



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Cirugía

TESIS DOCTORAL

Evaluación preclínica de la toxicidad
retiniana en la administración
intravítrea de ácido
docosahexaenoico en modelo
experimental de conejo.

Presentada por: Rosa Dolz Marco

Dirigida por: Prof. Manuel Díaz Llopis
Dra. M^a Dolores Pinazo Durán
Dr. Roberto Gallego Pinazo

Valencia, 2013



D. MANUEL DIAZ LLOPIS

Catedrático de Oftalmología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Oftalmología en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

D. ROBERTO GALLEGO PINAZO

Facultativo Especialista de Oftalmología. Sección de Mácula del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

Dña. MARIA DOLORES PINAZO DURAN

Profesor Asociado Asistencial del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Jefe de Grupo de Investigación en desarrollo y envejecimiento del Sistema Visual en la Unidad de Investigación Oftalmológica "Santiago Grisolia", Valencia

Como directores del proyecto de Tesis Doctoral titulado:

"Evaluación preclínica de la toxicidad retiniana en la administración intravítrea de ácido docosahexaenoico en modelo experimental de conejo"

CERTIFICAN:

Que la doctoranda Dña. ROSA DOLZ MARCO, ha realizado todos los experimentos expuestos en este trabajo bajo nuestra supervisión. Que ha redactado el texto y realizado la iconografía que contiene, con el resultado del presente formato, que reúne los requisitos metodