinazo-Durán MD, Tavares MA. Methamphetamine and lipid peroxidation in the rat retina. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 455-460
6. Pinazo-Duran MD, et al. Role of free radicals in diabetic and hypertension retinopathies. *Proceedings of the European Congress of Ophthalmology* 2003; 31-36. ISBN 88-323-3132-2
7. Verdejo C, Marco P, Renau-Piqueras J, Pinazo-Duran MD. Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies. *Eye* 1999; 13: 183-188
8. Pinazo-Duran MD, et al. Estudio del estado oxidativo y antioxidante en la diabetes mellitus e hipertensión arterial esencial en una población oftalmológica. *Bol Soc Oftalmol Madrid* 2001; 41: 55-64
9. DiSilvestro RA, David C, David EA. Comparison of four indirect methods for fluid superoxide dismutase activities. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 507-510
10. Freedman SF, Anderson PJ, Epstein DL. Superoxide dismutase and catalase of calf trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 1330-1335

11. McLauchlan WR, Sanderson J, Quinlan M, Williamson G. Measurement of the total antioxidant activity of human aqueous humor. *Clin Chem* 1998; 44: 888-889
12. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Clin Pathol* 2001; 54: 356-361
13. Semes'ko SG, Farkhutdinov RR. Total antioxidant activity of the lacrimal fluid. *Klin Lab Diagn* 2002; 5: 33-34
14. Young IS. Measurement of total antioxidant capacity. *J Clin Pathol* 2001; 54: 339
15. Montoliu C, Pinazo-Duran MD, Guerri C. Mecanismos de protección frente a los radicales libres en las estructuras del globo ocular de la rata. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1996; 70: 139-148
16. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169
17. Miles AM, Wink DA, Cook JC, Grisham MB. Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol* 1996; 268: 105-120
18. Nims RW, et al. Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds. *Methods Enzymol* 1996; 268: 93-105
19. Altintas O, Maral H, Yuksel N, Karabas VL, Dillioglugil MO, Caglar Y. Homocysteine and nitric oxide levels in plasma of patients with pseudoexfoliation syndrome, pseudoexfoliation glaucoma, and primary open-angle glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243(7): 677-683
20. Ali SF, David SN, Newport GD. Age-related susceptibility of MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 1993; 14: 29-34
21. Vicente-Torres MA, Gil-Loyzaga P, Carricondo F, Bartolome MV. Simultaneous HPLC quantification of monoamines and metabolites in the blood-free rat cochlea. *J Neurosci Methods* 2002; 119: 31-36

22. Vaarmann A, Kask A, Maeorg U. Novel and sensitive high-performance liquid chromatographic method based on electrochemical coulometric array detection for simultaneous determination of catecholamines, kynurenine and indole derivatives of tryptophan. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 769: 145-153
23. Kilts CD, Breese GR, Mailman RB. Simultaneous quantification of dopamine, 5-hydroxytryptamine and four metabolically related compounds by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1981; 225: 347-357
24. Muller TH, Unsicker K. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection as a highly efficient tool for studying catecholaminergic systems. I. Quantification of noradrenaline, adrenaline and dopamine in cultured adrenal medullary cells. *J Neurosci Methods* 1981; 4: 39-52
25. Boerrigter RM, Siertsema JV, Kema IP. Serotonin (5-HT) and the rat's eye. Some pilot studies. *Doc Ophthalmol* 1992; 82: 141-150
26. Wright-Honari S, Marshall EF, Ashton CH, Hassanyeh F. Estimation of human blood plasma 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanillic acid. *Biomed Chromatogr* 1990; 4: 20120-20124
27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
28. Smith PK, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85
29. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988; 175: 231-237

30. Wokes F, Still BM. The estimation of protein by the biuret and Greenberg methods. *Biochem J* 1942; 36: 797-806
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
32. Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 1989; 180: 136-139
33. Braun RD, Wiechelman KJ, Gallo AA. Electrochemical, chemical and spectrophotometric investigation of the copper(II)-bicinchoninic acid reagent used for protein measurements. *Anal Chim Act* 1989; 221: 223-238
34. Shah GM, Kaufmann SH, Poirier GG. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase and its apoptosis-specific fragment by a nonisotopic activity-western blot technique. *Anal Biochem* 1995; 232: 251-254
35. Nozaki T, Masutani M, Akagawa T, Sugimura T, Esumi H. Non-covalent interaction between poly(ADP-ribose) and cellular proteins: an application of a poly(ADP-ribose)-western blotting method to detect poly(ADP-ribose) binding on protein-blotted filter. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 45-51
36. Larraide C, Paz E, Viveros M, Padilla A, Govezensky T. Análisis numérico de imágenes digitalizadas de western blot. El caso del VIH. *Gac Med Mex* 1998; 134: 385-396

Resultados

1.- Estudio preliminar

El estudio preliminar que se llevó a cabo al comienzo del desarrollo de este proyecto de investigación, tal y como queda reflejado en el apartado anterior de Material y Métodos, incluyó 90 ojos de 90 pacientes de ambos sexos (entre 50 y 90 años), que fueron distribuidos en los dos grupos principales, pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (n=50) y pacientes con cataratas seniles no patológicas (n=40). Las características de inclusión y exclusión y la metodología y plan de trabajo se ajustan al diseño principal del estudio. Estos resultados previos validan el estudio principal de este proyecto de Tesis Doctoral y se exponen a continuación:

La distribución por sexos fue similar en el grupo glaucoma (54% mujeres, 46% hombres), pero en el grupo comparativo de sujetos con cataratas hubo más mujeres que hombres (75% mujeres, 25% hombres). La edad media del GG fue de $70,92 \pm 8,19$ años, y de $73,75 \pm 6,95$ años en el GC. El rango de edades se dividió en cuatro subgrupos (50-59, 60-69, 70-79, >80) y el que incluyó un mayor número de pacientes fue el comprendido entre 70 y 79 años.

El estudio incluyó un apartado en el que se evaluaron clínicamente los datos procedentes de los diferentes factores de riesgo para la evolución del GPAA, como la hipertensión arterial esencial, diabetes mellitus, miopía y dislipemia. También se relacionaron con los antecedentes familiares de glaucoma, la cirugía antiglaucomatosa previa, el número de fármacos en monoterapia o asociaciones de compuestos farmacológicos que precisaba el paciente para controlar la PIO en el momento de la intervención, y todos estos se relacionaron con la presión intraocular, agudeza visual, la relación excavación / disco óptico, el empeoramiento del campo visual y los resultados del análisis de fibras ópticas por GDx.

Se realizó un estudio bioquímico de la actividad oxidativa y antioxidante del humor acuoso en los dos grupos de pacientes, obteniendo dicho humor acuoso en el momento de la intervención programada (glaucoma *versus* cataratas). Las determinaciones de la capacidad oxidativa (mediante

Resultados

la medida del MDA/TBARS) y la capacidad antioxidante total (medida de AOXT) en el humor acuoso también fueron registradas y analizadas estadísticamente.

Todos los datos fueron analizados con el paquete estadístico SPSS v11.5 (Inc. Redmon, WA). Las variables categóricas se compararon entre los grupos utilizando el test del Chi-cuadrado, y las variables continuas se compararon utilizando el test t de Student o el ANOVA para evaluar diferentes parámetros entre los grupos de estudio. El p valor se consideró significativo cuando fue inferior a 0,05 y muy significativo cuando fue inferior al 0,01.

Las características oftalmológicas de los pacientes glaucomatosos del estudio preliminar pueden observarse en la tabla siguiente.

Tabla 10. Estudio preliminar: características de los pacientes con GPAA					
	Nº Colirios	PIO	AV	FO	Tipo Cirugía
Porcentajes	1: 8% / 2: 54% / 3: 30% / 4: 8%	<21: 46% >21: 54%	0,1-0,5: 60% 0,6-1: 40%	0,1-0,5: 40% 0,6-1: 60%	LT: 2% TW: 30% EPNP: 6%

PIO: presión intraocular; AV: agudeza visual; FO: fondo de ojo; LT: trabeculoplastia láser; TW: trabeculectomía de Watson; EPNP: esclerectomía profunda no perforante

En la tabla siguiente se exponen los resultados estadísticos de la comparación, mediante el test T de Student, de las variables independientes (MDA y AOXT) con las variables categóricas para determinados factores de riesgo del paciente glaucomatoso, expresados como la media y desviación estándar.

Resultados

Factores de riesgo		MDA	p-valor	AOXT	p-valor
Cirugía Previa	SÍ (n = 19)	0.49 ± 0.13	0.383	2.89 ± 0.67	0.307
	NO (n = 31)	0.45 ± 0.12		2.68 ± 0.60	
HTA	SÍ (n = 16)	0.44 ± 0.11	0.371	2.51 ± 0.59	0.030*
	NO (n = 34)	0.48 ± 0.14		2.95 ± 0.61	
Miopía	SÍ (n = 22)	0.45 ± 0.12	0.517	2.66 ± 0.70	0.199
	NO (n = 28)	0.48 ± 0.14		2.91 ± 0.52	
DM	SÍ (n = 6)	0.45 ± 0.15	0.736	2.86 ± 0.74	0.733
	NO (n = 44)	0.47 ± 0.12		2.76 ± 0.62	
Dislipemia	SÍ (n = 6)	0.45 ± 0.14	0.736	2.72 ± 0.70	0.832
	NO (n = 44)	0.47 ± 0.13		2.78 ± 0.63	

HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; MDA: Malondialdehído; AOXT: antioxidante total

* Estadísticamente significativo (p-valor < 0.05)

A continuación se muestran en una tabla las correlaciones mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el nivel de significación entre las variables estudiadas (MDA y AOXT) y ciertos factores de riesgo para el paciente glaucomatoso.

	MDA		AOXT	
	Coefficiente Correlación Pearson	p-valor	Coefficiente Correlación Pearson	p-valor
Edad	-,361	,010*	-,169	,241
AV corregida	-,075	,607	-,143	,321
PIO tratada	-,091	,528	-,064	,660
E/P	,184	,206	,233	,107
Evolución	,203	,405	,392	,097
Nº Colirios	-,075	,607	,047	,744

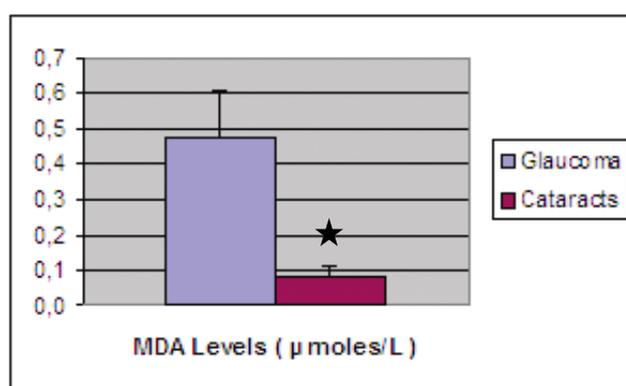
MDA: Malondialdehído; AOXT: antioxidante total; AV: agudeza visual; PIO: presión intraocular; E/P: excavación papilar

* Correlación estadísticamente significativa (p-valor < 0.05)

Resultados

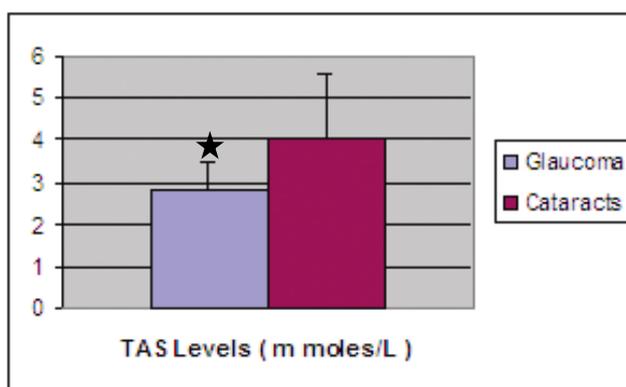
Los resultados de las distintas determinaciones para evaluar el estrés oxidativo fueron los siguientes:

1. Estado oxidativo (MDA-TBARS). Los niveles de MDA fueron estadísticamente superiores en el grupo de pacientes con glaucoma respecto del grupo con cataratas ($0,471 \pm 0,134$ y $0,080 \pm 0,030$ $\mu\text{moles/L}$ respectivamente; $p=1,95898E-31$)



$p < 0,05$

2. Estado antioxidante total. Se observó una capacidad antioxidante total significativamente reducida en los pacientes con glaucoma respecto a los sujetos cataratosos ($2,794 \pm 0,658$ y $4,050 \pm 1,577$ mmoles/L ; $p=2,80751E-6$)



$p < 0,05$

Resultados

Una vez validada la muestra, y publicados estos resultados (Zanon-Moreno V, et al. J Glaucoma 2008), puesto a punto los distintos protocolos para las determinaciones bioquímicas y probada la metodología, llevamos a cabo todos los ensayos programados en el plan de trabajo a lo largo de los últimos 3 años. Exponemos a partir de aquí los resultados obtenidos de la muestra completa.

2.- Características de los pacientes

A continuación se reflejan los principales datos demográficos de los sujetos de este estudio.

Tabla 13. Número de muestras analizadas.					
HUMOR ACUOSO					
	Sexo			Edad (años)	
	Hombres	Mujeres	IM*	Hombres	Mujeres
Glaucoma	190	225	0,844	70,313	70,743
	415			70,548	
Cataratas	179	239	0,749	70,897	71,619
	418			71,309	
TOTAL	833		0,883	70,930	

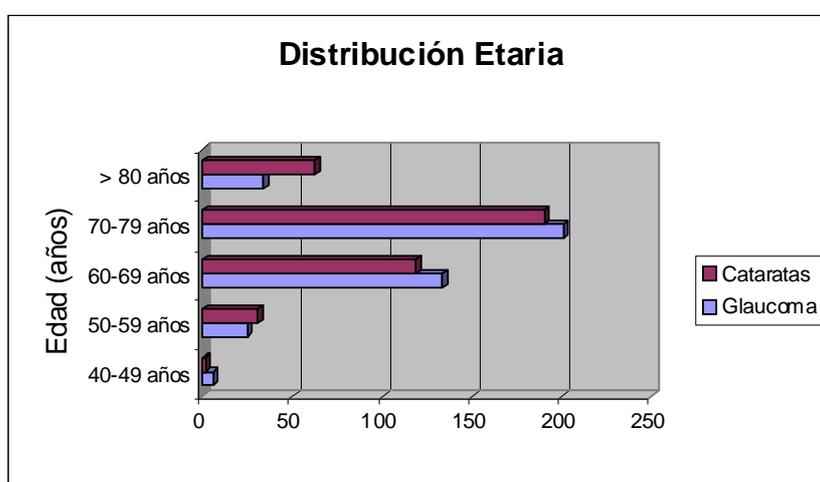
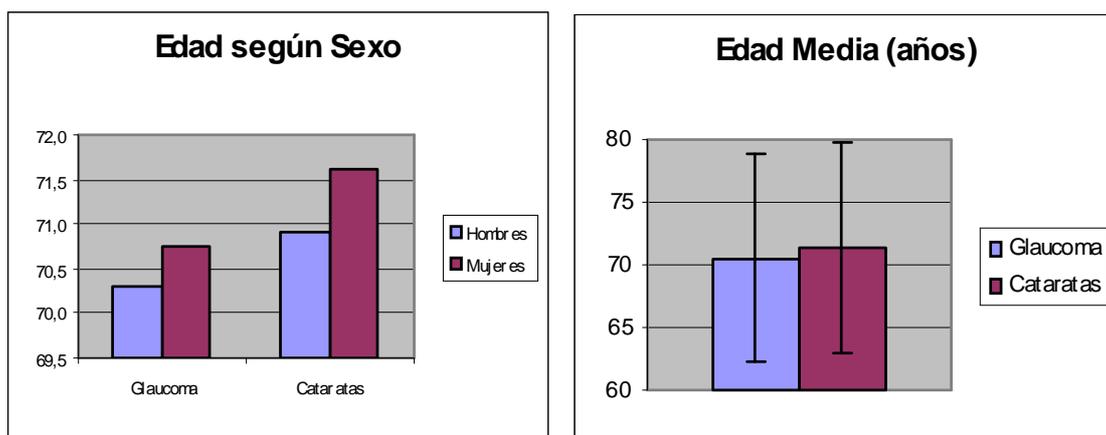
*IM = Índice de Masculinidad (nº Hombres / nº Mujeres)

2.1.- Edad.

Siendo la edad uno de los principales factores de riesgo para la progresión del glaucoma, hemos realizado un análisis estadístico pormenorizado de este parámetro, relacionándolo con el sexo, con los grupos de estudio (glaucoma vs. cataratas) y con todos los parámetros obtenidos de la exploración oftalmológica y los ensayos bioquímicos correspondientes.

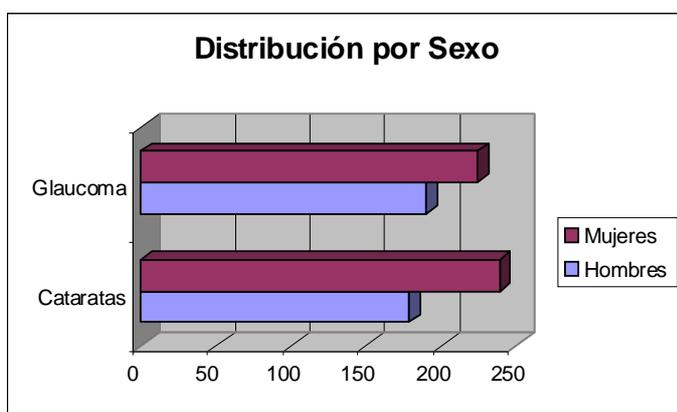
El rango de edad en ambos grupos fue de 40 a 90 años, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos, glaucoma y cataratas.

Resultados



2.2.- Sexo.

En ambos grupos hay mayor número de mujeres que de hombres, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. El índice de masculinidad (n° hombres / n° mujeres) fue de 0,844 en el grupo de pacientes con glaucoma y de 0,749 en el grupo de pacientes cataratosos.



		Sexo		Total
		Hombre	Mujer	
Grupo	Glaucoma	190	225	415
	Cataratas	179	239	418
Total		369	464	833

Resultados

Prueba Chi-Cuadrado

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,740(b)	1	,390		
Continuity Correction(a)	,624	1	,429		
Likelihood Ratio	,740	1	,390		
Fisher's Exact Test				,403	,215
Linear-by-Linear Association	,739	1	,390		
N of Valid Cases	833				

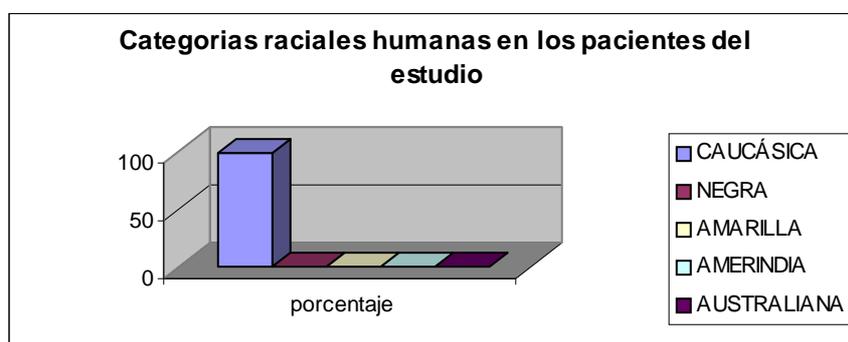
a Computed only for a 2x2 table

b 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 183,84.

2.3.- Raza

Existiendo diferencias en cuanto a la presentación y evolución del GPAA según la raza, hemos observado que todos los pacientes de este estudio han sido de raza caucásica, siendo esto debido al azar.

Debido a la diversidad de clasificaciones relacionadas con cultura, religión, política, etc., hemos realizado una clasificación de las categorías raciales humana basadas en los caracteres biológicos visibles, según la antropología moderna.



2.4.- Intervención quirúrgica previa

Un dato que consideramos muy importante a la hora de valorar las características de los pacientes glaucomatosos es el relativo a la intervención quirúrgica, concretamente, si el paciente fue intervenido de glaucoma con anterioridad. Del total de pacientes glaucomatosos (415) 183 fueron operados de cirugía anti-glaucomatosa con anterioridad a la intervención actual (96 pacientes se intervinieron mediante la técnica de Trabeculectomía “ab externo” de Watson, 39 mediante la Esclerectomía Profunda no Perforante, a 9 pacientes se les operó mediante la Iridencleisis Protegida, en 25 pacientes se llevó a cabo una o varias sesiones de Trabeculoplastia Láser, y a 14 se les implantó una válvula de Ahmed). En lo que respecta a los pacientes que se sometieron a cirugía anti-glaucomatosa por vez primera, fueron 232 en total.



*TW: Trabeculectomía de Watson; EPNP: Esclerectomía Profunda no Perforante; IP: Iridencleisis Protegida; TL: Trabeculoplastia Láser; VA: Válvula de Ahmed

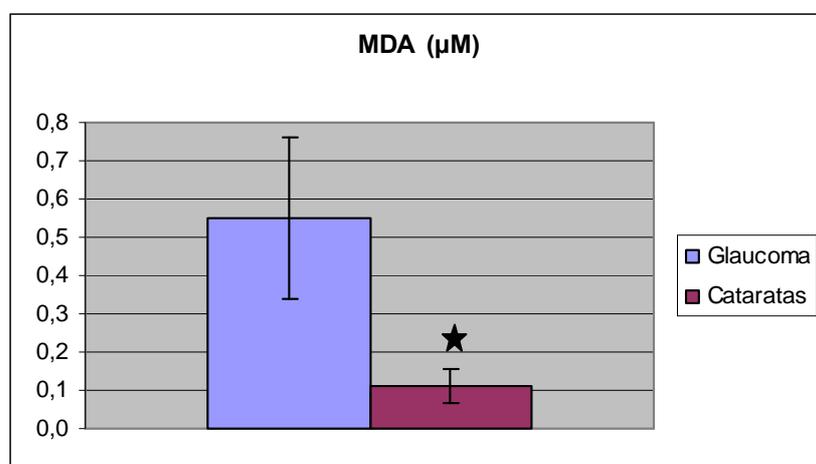
3.- Estrés Oxidativo

3.1.- Determinación del estado oxidativo (MDA).

Analizamos cada muestra por duplicado. Los resultados de la determinación de la actividad oxidativa de los dos grupos de pacientes mostraron una concentración superior de MDA en el grupo

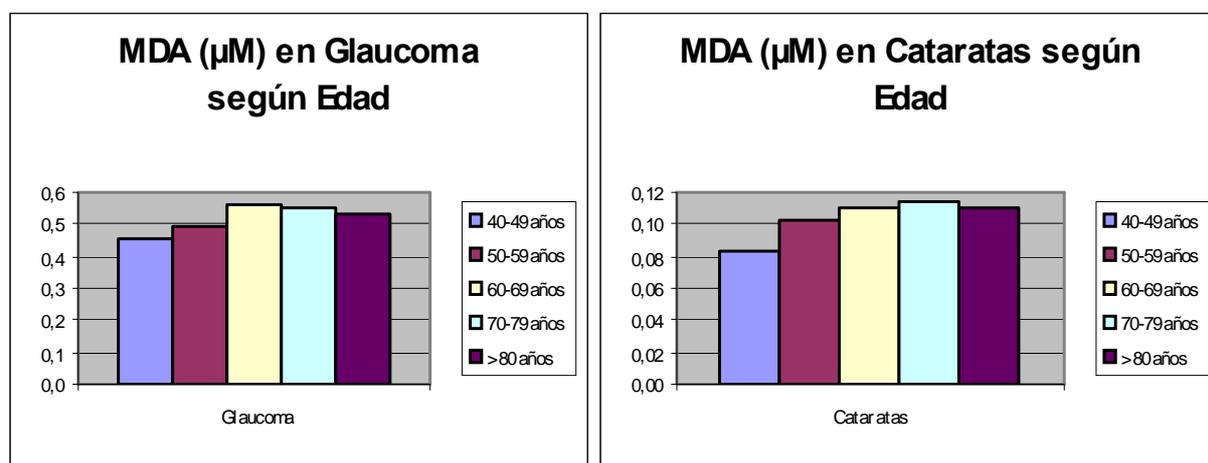
Resultados

glaucoma respecto del grupo cataratas, siendo estos resultados estadísticamente significativos, como se refleja en la figura siguiente ($0,548 \pm 0,210$ vs. $0,111 \pm 0,045 \mu\text{M}$; p-valor = $1,3909\text{E}-175$).



p < 0,001

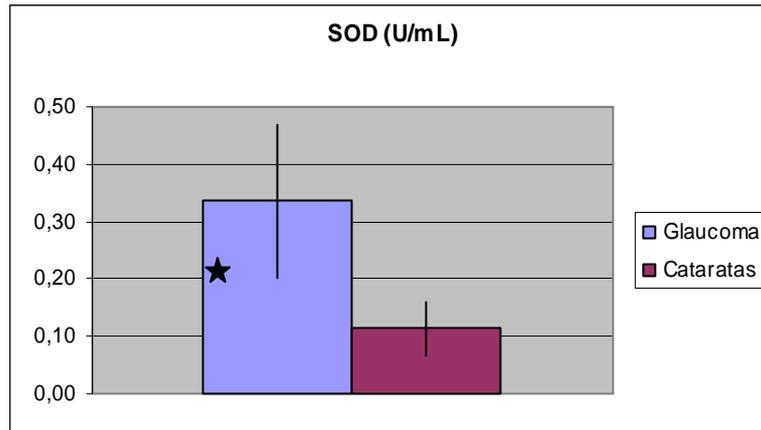
El estudio del MDA estratificando por edad no mostró diferencias significativas, aunque sí se pudo apreciar una tendencia al aumento de la concentración de MDA paralelo al aumento de la edad.



3.2.- Determinación de la actividad de la enzima SOD.

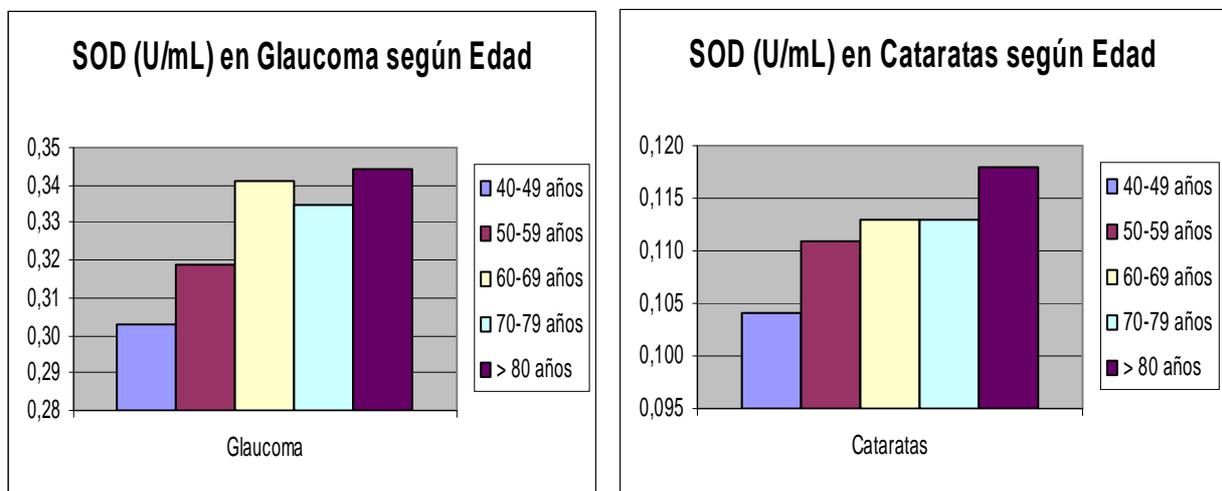
El ensayo se realizó por duplicado. Los resultados muestran una actividad de la enzima SOD estadísticamente superior en el grupo glaucoma respecto del grupo cataratas, como muestra la figura a continuación ($0,336 \pm 0,135$ vs. $0,113 \pm 0,047 \text{ U/mL}$; p-valor = $3,0934\text{E}-126$).

Resultados



$p < 0,001$

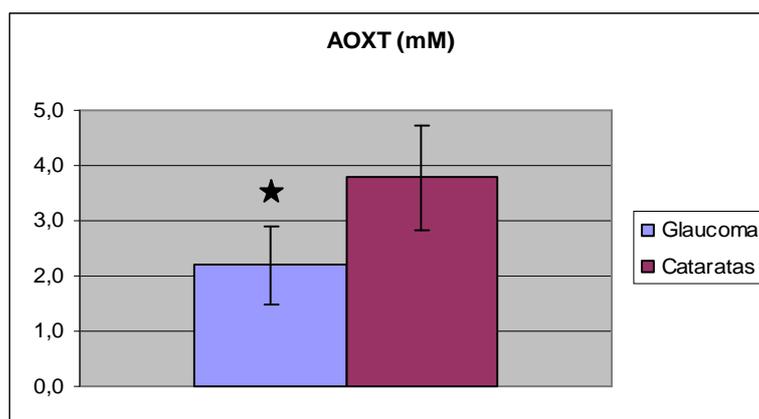
Al estratificar ambos grupos por edad, no se encontraron diferencias significativas, aunque la tendencia que se observó fue el aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa con la edad.



3.3.- Determinación de la actividad antioxidante total.

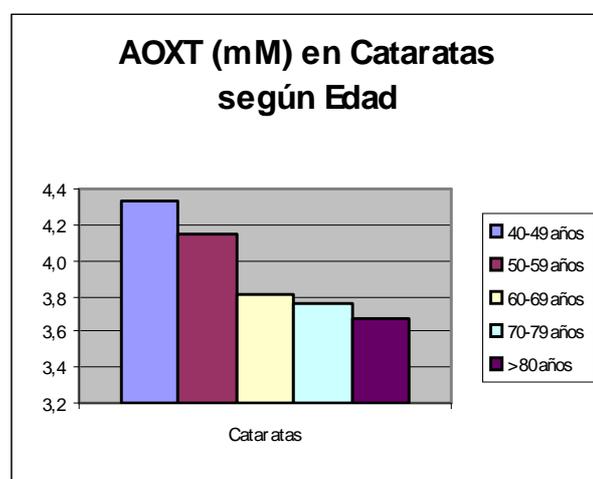
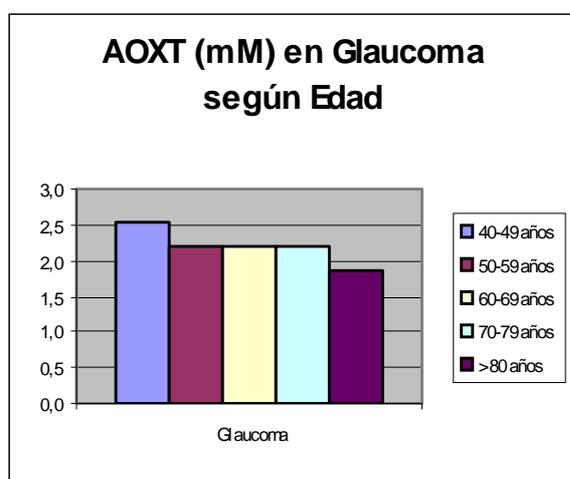
Todas las muestras se analizaron por duplicado. La actividad antioxidante total resultó significativamente inferior en el grupo glaucoma respecto al grupo cataratas, lo que puede apreciarse en el grafico siguiente ($2,194 \pm 0,719$ vs. $3,782 \pm 0,938$ mM; p -valor = $2,4763E-102$).

Resultados



$p < 0,001$.

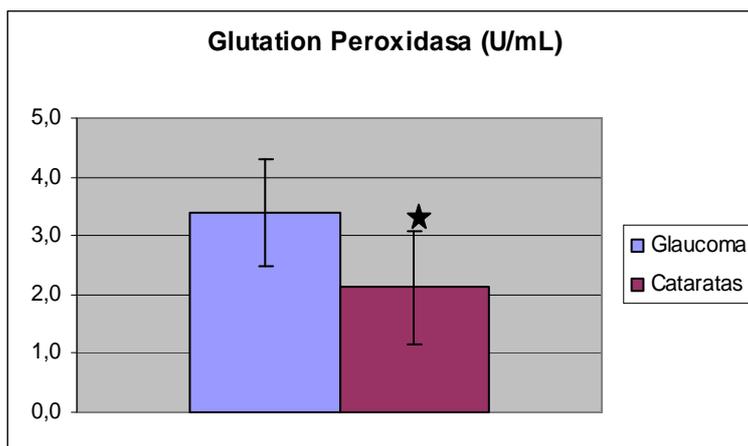
En ambos grupos de estudio, glaucoma y cataratas, se observó una disminución del estado antioxidante total con la edad.; y se encontraron diferencias significativas sólo en el grupo de pacientes con glaucoma al comparar los rangos de edad 40-49 y ≥ 80 años (p -valor = 0,382).



3.4.- Determinación de la actividad de la enzima GPx.

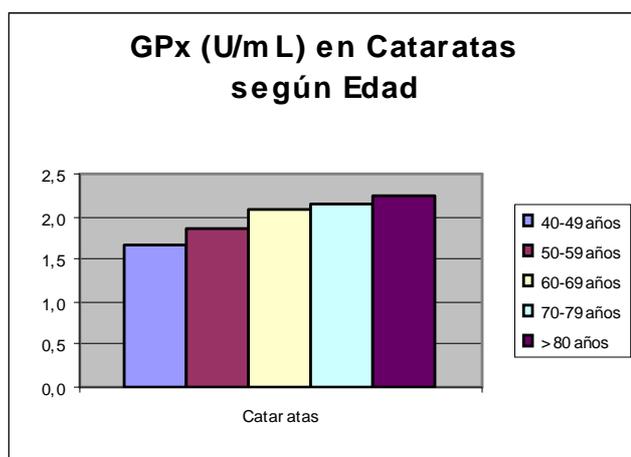
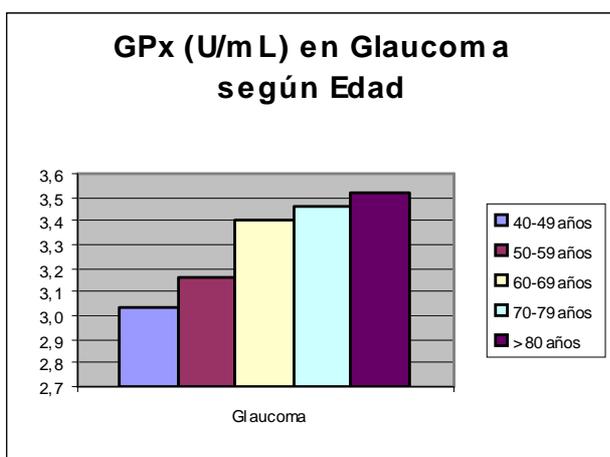
Los resultados son la media y desviación estándar de 2 determinaciones por muestra. La actividad de la enzima GPx fue significativamente superior en el grupo glaucoma respecto del grupo cataratas ($3,406 \pm 0,905$ vs. $2,124 \pm 0,960$ U/mL; p -valor = $1,43808E-50$).

Resultados



$p < 0,001$.

Se observó un aumento de la actividad de la enzima glutacion peroxidasa con la edad, aunque las diferencias no resultaron significativas.



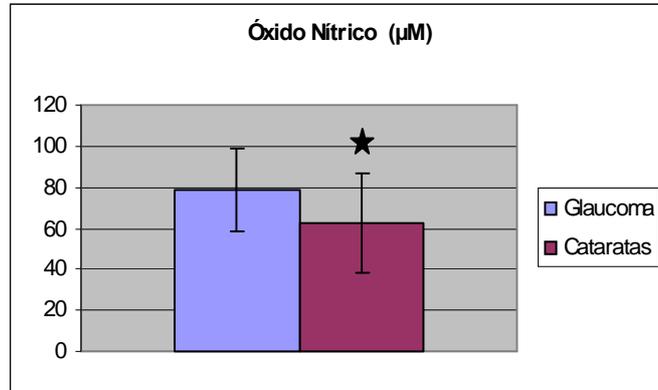
4.- Estrés nitrosativo

4.1.- Óxido Nítrico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, tomando como resultado final la media y la desviación estándar. La concentración total de óxido nítrico fue estadísticamente superior en el

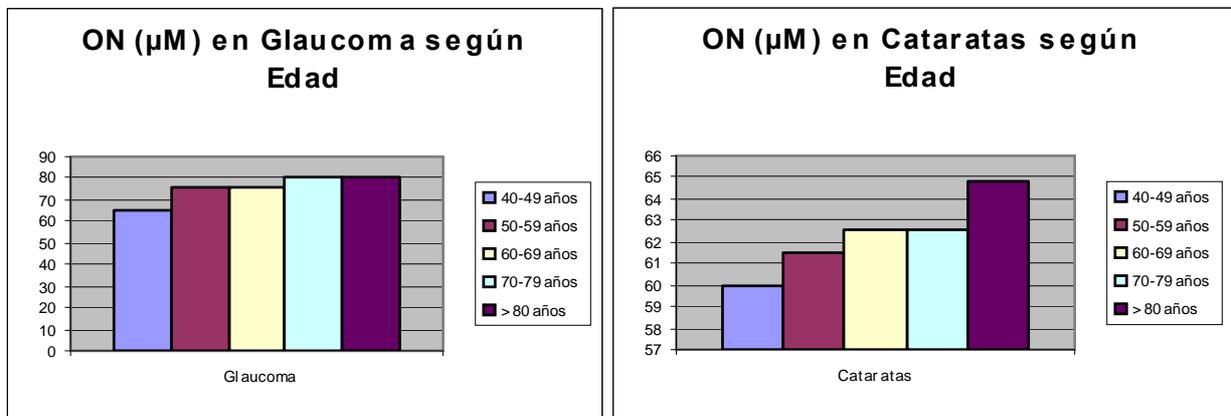
Resultados

grupo de pacientes con glaucoma ($78,574 \pm 20,286$ vs. $62,946 \pm 24,241 \mu\text{M}$; p-valor = $9,53739\text{E}-20$).



$p < 0,001$

Las diferencias observadas al estratificar por edad no resultaron significativas en ninguno de los dos grupos. Se observó un incremento en la concentración de óxido nítrico total a medida que aumenta la edad.



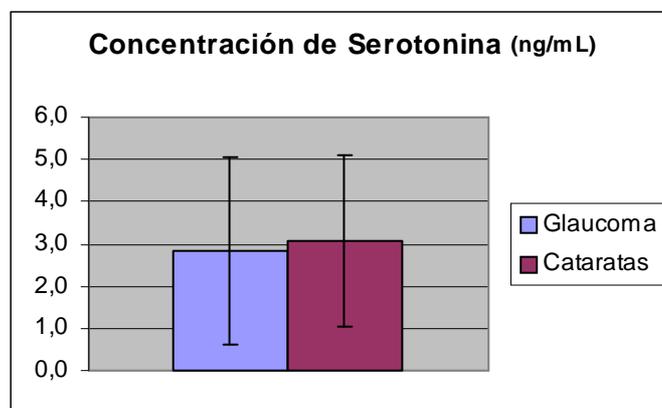
5.- Neurotransmisores.

El ensayo se realizó por duplicado, de modo que los resultados son la media y desviación estándar de dos mediciones por muestra.

Resultados

5.1.- Serotonina.

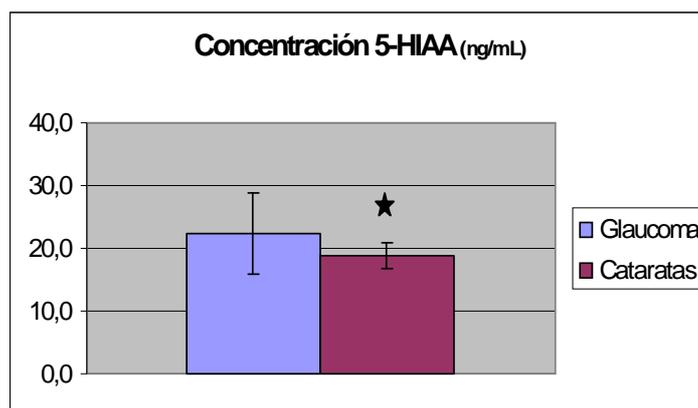
Aunque observamos diferencias en la concentración de serotonina en ambos grupos, siendo mayores los niveles en el grupo de cataratas, éstas no resultaron significativas.



$p > 0.05$

5.2.- Ácido 5-Hidroxiindolacético.

Observamos una mayor concentración de 5-HIAA en los pacientes glaucomatosos, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre ambos grupos. La gráfica siguiente muestra estos resultados de forma más valorable.

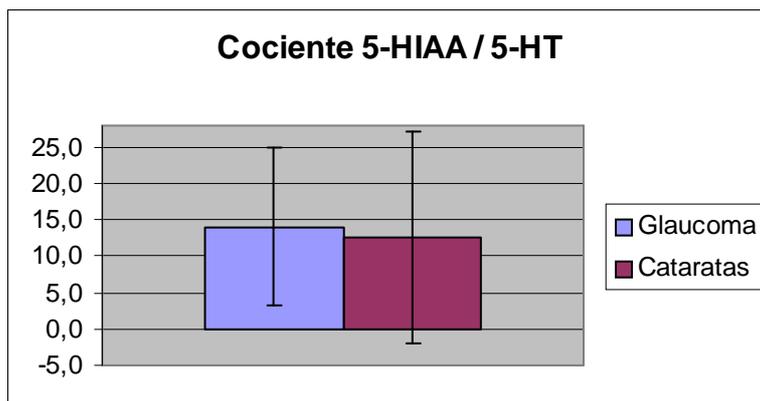


$p < 0.05$

5.3.- Relación 5-HIAA/5-HT.

La media del cociente 5-HIAA/5-HT fue superior en el GG respecto al GC, pero esta diferencia no fue significativa estadísticamente.

Resultados



$p > 0.05$

6.- Marcadores de apoptosis.

6.1.- Poli (ADP-ribosa) polimerasa.

Se analizaron las siguientes muestras.

Tabla 14. Número de muestras analizadas.

	Humor Acuoso	Plasma
Glaucoma	19	12
Cataratas	23	10

En las siguientes fotografías de las membranas de nitrocelulosa puede observarse la banda de expresión de la proteína PARP-1 (116 kDa) en cada una de las distintas muestras analizadas.

Humor Acuoso

Glaucoma

Cataratas

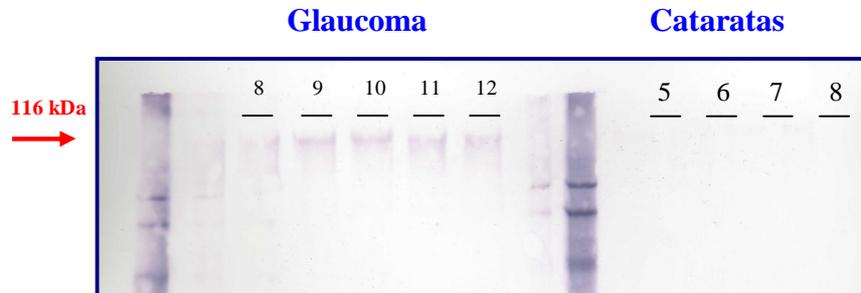
1.



Resultados

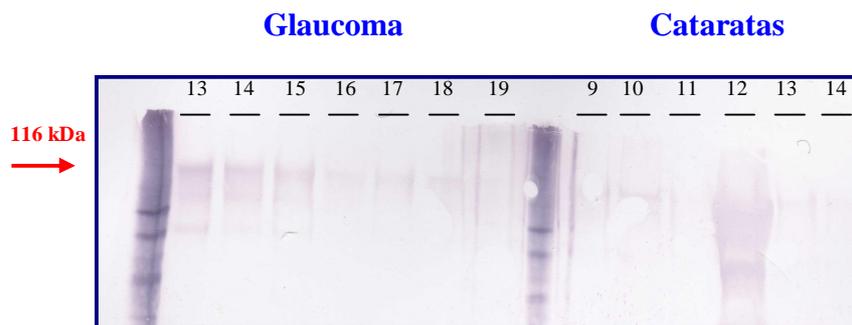
En esta membrana se muestran los resultados correspondientes a las muestras de humor acuoso 1 a 7 del grupo Glaucoma y 1 a 4 del grupo Cataratas.

2.



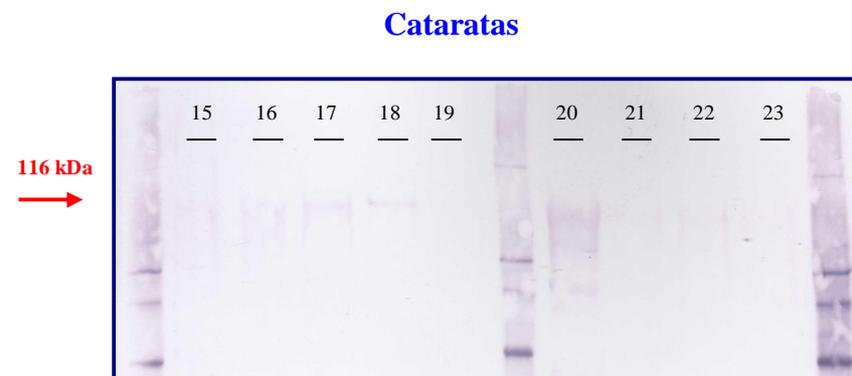
Resultados correspondientes a las muestras de humor acuoso 8 a 12 del grupo Glaucoma y 5 a 8 del grupo Cataratas.

3.



Resultados correspondientes a las muestras de humor acuoso 13 a 19 del grupo Glaucoma y 9 a 14 del grupo Cataratas.

4.



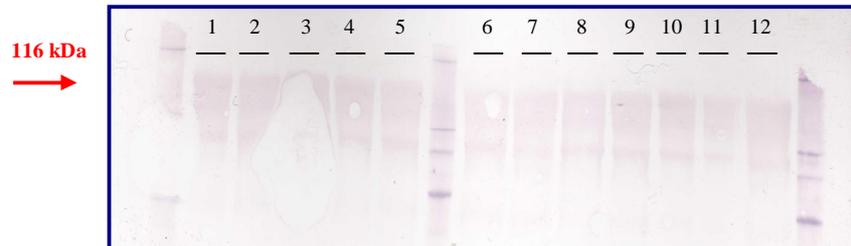
Resultados correspondientes a las muestras de humor acuoso 15 a 23 del grupo Cataratas.

Resultados

Plasma

5.

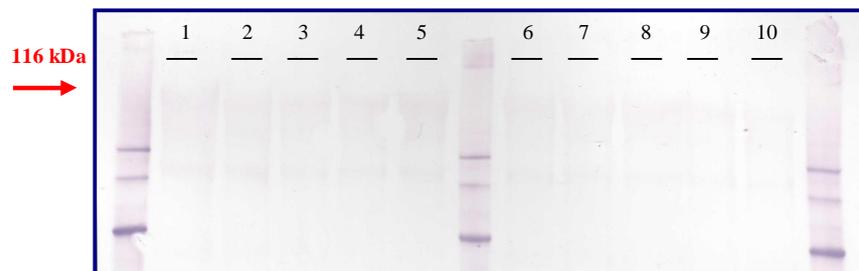
Glaucoma



Resultados correspondientes a las muestras de plasma del grupo Glaucoma (12 muestras).

6.

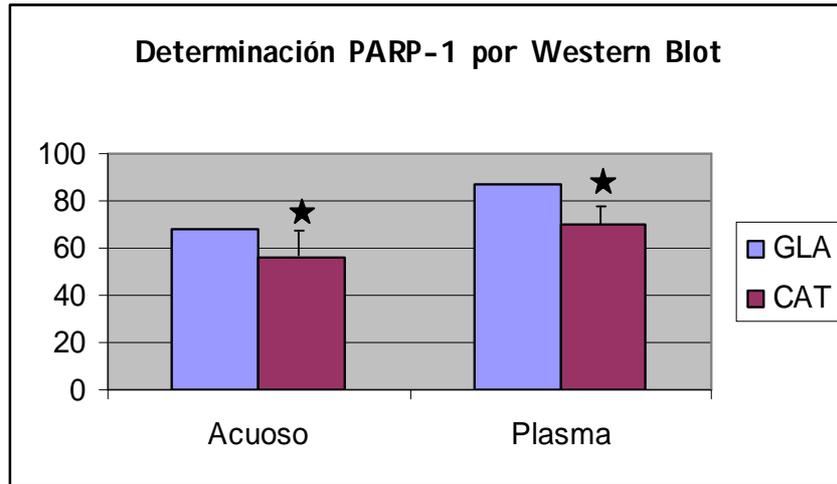
Cataratas



Resultados correspondientes a las muestras de plasma del grupo Cataratas (10 muestras).

Los resultados correspondientes a la cuantificación mediante densitometría (expresado en unidades densitométricas relativas) de las muestras analizadas mediante la expresión de PARP-1 por Western Blot e inmunoblotting, pueden verse en el siguiente gráfico.

Resultados



Discusión

Discusión

El apartado discusión se ha estructurado en función de las secciones principales y para facilitar los comentarios sobre la gran variedad de resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo, quedando dividido en los siguientes apartados:

- 1) SOBRE EL DISEÑO GENERAL DEL TRABAJO
- 2) SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
- 3) SOBRE LA POSIBILIDAD DE APLICACIÓN BIOMÉDICA DE LOS RESULTADOS Y SU TRASCENDENCIA EN MEDICINA PREVENTIVA

1. SOBRE EL DISEÑO GENERAL DEL TRABAJO

1.1.- De la enfermedad glaucomatosa.

El glaucoma es una enfermedad multifactorial en la que se imbrican diversas estructuras del globo ocular, por una parte los tejidos de la cámara anterior y por otra las células ganglionares de la retina y fibras del nervio óptico. Independientemente de las diversas teorías etiopatogénicas, existen dos fenotipos celulares fundamentales para el estudio de todos los tipos de glaucoma: las células de la malla trabecular y las células ganglionares de la retina. Sin embargo, la dimensión del término glaucoma solo se alcanza cuando la secuencia de los hechos que acontecen en el segmento anterior ocular se combina con el comienzo de la afectación del segmento posterior ocular.

Esto se ha reflejado en la clínica oftalmológica mediante dos conceptos bien conocidos, el de hipertensión ocular (HTO) y del de glaucoma *versus* neuropatía óptica glaucomatosa. En este sentido ha desempeñado una función esencial el esquema de Weinreb¹ que ha adquirido una dimensión mucho mayor en los últimos años, por la importancia del diagnóstico precoz de HTO, y en el que quedan bien reflejados los estadios evolutivos conocidos de los pacientes glaucomatosos.

Aunque el glaucoma se caracteriza oftalmológicamente por la excavación de la papila óptica y por la aparición de patrones específicos de alteración del campo visual, el mayor riesgo para la visión proviene de la hipertensión ocular y por ende demandarían atención prioritaria todos los aspectos relacionados con la teoría mecánica.

A pesar de existir muchos signos y síntomas que pueden advertir del empeoramiento de la enfermedad glaucomatosa, está demostrado que éstos se presentan cuando la retina y el nervio óptico han comenzado a enfermar, y se ha establecido la neuropatía óptica degenerativa, cuya evolución espontánea es hacia la atrofia óptica y la ceguera irreversible. Aún quedan muchos conceptos por esclarecer y se precisan mayores investigaciones para abordar de una forma

definitiva el conocimiento de la enfermedad glaucomatosa y encontrar el tratamiento más definitivo que consiga salvaguardar la visión.

1.2.- Del ámbito y de los sujetos del estudio.

El estudio ha sido llevado a cabo principalmente en el laboratorio de oftalmología experimental de la Unidad de Investigación oftalmológica “Santiago Grisolia” del Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia). La parte correspondiente a los experimentos relacionada con las determinaciones de los neurotransmisores ha sido realizada en el Instituto de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Porto (Portugal) mediante un proyecto colaborativo establecido entre los dos centros con anterioridad y financiado por el Instituto de Salud Carlos III FIS y el Gobierno Portugués, y que ha facilitado el desplazamiento de investigadores para trabajar indistintamente entre estas dos ciudades.

Hemos realizado un estudio de casos y controles retrospectivo, en pacientes con GPAA que por su evolución han sido programados para cirugía anti-glaucomatosa, en razón de la valoración del oftalmólogo, utilizando para ello los criterios de la Sociedad Española de Glaucoma (SEG) y los sistemas de cálculo de riesgo individual, tal y como aparecen en el documento insertado en la sección de Material y Métodos, que permite establecer el riesgo porcentual de evolución adversa de la enfermedad glaucomatosa², en el que se han introducido características personales y familiares y los datos de la exploración oftalmológica de cada uno de los pacientes.

Los parámetros que se han introducido para valorar el riesgo de evolución individual del GPAA han sido: edad, sexo, antecedentes familiares, hipertensión arterial, miopía, diabetes mellitus y dislipemia; en relación a la hipertensión ocular, alteración del campo visual, análisis de fibras ópticas, excavación papilar, agudeza visual y espesor corneal central.

Discusión

Todos ellos se han correlacionado con el tratamiento de cada paciente (número de fármacos utilizado por cada paciente y el tratamiento láser y/o cirugía). El porque se han manejado estos factores y no otros utilizados por otros autores³⁻⁷ es porque hemos considerado que la práctica diaria debe simplificar al máximo los criterios de evaluación, con el fin de precisar los hechos más importantes, alcanzar el diagnóstico y aplicar precozmente el tratamiento más adecuado.

El oftalmólogo que visita pacientes en un estadio clínico intermedio entre HTO y glaucoma frecuentemente se enfrenta con el dilema clínico de si tratar o no tratar a dichos pacientes. El reto de estos instrumentos de asesoramiento diagnóstico mediante el cálculo del riesgo evolutivo del paciente glaucomatoso, es precisamente el poder identificar a los sujetos con mayor riesgo de pérdida de visión. Los factores de riesgo que hemos considerado han sido obtenidos mediante la entrevista en consulta, la historia clínica, y el examen oftalmológico y pruebas complementarias realizadas, y registrados todos en un documento diseñado personalmente mediante el programa Excel para Windows.

El estudio preliminar del proyecto de investigación nos ha permitido valorar todos estos parámetros, que han sido aceptados ya en otras especialidades médicas que también utilizan estos sistemas para calcular el pronóstico de la enfermedad, como en la enfermedad coronaria, dislipemias e hipertensión arterial esencial, y precisamente desarrollados en base a una idea de Robert N. Weinreb, Director del Hamilton Glaucoma Center en la Universidad de California, San Diego, presentada en el Congreso de la Academia Americana de Oftalmología en Chicago (IL) en el 2004 (Comunicación de R Weinreb y Felipe Medeiros, profesores de Oftalmología del Hamilton Glaucoma Center de la Universidad de California, San Diego (USA), “The STAR calculator for glaucoma (Scoring Tool for Assessing Risk)) y publicada en ese mismo año¹.

Esta decisión ha sido el resultado de la recogida de datos de un estudio multicéntrico realizado entre oftalmólogos del Hospital Universitario Doctor Peset (Valencia), del Hospital La Línea de la Concepción (Cádiz), el Hospital La Inmaculada de Huerca Overa (Almería), el Hospital

Universitario La Fe (Valencia) y el Hospital Punta de Europa (Cádiz). Los resultados de un estudio piloto realizado en 90 ojos de 90 pacientes⁸, reflejaron que éstos precisamente son los criterios más importantes para el seguimiento de la enfermedad y el cuidado de la visión y los fundamentales para establecer una correlación con las posibles moléculas implicadas en la progresión de la enfermedad.

Todos los criterios de selección de pacientes, los factores de riesgo a valorar, las moléculas que se han considerado claves para estudiar los mecanismos etiopatogénicos del glaucoma y la valoración de aplicación biomédica mediante translación de los resultados para el control de los pacientes glaucomatosos, han sido estudiadas y reflejados en el proyecto de investigación del Instituto de Salud Carlos III para la prevención de la ceguera por glaucoma (FIS nº PI061862), a la que pertenecen al grupo de investigadores tanto oftalmólogos como biólogos en investigación oftalmológica de la Comunidad Valenciana y Andalucía.

El porqué se ha utilizado el grupo de sujetos con cataratas como comparativo al grupo de pacientes con glaucoma ha sido principalmente porque las cataratas “per se” no suponen un proceso lesivo para las estructuras del globo ocular, son de presentación frecuente, tienen una correlación directa con la edad y al mismo tiempo han sido relacionadas por numerosos autores con mecanismos de estrés oxidativo⁹⁻¹², ofreciéndonos una referencia muy valorable de los procesos redox en el humor acuoso humano y para el GPAA y en definitiva un grupo opcional comparativo para los nuevos ensayos programados en el presente estudio experimental.

1.3.- De la muestra empleada y las moléculas analizadas.

Nuestro principal objetivo ha sido complementar los estudios sobre parámetros de riesgo en el paciente oftalmológico con HTO *versus* glaucoma, con la investigación básica de los posibles cambios celulares y moleculares que se produzcan en el segmento anterior ocular y que puedan inducir la alteración del segmento posterior ocular y la pérdida de la visión. Si logramos averiguar alguno en particular o todos estos mecanismos, podríamos utilizarlos como marcadores de la

evolución y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratar específicamente estos estadios de la enfermedad glaucomatosa. Hemos estudiado la formación de moléculas que puedan intervenir en la evolución de la HTO y en el establecimiento del glaucoma, y que partiendo del humor acuoso puedan establecer una conexión con las estructuras de la retina y nervio óptico e inducir una señal o una cadena de señales que culmine con la lesión y posterior empeoramiento de las mismas.

El humor acuoso ha sido elegido como la muestra más adecuada para nuestros propósitos, por sus características bioquímicas y funcionales, por la relativa accesibilidad y facilidades de manipulación, transporte y almacenamiento y por cubrir nuestras expectativas en relación a las determinaciones programadas. En este sentido otros autores también lo han utilizado para trabajos similares¹³⁻¹⁵.

Teniendo en cuenta la teoría mecánica y vascular del glaucoma y los mecanismos de inducción de la degeneración y muerte de las células ganglionares de la retina y de las fibras del nervio óptico, hemos propuesto para este estudio unos experimentos encaminados a determinar unas determinadas moléculas que presuponemos implicadas en la evolución de todos estos procesos en el contexto de la enfermedad glaucomatosa:

- Especies reactivas del oxígeno
- Moléculas Antioxidantes
- Óxido Nítrico
- Neurotransmisores
- Marcadores de Apoptosis

Todas ellas han sido valoradas individualmente y las determinaciones correspondientes se han llevado a cabo en las muestras de los pacientes glaucomatosos y los resultados se han analizado estadísticamente comparándolos con los parámetros clásicos y emergentes de riesgo en el GPAA.

En el grupo comparativo se han realizado todas las determinaciones en paralelo al grupo estudiado de pacientes glaucomatosos, puesto que este grupo no puede ser considerado un control en el amplio sentido de la palabra, ya que no procede de individuos sanos, sino de los sujetos aquejados de cataratas relacionadas con el envejecimiento y sin otra patología oftalmológica o general considerable. No obstante otros autores han utilizado esta comparación en trabajos similares, ya que las determinaciones han sido efectuadas en las mismas condiciones en ambos grupos de estudio, lo que refuerza la validez de la confrontación de datos¹⁶⁻¹⁸.

2. SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Todos los experimentos han sido realizados en el humor acuoso de pacientes y obtenido durante la cirugía programada en cada uno de los centros en los que se han recogido las muestras para este proyecto de investigación. Los experimentos han sido realizados en las muestras de ambos grupos (cirugía antiglaucomatosa *versus* cirugía de cataratas) y procesados para análisis bioquímicos diversos y para la técnica de Western Blot e inmunoblotting, utilizando anticuerpos monoclonales específicos para este fin.

Las determinaciones enzimático-colorimétricas que se han llevado a cabo en las muestras de humor acuoso se han basado en los protocolos previos y en la experiencia de este grupo de investigación oftalmológica tanto en el animal experimental¹⁹⁻²² como en el humano²³, y han sido: 1) la actividad oxidativa mediante la determinación de malonildialdehído (MDA) y el test del ácido tiobarbitúrico y las sustancias que reaccionan con él (TBARS); 2) la actividad antioxidante (superóxido dismutasa - SOD, antioxidante total - AOXT, glutatión peroxidasa - GPx); 3) la concentración de óxido nítrico (ON) mediante la reacción de Griess; 4) la determinación de la concentración de ciertos neurotransmisores (Serotonina (SE-5HT) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-

HIAA)); y 5) finalmente mediante la técnica de Western Blot e immunoblotting se ha obtenido la expresión de marcadores de apoptosis (poli (ADP-ribosa) polimerasa - PARP).

Todos los datos obtenidos se han analizado individual y colectivamente y se han estructurado según grupos para realizar los comentarios de forma acorde con los objetivos del trabajo

2.1.- Características generales de los individuos del estudio.

El estudio preliminar ha validado la muestra de pacientes para los propósitos de nuestro estudio. En este estudio se emplearon 90 ojos de 90 pacientes de ambos sexos demostrando que la capacidad oxidativa y antioxidante se puede determinar en el humor acuoso en sujetos programados para cirugía, extrayendo la muestra intraoperatoriamente y sometiendo los humores acuosos a ensayos bioquímicos para determinar la concentración de MDA y la actividad antioxidante total (AOXT).

El análisis estadístico ha analizado los datos demográficos (edad y sexo) y ha correlacionado la actividad oxidativa y antioxidante con diversos parámetros, como la reintervención antiglaucomatosa o cirugía previa, la hipertensión arterial esencial, diabetes mellitus, dislipemia o miopía moderada.

En la muestra utilizada para este proyecto de Tesis Doctoral, la edad ha sido considerada uno de los principales factores de riesgo para esta enfermedad, cuya prevalencia es del 3% en personas mayores de 50 años y de más del 5% en personas mayores de 70 años²⁴. Según datos de la OMS, el glaucoma es la segunda causa de ceguera en el mundo, sólo por detrás de las cataratas²⁵. En nuestro estudio, no hemos encontrado diferencias significativas entre la edad de hombres y mujeres, ni tampoco diferencias etarias entre los dos grupos de estudio (cabe recordar que la opacidad del cristalino es un defecto que correlaciona directamente con la edad); y al clasificar los dos grupos de estudio de acuerdo a los rangos de edad (40-49 años, 50-59 años, 60-69 años, 70-79

años y 80 o más años), el rango que incluye más número de pacientes es el comprendido entre 70-79 años. Esta observación coincide con las conclusiones del estudio que realizaron Antón y colaboradores²⁶ (Instituto de Oftalmobiología Aplicada, Valladolid, 2002) sobre una población de Segovia, en el que observaron un aumento de la prevalencia del GPAA con la edad.

En cuanto al estudio de la distribución por sexos en ambos grupos no reveló diferencias significativas (índice de masculinidad 0,841 para el grupo de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y 0,748 para el grupo de pacientes con cataratas). El glaucoma es una enfermedad multifactorial que afecta por igual a ambos sexos. En cambio, en prácticamente todos los estudios sobre glaucoma hay un mayor número de mujeres que de hombres²⁷⁻²⁹ (en nuestro estudio 181 hombres y 215 mujeres). Esto puede ser debido a que esta enfermedad está asociada a la edad, y en la población general existen más mujeres de edad avanzada que hombres. Así pues, analizando los datos demográficos pudimos constatar que no existieron diferencias significativas en cuanto a sexos entre los dos grupos.

2.2.- Moléculas analizadas en el presente estudio.

Respecto a las moléculas que se han estudiado en el presente proyecto de Tesis Doctoral, los resultados van a comentarse a continuación:

2.2.1. Actividad Oxidativa.

La formación de radicales libres por la vía de la peroxidación lipídica se ha investigado mediante la determinación de la concentración de sus metabolitos, y en particular el MDA. Este es el producto final de la peroxidación lipídica, y aunque no es totalmente específico, ha demostrado su validez como marcador de oxidación en diversos tejidos, entre ellos el globo ocular. La técnica utilizada ha sido la reacción con el ácido tiobarbitúrico y los productos que reaccionan con el (TBARS), mediante extracción con butanol y medida por fluorometría. Durante mucho tiempo, los

Discusión

resultados obtenidos han estado sometidos a debate. El hecho de que el TBA reacciona con otros productos diferentes de los derivados de la actividad oxidativa, como el ácido siálico, y que al determinarlos pueden originar resultados dudosos, ha quedado relegada debido al gran arraigo de la técnica entre los investigadores y la cantidad de publicaciones que han validado los resultados en los últimos veinte años^{23,30-32}.

Nuestros resultados muestran un aumento de la actividad oxidativa (MDA-TBARS) en los pacientes del grupo GPAA frente al grupo comparativo de pacientes operados de cataratas. A pesar de existir actividad oxidativa en el humor acuoso de ambos grupos, los resultados fueron estadísticamente superiores en los pacientes con GPAA que en los sujetos del grupo comparativo. Esto puede explicarse de forma que los sujetos con cataratas incluidos en este estudio, aunque reflejaban una edad media similar al grupo principal, presentaban cataratas ligadas al proceso normal de envejecimiento, no patológicas, y por esto se asume que deben presentar también aumento de la capacidad oxidativa de las muestras, como hemos demostrado en otros trabajos anteriores^{8,33,34}.

La actividad oxidativa se refleja por la formación de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. En condiciones fisiológicas se estima que aproximadamente el 1% del flujo electrónico de la cadena respiratoria mitocondrial genera anión superóxido, el primer radical libre. Sin embargo, cualquier alteración en el transporte de electrones puede disparar la formación de este anión superóxido, que a su vez puede reaccionar con metales de transición como el hierro (mediante las reacciones de Fenton y Haber-Weiss) para generar peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Hay que tener en cuenta que la formación fisiológica de EROX está sometida a riguroso control homeostático. Para ayudar a este control existen los antioxidantes biológicos. Aunque diversos estudios experimentales han demostrado que las EROX están implicadas en la muerte neuronal³⁵ hay una falta relativa de estudios epidemiológicos, lo que ha contribuido a la controversia alrededor de la intervención de los EROX en la fisiopatología de los procesos

neurológicos de larga duración. Nosotros hemos obtenidos resultados significativos en cuanto a la disminución de actividad antioxidante total del humor acuoso de pacientes con glaucoma pero un aumento individual de la actividad de los enzimas SOD y GPx. Estos últimos datos reflejan la reacción del tejido frente a la agresión oxidativa, en un intento de frenar la formación excesiva de las EROX y la cadena de formación de peróxidos lipídicos, como un mecanismo compensatorio. En lo que respecta a las determinaciones de SOD, hay que puntualizar que no se han determinado por separado las isoformas SOD Mn-dependiente o SOD Se-dependiente, sino la actividad global. Estas EROX pueden bien ser inductoras de los cambios observados en las células del segmento anterior en el glaucoma o bien el resultado de las alteraciones que sufren estas estructuras en el transcurso de la enfermedad. Esta cuestión aún está pendiente de clarificar, ya que con los experimentos realizados en este estudio hemos demostrado que existe un aumento de la actividad oxidativa global del humor acuoso de los pacientes con GPAA, aunque no hemos podido demostrar de forma taxativa su procedencia y si actúan en una u otra forma.

2.2.2. Actividad antioxidante.

Los enzimas antioxidantes SOD y GPx suponen la primera barrera para luchar frente a los radicales libres (anión superóxido y peróxido de hidrógeno respectivamente), a estos se unen frente a la formación excesiva de EROX los antioxidantes biológicos como el glutathion, vitamina E, carotenoides y ácido ascórbico. Con estas moléculas ocurre como con los oxidantes, la diversidad de opiniones en cuanto a los efectos en las enfermedades neurodegenerativas viene apoyada por las publicaciones a favor o en contra^{36,37}. Sin embargo, hay ciertos resultados que sustentan que la pérdida de genes antioxidantes puede inducir la pérdida neuronal. El trabajo realizado con ratones transgénicos para el gen que codifica la proteína transportadora de vitamina E demuestra que los ratones padecían degeneración retiniana y de la espina dorsal y que suplementados con vitamina E se prevenía la aparición de la lesión de la retina³⁸. Además ratones knock out para el gen de la SOD

Discusión

sufrían procesos de degeneración y muerte de las neuronas del córtex cerebral³⁹. A pesar de la polémica de su utilidad clínica, el hecho real es que cuando se excede la formación de EROX y no puede paliarse con las defensas antioxidantes aparece el estrés oxidativo, y este mecanismo es suficiente para poder dañar proteínas, lípidos o ácidos nucleicos e inducir la muerte celular por apoptosis o necrosis. En este mismo concepto coinciden los autores que han demostrado diversos cambios en la oxidación del ADN, de proteínas y lípidos en tejidos de pacientes con diversas enfermedades neurodegenerativas⁴⁰. No obstante persiste la duda de si el estrés oxidativo está implicado en el desarrollo, en la progresión o con los estadios finales de las enfermedades neurodegenerativas y por lo tanto se cuestiona la eficacia de una administración suplementaria de micronutrientes con propiedades antioxidantes, y también la dosis que debe emplearse de cada uno de los elementos implicados. Y esta discusión sigue candente en nuestros días como lo demuestra el hecho de que en la revista de Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, foro de opinión de los oftalmólogos españoles, han aparecido algunas adhesiones en contra de los antioxidantes en oftalmología⁴¹ y otras a favor⁴²⁻⁴⁴.

Además de formarse anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, que una vez generados ejercerán sus efectos nocivos sobre células y tejidos, estos pueden también reaccionar el óxido nítrico (mucho más si éste se halla en exceso) para generar aniones peroxinitrito. Los aniones peroxinitrito a su vez pueden reaccionar con el dióxido de carbono formando nitrotirosina e induciendo la cadena de peroxidación lipídica, induciendo daño a las proteínas y ácidos nucleicos.

Por todo ello, sugerimos que en aquellos pacientes con mayor riesgo de padecer pérdida de visión por causa de la evolución del glaucoma, si los marcadores de estrés oxidativo se inclinan hacia la oxidación, la suplementación micronutricional conteniendo antioxidantes sería un coadyuvante del tratamiento clásico de la enfermedad glaucomatosa, al favorecer la nutrición, la salud en general y en concreto equilibrando la actividad redox en las estructuras del globo ocular.

2.2.3. Óxido Nítrico.

El óxido nítrico (ON) es una molécula clave en la fisiología de nuestro organismo, por el gran número de funciones que cumple de forma más o menos directa. Una de ellas es la de molécula vasodilatadora, participando por esta característica en la homeostasis y disminución de la presión sanguínea. También participa en el desarrollo del sistema nervioso central, en la transmisión nerviosa y procesos de aprendizaje y memoria. Desempeña una función fundamental en la activación de la respuesta inmune. Hay que tener en cuenta que no todas sus funciones resultan beneficiosas, puesto que la alteración de su disponibilidad se ha asociado también con la aparición de ciertas enfermedades⁴⁵⁻⁴⁷. Y recientemente se ha popularizado su participación en los mecanismos patogénicos de enfermedades crónicas y degenerativas⁴⁸⁻⁵¹. ¿Cuál sería el proceso por el que el ON puede inducir la disfunción y muerte celular? Diversos fenotipos celulares son capaces de sintetizar ON. El papel que desempeña en el aprendizaje y memoria se descubrió al encontrar en el hipocampo (región del cerebro que controla estas funciones) unas neuronas que son capaces de producir ON⁵². Pero también se han descrito neuronas productoras de ON en el área visual del cerebro^{53,54}, por lo que esta molécula debe ser considerada en el contexto de la percepción visual. Además, esta característica le otorga una función reguladora del flujo sanguíneo ocular participando en la homeostasis del humor acuoso y regulación de la presión intraocular⁵⁵. Hay que considerar, que además de formarse anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, estos pueden reaccionar rápidamente con el ON para generar aniones peroxinitrito que a su vez pueden reaccionar con el dióxido de carbono formando nitrotirosina e induciendo la cadena de peroxidación lipídica, induciendo daño a las proteínas y ácidos nucleicos. De hecho, cuando el control en los niveles de óxido nítrico se pierde, éste se desvía espontáneamente y en condiciones favorables hacia la producción de peroxinitrito. En este caso, se pone de manifiesto los efectos adversos del ON, puesto que el peroxinitrito es una molécula tóxica que puede inducir “per se” daño irreversible y muerte celular por apoptosis.

Discusión

Además se ha descrito que el ON puede inducir la apoptosis mediante un mecanismo vascular.

De acuerdo con la teoría vascular del glaucoma, el daño irreversible de las células ganglionares y fibras del nervio óptico es, al menos en parte, causado por insuficiencia crónica de aporte vascular a la cabeza del nervio óptico⁵⁶. Hay evidencias de que la formación constante de óxido nítrico por las isoformas endoteliales y neuronales de la enzima óxido nítrico sintasa (de la familia de las óxido reductasa, homólogas de la citocromo reductasa P450) proporcionan el mantenimiento del tono vasodilatador basal a la cabeza del nervio óptico, lo que sustenta la hipótesis de insuficiencia vascular en esta zona. De hecho, alteraciones de disponibilidad de la óxido nítrico sintasa podrían repercutir en el equilibrio entre agentes vasoconstrictores y vasodilatadores, con el resultado de una perfusión insuficiente.

En nuestros resultados se refleja el aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles de ON en el humor acuoso de pacientes con GPAA frente a los sujetos cataratosos. Puesto que el ON se sintetiza a partir de la arginina, mediando la reacción la enzima óxido nítrico sintasa, es posible que exista una concentración elevada del enzima, o bien un aumento del precursor L-arginina y L-citrulina. En nuestro estudio no hemos realizado experimentos concretos con el enzima catalizador específico, no obstante hemos demostrado el aumento de los niveles totales de ON el humor acuoso en los pacientes con GPAA.

Sugerimos que el aumento de ON puede inclinar la balanza de vasoconstricción / vasodilatación hacia el primero, provocando un déficit de perfusión de las estructuras de la retina y nervio óptico, implicadas en la evolución de la neuropatía óptica glaucomatosa. Por otra parte, el exceso del sistema L- arginina / ON deriva en la formación de peroxinitritos, y estos provocarían el daño celular y tisular, induciendo fenómenos de degeneración y apoptosis de las células ganglionares y las fibras del nervio óptico.

Discusión

En cuanto a la técnica empleada para su determinación, hay que tener presente que el ON es un compuesto con una vida media muy corta, y muy difícil de detectar “in vivo” con técnicas convencionales. Como se puede considerar que en el organismo todo el ON se encuentra en forma de nitritos y nitratos, midiendo la concentración de estos se puede hacer una evaluación de la concentración de óxido nítrico total. En una primera etapa se transforman los nitratos presentes en nitritos, por acción de la enzima *nitrate reductasa*. Posteriormente, mediante la reacción de Griess, los nitritos se transformarán en un cromóforo derivado del nitrógeno; de modo que, midiendo por espectrofotometría la intensidad de este cromóforo, podemos determinar la concentración de ON total⁵⁷.

El ON es liberado continuamente en condiciones basales, pero el endotelio vascular aumenta su liberación en respuesta al estímulo de sustancias varias, como la acetilcolina y serotonina. Se ha descrito que, en condiciones fisiológicas, el estímulo más importante para su liberación es el efecto fricción que el aumento del flujo sanguíneo produce sobre la pared vascular (células endoteliales)⁵⁸. De todas formas, si el aumento del ON detectado en nuestros pacientes, se debiera sólo al aumento de la actividad basal de la enzima óxido nítrico sintasa en los tejidos glaucomatosos del segmento anterior ocular, este aumento de ON repercutiría en una respuesta insuficiente de la perfusión en la cabeza del nervio óptico.

Y apoyando esta hipótesis, Polak y cols.⁵⁹ han descrito que el sistema del ON está alterado en pacientes con GPAA, puntualizando que la cabeza del nervio óptico y la coroides de dichos pacientes presentan anomalías en la disponibilidad de L-arginina / ON respecto a sujetos controles, sugiriendo que de este concepto podría derivar una nueva posibilidad terapéutica para el glaucoma.

Por lo tanto, el aumento del sistema L-arginina / ON en pacientes glaucomatosos puede reflejarse en dos mecanismos patogénicos bien diferenciados y, a su vez, interconexiónados: 1) inducción de apoptosis vía formación de peroxinitritos y daño oxidativo y 2) insuficiencia vascular por alteración de la perfusión.

2.2.4. Neurotransmisores. Serotonina y 5-HIAA.

El estudio de los neurotransmisores y la función que desempeñan en la neuropatía óptica glaucomatosa puede ser de enorme importancia a la hora de elaborar nuevas terapias frente a esta enfermedad.

En este sentido, hemos estudiado los niveles de serotonina en el humor acuoso de pacientes con GPAA.

La serotonina (5-HT) es una indolamina precursora de la melatonina, que es una hormona cuya concentración varía cíclicamente y participa en una gran variedad de procesos celulares.

El potencial antioxidante de la melatonina es bien conocido⁶⁰, y ya hay evidencias que sugieren que es capaz de disminuir la presión intraocular, por lo que podría utilizarse en la terapia para el glaucoma⁶¹. Si consideramos esta hipótesis, es lógico pensar que en el glaucoma la 5-HT no está dirigida hacia la síntesis de melatonina, que disminuiría la PIO, sino que sería degradada por la enzima monoamina oxidasa (MAO) y los niveles de 5-HIAA aumentarían. Además, la melatonina tiene un elevado potencial antioxidante, por lo que sus niveles en situaciones de estrés oxidativo deben ser inferiores a los presentes en situaciones de normalidad. Nuestros datos vienen a confirmar estas hipótesis, puesto que hemos detectado unos niveles de ácido 5-hidroxiindolacético superiores estadísticamente en pacientes con GPAA, respecto a los encontrados en los pacientes con cataratas; y al mismo tiempo, hemos detectado una concentración inferior de la 5-HT en el grupo glaucoma respecto al grupo de cataratas.

Por otra parte, varios autores han demostrado que la melatonina tiene un efecto inhibitor sobre los niveles de óxido nítrico⁶²⁻⁶⁴; por lo que, en situación de estrés oxidativo, los niveles de melatonina deben de estar disminuidos respecto a una situación de normalidad, mientras que aumentarán los niveles de óxido nítrico. En nuestro trabajo no hemos evaluado los niveles de

melatonina, pero sí los de óxido nítrico (apartado anterior), apoyando las conclusiones de estos autores.

2.2.5. Marcadores de apoptosis: poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP)

Una de las hipótesis que se barajan en la neuropatía óptica glaucomatosa es que las células ganglionares de la retina sufren procesos de muerte celular programada inducida por los radicales libres⁶⁵. Hemos estudiado la presencia en humor acuoso de la proteína poli (ADP-ribosa) polimerasa, evaluando su capacidad de inducción de apoptosis. La degeneración neuronal puede estar inducida por el desequilibrio iónico (cambios en las concentraciones extracelulares de iones), la formación de radicales libres y disminución de las defensas antioxidantes, el aumento de la disponibilidad de ciertos neurotransmisores y la disminución de algunos factores de crecimiento. Ante esta variedad de etiologías, nosotros pensamos que el abordaje multifactorial de los mecanismos patogénicos del glaucoma es esencial para comprender las bases celulares y moleculares de este proceso y poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes con GPAA.

La apoptosis tiene la característica de mantener intactas las membranas celulares durante el proceso de muerte, y de permitir a las células adyacentes absorber las células moribundas para que no liberen su contenido y favorezcan la reacción inflamatoria local.

Las células que sufren apoptosis presentan una característica morfológica que es la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, condensación nuclear y citoplásmica y fragmentación del ADN en pequeños oligonucleosomas y finalmente las células o sus fragmentos son fagocitados por los macrófagos.

Entre las señales que pueden inducir la apoptosis están: el daño celular por radiaciones ionizantes, infecciones virales, señales extracelulares. De hecho, está ampliamente demostrado que ciertas señales extracelulares pueden bloquear / inhibir o promover la apoptosis, y que las mismas

Discusión

señales pueden favorecer la supervivencia celular en un fenotipo determinado mientras que pueden también favorecer el programa de suicidio celular en otros fenotipos⁶⁶.

Hay otros factores, como las neurotrofinas, que se unen a receptores de superficie y actúan previniendo la muerte celular. La invocación del programa de suicidio celular (apoptosis) implica la síntesis de moléculas específicas de ARN mensajero y su traducción subsecuente. Por todo ello aumentan las evidencias que relacionan la muerte celular con la inducción de mecanismos celulares intrínsecos.

El daño infringido al SNC provoca la pérdida irreversible de la función celular puesto que no existe apenas neurogénesis espontánea en el adulto, y las neuronas maduras no son capaces de proliferar y restaurar el tejido enfermo.

Tampoco existe regeneración como tal, porque las neuronas que han sufrido daño axonal presentan una capacidad limitada de regenerar espontáneamente y volver a emitir sus axones para realizar las sinapsis convenientemente; y además también padecen degeneración secundaria, porque la primitiva pérdida de neuronas crea un medio hostil para el resto de neuronas que en principio se salvaron del primer proceso, causándoles también la degeneración.

El glaucoma presenta las características de una enfermedad degenerativa, aunque en el listado de enfermedades neurodegenerativas de la OMS no aparece como tal. Por este motivo, los pacientes glaucomatosos que se encuentran bajo tratamiento anti-hipertensivo, también deberían recibir tratamiento neuroprotector, con el fin de reducir las señales que las células ganglionares de la retina aún supervivientes están recibiendo por parte de las neuronas en proceso de degeneración, con el fin de detener la propagación del daño neuronal y la atrofia óptica.

En este contexto, cualquier marcador que informe del daño neuronal precoz y que impida su extensión va a favorecer la estabilización de la enfermedad glaucomatosa e impedir la pérdida de visión.

Discusión

En nuestro estudio hemos demostrado que en el humor acuoso se encuentran moléculas marcadoras de apoptosis, concretamente la PARP, y que éstas se expresan mucho más (y de forma estadísticamente significativa) en el grupo de pacientes glaucomatosos que en el del grupo comparativo. Estos resultados apoyan a los obtenidos por Li y Osborne en un estudio recientemente publicado, en el cual se demuestra que la apoptosis de las células ganglionares depende de la activación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa⁶⁷.

En estos experimentos ha quedado demostrado que la expresión de estos marcadores en el humor acuoso está en relación directa al empeoramiento de los factores de riesgo de la enfermedad glaucomatosa. En el momento que estas moléculas aparecen, ya ha comenzado en parte el daño y la pérdida neuronal. Sin embargo es muy importante reconocer que la pérdida neuronal secundaria (e inducida en parte por la primera) es consecuencia de un gran número de procesos comunes a diversas enfermedades crónicas y degenerativas.

3. SOBRE LA POSIBILIDAD DE APLICACIÓN BIOMÉDICA DE LOS RESULTADOS Y SU TRASCENDENCIA EN MEDICINA PREVENTIVA

Como hemos comentado con anterioridad, el glaucoma crónico simple (GPAA) presenta todas las características de una enfermedad degenerativa, aunque en el listado de enfermedades neurodegenerativas de la OMS no aparece como tal. Los pacientes glaucomatosos que se encuentran bajo tratamiento anti-hipertensivo, también deberían recibir tratamiento neuroprotector, con el fin de reducir las señales que las células ganglionares de la retina aún supervivientes están recibiendo por parte de las neuronas en proceso de degeneración, con el fin de detener la propagación del daño neuronal y la atrofia óptica. A raíz de los resultados de este estudio, hemos identificado nuevas moléculas que pueden contribuir a la progresión de la lesión glaucomatosa, por

Discusión

una parte los agentes oxidantes, por otra parte las moléculas antioxidantes, también el óxido nítrico, la serotonina y sus metabolitos y los marcadores de apoptosis.

Por lo tanto la terapia apropiada para minimizar o prevenir la progresión del daño neuronal y la muerte de las células supervivientes es la neuroprotección, término general conocido como aquel mecanismo que neutraliza, estabiliza y previene la pérdida neuronal causada por procesos autodestructivos, y en este sentido incluimos como consecuencia de los resultados del presente estudio la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a los receptores de la 5-HT y de 5-HIAA (antagonistas, bloqueadores del Ca²⁺), antioxidantes, barredores de radicales libres, bloqueadores de la óxido nítrico sintasa 2, y el uso de genes anti-apoptóticos.

Hemos contactado con 10 expertos en el tema, con el fin de recabar toda la información precisa, aunque no hubiera sido publicada, entre ellos y citados por orden alfabético: el Dr. Jose J García-Medina, experto en exploraciones complementarias en glaucoma, de Huerca-Overa (Almería); el Prof. Francisco J. Iborra del Radcliff Hospital de la Universidad de Oxford, biólogo celular y experto en núcleo y apoptosis; el Dr. Antonio Lleó, glaucomatólogo y experto en estadística, de Valencia; el Dr. Pedro Melo, experto en biología celular y molecular y en neurotransmisores, de la Universidad de Porto en Portugal; el Prof. Alberto Muñoz del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid y coordinador del área de biomedicina del CSIC; la Prof. Begoña Olmedilla, del Instituto de Salud Carlos III, experta en antioxidantes; el Prof. Jose M. Ramírez Sebastián, catedrático de oftalmología, de la Universidad Complutense de Madrid e investigador en glaucoma la Prof. Elena Vecino, catedrático de biología de la Universidad de Leioa (Vizcaya); la Prof. M José Vinuesa Silva, de la Universidad de Salamanca y experta en glaucoma, y el Dr. Ignacio Vinuesa Silva, glaucomatólogo del Área Sanitaria del Campo de Gibraltar en Cádiz. Todos están de acuerdo en que el glaucoma es una enfermedad multifactorial que se manifiesta como una neuropatía óptica cuyo primer nivel es la hipertensión ocular y el último nivel la lesión y muerte de las células ganglionares y las fibras del nervio óptico (100%). Todos han coincidido en la

Discusión

necesidad de encontrar un marcador o marcadores precoces para la enfermedad glaucomatosa (100%). Todos demandan un fármaco que pueda contribuir a la interrupción del proceso degenerativo y frenar la pérdida de visión de los pacientes con glaucoma (100%).

Con nuestros resultados hemos aportado nuevas evidencias de la presencia e implicación de determinadas moléculas en el GPAA. El objetivo final sería informar a la población del riesgo de pérdida de visión derivada de la enfermedad glaucomatosa, la necesidad de diagnóstico precoz y control estricto de la hipertensión ocular, como primer mecanismo lesivo, de la variabilidad de la enfermedad glaucomatosa y la imbricación de diversos factores de riesgo que pueden modular el curso y el pronóstico del glaucoma. Hay que concienciar a los gobiernos de la necesidad de favorecer la investigación clínica y experimental en glaucoma para promover el conocimiento de la enfermedad y finalmente poder instaurar nuevas terapias que favorezcan el mantenimiento de la PIO y además protejan a las estructuras de la retina y nervio óptico del daño glaucomatoso, evitando la pérdida de visión y la ceguera.

La identificación precoz de pacientes con alto riesgo para el desarrollo de lesiones neurodegenerativas progresivas y sufrir atrofia óptica y ceguera es esencial en la práctica oftalmológica diaria. El diseño de algoritmos para identificación de HTO vs glaucoma, la aplicación de la calculadora de riesgo para el paciente hipertenso ocular versus glaucomatoso, la identificación de las moléculas implicadas en los mecanismos etiopatogénicos del GPAA y el control oftalmológico y el cumplimiento de los tratamientos prescritos, son la clave para un enfoque más racional hacia el seguimiento de los pacientes glaucomatosos, la instauración de un tratamiento individualizado más consistente y la mejora de la calidad de vida de estos pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Girkin CA, Kannel WB, Friedman DS, Weinreb RN. Glaucoma risk factor assessment and prevention: lessons from coronary heart disease. *Am J Ophthalmol* 2004; 138: 11-18
2. Vinuesa Silva I, De Cobos Solo de Zaldivar MV, Alberte González A, Barrera Campanario C, Pinazo-Durán MD. Eficacia de la Unidad de hipertensión ocular, en la prevención diagnóstico y despistaje del glaucoma. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007. En revisión
3. Aldridge C. The glaucoma paradox. *Optometry* 2007; 78: 320-323
4. Fechtner RD, Khouri AS. Evolving global risk assessment of ocular hypertension to glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 104-109
5. Bonovas S, Filioussi K, Tsantes A, Peponis V. Epidemiological association between cigarette smoking and primary open-angle glaucoma: a meta-analysis. *Public Health* 2004; 118: 256-261
6. Kang JH, Willett WC, Rosner BA, Hankinson SE, Pasquale LR. Prospective study of alcohol consumption and the risk of primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Epidemiol* 2007; 14: 141-147
7. Desmettre T, Rouland JF. Hypothesis on the role of nutritional factors in ocular hypertension and glaucoma. *J Fr Ophtalmol* 2005; 28: 312-316
8. Zanon-Moreno V, et al. Oxidative stress in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 2008; 17: 263-268
9. Bhatia RP, Rai R, Rao GR. Role of malondialdehyde and superoxide dismutase in cataractogenesis. *Ann Ophthalmol (Skokie)* 2006; 38: 103-106
10. Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006; 13: 151-162
11. Zorić L. Parameters of oxidative stress in the lens, aqueous humor and blood in patients with diabetes and senile cataracts. *Srp Arh Celok Lek* 2003; 131: 137-142

Discusión

12. Borchman D, Yappert MC. Age-related lipid oxidation in human lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1053-1058
13. Prata Tdos S, Navajas EV, Melo LA Jr, Martins JR, Nader HB, Belfort R Jr. Aqueous humor protein concentration in patients with primary open-angle glaucoma under clinical treatment. *Arq Bras Oftalmol* 2007; 70: 217-220
14. Hannappel E, Pankow G, Grassl F, Brand K, Naumann GO. Amino acid pattern in human aqueous humor of patients with senile cataract and primary open-angle glaucoma. *Ophthalmic Res* 1985; 17: 341-343
15. Rozsival P, Hampl R, Obenberger J, Stárka L, Reháč S. Aqueous humour and plasma cortisol levels in glaucoma and cataract patients. *Curr Eye Res* 1981; 1: 391-396
16. Yu XB, et al. Increased levels of transforming growth factor-beta1 and -beta2 in the aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2007; 38: 6-14
17. Ozcan AA, Ozdemir N, Canataroglu A. The aqueous levels of TGF-beta2 in patients with glaucoma. *Int Ophthalmol* 2004; 25: 19-22
18. Chen KH, Wu CC, Roy S, Lee SM, Liu JH. Increased interleukin-6 in aqueous humor of neovascular glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2627-2632
19. Melo P, Rodrigues LG, Pinazo-Duran MD, Tavares MA. Methamphetamine and lipid peroxidation in the rat retina. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 455-460
20. Pinazo-Durán MD, Cervera R, Pons S, Zanón-Moreno VC, Gallego-Pinazo R, Guerri C. Mechanisms of protein expression in the rat optic nerve. Modifications by alcohol exposure. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2005; 80: 99-104
21. Sevilla-Romero E, Muñoz A, Pinazo-Durán MD. Low thyroid hormone levels impair the perinatal development of the rat retina. *Ophthalmic Res* 2002; 34: 181-191

Discusión

22. Pinazo-Durán MD, Verdejo C, Azorín I, Renau-Piqueras J, Iborra FJ. Colocalization of aldehyde dehydrogenases and Fe/NADPH-induced lipid peroxidation in tissue sections of rat retina. *Ophthalmic Res* 2000; 32: 61-68
23. Verdejo C, Marco P, Renau-Piqueras J, Pinazo-Duran MD. Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies. *Eye* 1999; 13: 183-188
24. Araujo M. Glaucoma. *Cartas de la Salud* 2007; 77.
25. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti S. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 844-851
26. Anton A, Andrada MT, Mujica V, Calle MA, Portela J, Mayo A. Prevalence of primary open-angle glaucoma in a Spanish population: the Segovia study. *J Glaucoma* 2004; 13: 371-376
27. Yuan HP, et al. The prevalence of primary angle-closure glaucoma and its causes in rural area of Shuangyang district in Changchun, Jilin province. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2007; 43: 775-778
28. Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 262-267
29. Vijaya L, et al. Prevalence of open-angle glaucoma in a rural south Indian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 4461-4467
30. Pinazo-Duran MD, Lindros K, Renau-Piqueras J, Iborra FJ. Localización de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial en la retina y coroides. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1995; 69: 441-450
31. Pinazo-Durán MD, Verdejo C, Montoliu C, Guerri C. Formación de radicales libres en el globo ocular durante la intoxicación alcohólica crónica. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1999; 74: 251-260

Discusión

32. Verdejo C, Marco P, Portolés M, González-Tomás J, Pinazo-Durán MD. Formación de radicales libres y actividad antioxidante en la retinopatía diabética proliferativa (RDP). Arch Soc Esp Oftalmol 1999; 74: 243-250
33. Zanón-Moreno V, Pons S, Gallego-Pinazo R, García-Medina JJ, Alberte A, Vinuesa I, Pinazo-Duran MD. Implicación del óxido nítrico y otras moléculas con potencial redox en el glaucoma primario de ángulo abierto. Arch Soc Esp Oftalmol 2008; 83: 265-272
34. Pinazo-Duran MD, Zanón-Moreno V, Vinuesa Silva I. Los radicales libres y mecanismos antioxidantes desde otro punto de vista. Monografía. Laboratorios Thea. Ed. Domènec Pujades. 2007. ISSN 1887-8342
35. Leonardi ET, Mytilineou C. Cell culture models of neuronal degeneration and neuroprotection. Implications for Parkinson's disease. Adv Exp Med Biol 1998; 446: 203-222
36. Tatsioni A, Bonitsis NG, Ioannidis JP. Persistence of contradicted claims in the literature. JAMA 2007; 298: 2517-2526
37. Etminan M, Gill SS, Samii A. Intake of vitamin E, vitamin C, and carotenoids and the risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. Lancet Neurol 2005; 4: 362-365
38. Yokota T, et al. Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha -tocopherol transfer protein: model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 15185-15190
39. Melov S, et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. Nat Genet 1998; 18: 159-163
40. Sayre LM, Smith MA, Perry G. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. Curr Med Chem 2001; 8: 721-738
41. Diaz Llopis M, Palomares P, Amselem L, Romero J, Garcia-Delpech S. Should we prescribe antioxidant drugs in ARMD patients?. Arch Soc Esp Oftalmol 2007; 82: 195-196

42. Pinazo-Durán MD, Vinuesa-Silva I. Micronutritional supplementation in the ARMD. Arch Soc Esp Oftalmol 2007; 82: 671-672
43. Bendala-Tufanisco E, Grisolia S. Antioxidants treatment of ocular diseases. Arch Soc Esp Oftalmol 2007; 82: 673-674
44. Garcia Layana A, Salinas Alaman A, Recalde Maestre S, Fernandez Robredo P. Antioxidants and ARMD. Arch Soc Esp Oftalmol 2007; 82: 397-398
45. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 2007; 87: 315-424
46. Das RH. Nitric oxide in health & diseases. Indian J Med Res 2007; 125: 712-714
47. Zochodne DW, Levy D. Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2005; 51: 255-267
48. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol 2007; [Epub ahead of print]
49. Kotamraju S, Kalivendi S, Shang T, Kalyanaraman B. Nitric oxide, proteasomal function, and iron homeostasis--implications in aging and neurodegenerative diseases. Methods Enzymol 2005; 396: 526-534
50. Pârvu AE, Negrean V, Pleşca-Manea L, Cosma A, Drăghici A, Uifălean A, Moldovan R. Nitric oxide in patients with chronic liver diseases. Rom J Gastroenterol 2005; 14: 225-230
51. Duncan AJ, Heales SJ. Nitric oxide and neurological disorders. Mol Aspects Med 2005; 26: 67-96
52. Palumbo ML, Fosser NS, Rios H, Zorrilla Zubilete MA, Guelman LR, Cremaschi GA, Genaro AM. Loss of hippocampal neuronal nitric oxide synthase contributes to the stress-related deficit in learning and memory. J Neurochem 2007; 102: 261-274

Discusión

53. Moreno-López B, Escudero M, Delgado-Garcia JM, Estrada C. Nitric oxide production by brain stem neurons is required for normal performance of eye movements in alert animals. *Neuron* 1996; 17: 739-745
54. Yousef T, Neubacher U, Eysel UT, Volgushev M. Nitric oxide synthase in rat visual cortex: an immunohistochemical study. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004; 13: 57-67
55. de Hoz Montañana R, Ramírez Sebastián AI. Implications of nerve control of choroidal blood flow in ocular diseases. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2006; 81: 241-242
56. Flammer J, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 2002; 21: 359-393
57. Selimoglu MA, Ertekin V, Turkan Y, Akcay F. Serum nitric oxide levels in children with Wilson's disease. *Int J Clin Pract* 2007; 61: 1530-1534
58. Del Pozo JA, Pérez Caballero D. Óxido nítrico y su relación con la hipertensión arterial. *Rev Cub Med* 2000; 39: 174-179
59. Polak K, Luksch A, Berisha F, Fuchsjaeger-Mayrl G, Dallinger S, Schmetterer L. Altered nitric oxide system in patients with open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 2007; 125: 494-498
60. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27: 119-130
61. Lundmark PO, Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Cardinali DP, Rosenstein RE. Melatonin in the eye: implications for glaucoma. *Exp Eye Res* 2007; 84: 1021-1030
62. Valero N, Marina Espina L, Bonilla E, Mosquera J. Melatonin decreases nitric oxide production and lipid peroxidation and increases interleukin-1 beta in the brain of mice infected by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J Pineal Res* 2007; 42: 107-112

Discusión

63. Choi SI, Joo SS, Yoo YM. Melatonin prevents nitric oxide-induced apoptosis by increasing the interaction between 14-3-3beta and p-Bad in SK-N-MC cells. *J Pineal Res* 2008; 44: 95-100
64. Silva CL, et al. Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* 2007; 151: 195-205
65. Maher P, Hanneken A. The molecular basis of oxidative stress-induced cell death in an immortalized retinal ganglion cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 749-757
66. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449
67. Li GY, Osborne NN. Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose)polymerase and apoptosis-inducing factor. *Brain Res* 2008; 1188: 35-43

Conclusiones

Conclusiones

- 1. El humor acuoso humano es una muestra disponible durante la cirugía oftalmológica del segmento anterior, con un gran potencial diagnóstico en relación con los mecanismos patogénicos de la HTO *versus* GPAA.**
- 2. El aumento significativo de la actividad oxidativa y la disminución significativa de la capacidad antioxidante del humor acuoso de los pacientes con GPAA demuestra que existe estrés oxidativo en los estadios avanzados de la enfermedad glaucomatosa y que el resultado final de su acción sería la inducción de apoptosis sobre los tejidos oculares.**
- 3. Entre los principales factores de riesgo para la evolución de la enfermedad glaucomatosa se incluyen la hipertensión ocular, la edad y la hipertensión arterial sistémica, correlacionando a su vez estas últimas con la actividad oxidativa (*a mayor edad, mayores cifras de HTA y mayor oxidación, incrementa el riesgo de progresión del GPAA y la pérdida de la visión*), e indirectamente con la actividad antioxidante total (*cuanto mayor aumento de la edad y cifras superiores de HTA, menor actividad antioxidante total y en definitiva un riesgo aumentado para progresión del GPAA y para la ceguera*).**
- 4. El óxido nítrico está significativamente aumentado en el humor acuoso de los pacientes con GPAA en relación con la evolución de la enfermedad, mediando una variedad de efectos sobre los tejidos oculares, entre ellos mecanismos de estrés nitrosativo, anomalías en el tono vascular y en la hemodinámica, favoreciendo procesos inflamatorios, afectando la neurotransmisión y las señales intercelulares, y promoviendo la apoptosis.**
- 5. La serotonina y sus metabolitos están presentes en el humor acuoso de los pacientes con GPAA, y actuando como neurotransmisores, regularían señales intercelulares**

Conclusiones

directamente relacionadas con la homeostasis del humor acuoso. El aumento significativo del ácido 5-hidroxiindolácetico en los pacientes glaucomatosos apoyaría la pérdida de este mecanismo regulador a favor del aumento de la presión intraocular.

6. **Marcadores de apoptosis han sido detectados en el humor acuoso de pacientes con GPAA. Aunque la apoptosis es la muerte celular programada, también desempeña una función esencial en el mantenimiento de las células y tejidos. Puesto que la apoptosis está controlada por señales extracelulares y/o intracelulares, la identificación de PARP en los pacientes con glaucoma sugiere que el aumento de estos marcadores anunciaría el empeoramiento del curso de la enfermedad.**

7. **El diagnóstico precoz del glaucoma mediante los marcadores bioquímicos emergentes en humor acuoso y la inhibición de los mecanismos de inducción de la apoptosis se pueden aplicar en la clínica oftalmológica con el fin de mejorar el pronóstico visual y la calidad de vida de los pacientes glaucomatosos.**

8. **La identificación de las moléculas implicadas en la progresión del GPAA, agentes oxidantes y antioxidantes, óxido nítrico, serotonina y sus metabolitos y mediadores de la apoptosis, sugiere nuevas estrategias terapéuticas para inhibir o promover las vías de transmisión de señales implicadas en las lesiones neurodegenerativas del GPAA.**

Anexos

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: Identificación de nuevas moléculas implicadas en la neuropatía óptica glaucomatosa. Prevención de la ceguera por glaucoma.

CÓDIGO DEL PROMOTOR:

PROMOTOR:

INVESTIGADOR PRINCIPAL *Dra. M^a Dolores Pinazo Durán, Unidad Investigación Oftalmológica, 961622497*

CENTRO: *Hospital Universitario Dr. Peset*

INTRODUCCION

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO:

Se realizará un estudio de marcadores de estrés oxidativo y otras moléculas implicadas en la neuropatía óptica glaucomatosa en pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y pacientes con cataratas, para lo cual se les extraerá una muestra de humor acuoso (0.1-0.2 mL) y otra de sangre, que serán procesada en el laboratorio de la Unidad de Investigación Oftalmológica.

Anexo I

La extracción de humor acuoso se realiza mediante paracentesis, una técnica sencilla y totalmente inofensiva, al inicio del acto quirúrgico, utilizando una jeringa de 27g y un microscopio quirúrgico. La muestra sanguínea se tomará también antes de la operación, en tubo de EDTA de 4,5 mL.

Pretendemos valorar la influencia de determinadas moléculas en el desarrollo de la neuropatía óptica glaucomatosa y evaluar el daño oxidativo producido por los radicales libres sobre las estructuras de la cámara anterior y posterior del ojo humano, y determinar si la administración de un suplemento oral antioxidante puede disminuir este estrés oxidativo.

El número de pacientes ha incluir en este estudio es de 360, siendo financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Esperamos que el conocimiento de los mecanismos intrínsecos del glaucoma nos permita abordar nuevos estudios y alcanzar tratamientos que eviten la evolución inexorable hacia la ceguera de pacientes afectados de glaucoma, que no reaccionan al tratamiento médico-quirúrgico actual.

No hay ningún riesgo para el paciente puesto que la extracción de la muestra de humor acuoso se realiza mediante una técnica totalmente inocua. La cantidad de muestra que se extraerá es la suficiente para llevar a cabo las pruebas de laboratorio, y no afectará al estado de visión del paciente. La extracción de sangre es un acto que se realiza de rutina antes de una operación, y no comporta ningún riesgo para el paciente.

CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del

estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

En Valencia, de de 200

Nombre y firma:

UNIDAD HTO
Cálculo del riesgo de progresión

Nombre:

HªClínica:

Fecha:

Edad:

I / Q oftalm.

.....
 Antec. Familiares glauc. > 40 años Expec. Vida > 10 años GCC < 520µm Miopía > 6D

HTA ACV Isquemia coronaria Fenómenos vasoespásticos (Migraña, Raynaud)

Apnea del sueño Diabetes Hipotiroidismo Tabaquismo Raza negra

.....
 Tratamiento hipotensor anterior SI NO ¿Cuál? Desde

PIO pretratamiento: OD mm Hg.
 OI mm Hg.

PIO objetivo: OD mm Hg.
 OI mm Hg.

Fecha					
A.V.					
PIO mm Hg.		Riesgo Glauc %		Riesgo Glauc %	
GCC µM					
P A P I L A	E/P				
	Δd Vertical E				
	Muesca ANR				
	Palidez				
	Hemorragias				
	V. bayoneta				
	Atrofia perip.				
Asimetría AO					
Área ANR mm ²					
C.V.					
Tto.					
Sgmto.					

LABORATORIO OFTALMOLOGÍA
FICHA ENSAYO

Ensayo n°:

Test:

Fecha:

Nombre investigador:

Comentarios:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Unidad Investigación Oftalmológica
“Santiago Grisolia”**

ENCUESTA EXPERTOS GLAUCOMA

Contactamos con Vd. Desde la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” de Valencia con el fin de solicitar su colaboración en una encuesta sobre GLAUCOMA.

Esta Encuesta será voluntaria y los resultados serán analizados estadísticamente por los responsables del estudio. Los datos serán utilizados solo y exclusivamente para adjuntar a la Sección Discusión del Proyecto de Tesis Doctoral de **D. Vicente C. Zanón Moreno**, inscrita en el Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

Su colaboración es esencial para lograr una integración de los datos de laboratorio con la práctica oftalmológica diaria.

Rogamos remitan a su disponibilidad sus opiniones al respecto.

	SI	NO	A VECES	NUNCA
¿Considera que el Glaucoma es un proceso multifactorial?				
¿Es la PIO un factor esencial para el desarrollo del Glaucoma?				
¿Es la Muerte de las Células Ganglionares y fibras del nervio óptico la causa de la neuropatía glaucomatosa?				
¿Consideraría otros factores en el curso de la enfermedad glaucomatosa?				
¿Vd. apreciaría el desarrollo de marcadores para la enfermedad glaucomatosa?				
¿Si consideramos la neurodegeneración en la etiopatogenia del glaucoma, los fármacos encaminados a frenarla serían apreciados en la práctica oftalmológica diaria glaucomatosa?				

**- PLANTILLA 3 -
RESULTADOS REDOX**

DATOS DE LA OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA REDOX														
Procedencia	Muestra	Fecha Recepción	Fecha Extracción	Estado	Cantidad	OD	OI	Proteínas	T	MBA	AOXT	SOD	GPx	ON
DATOS DE LOS PACIENTES														
Apellidos	Nombre	Edad	Sexo	Raza	Domicilio	Telefono								

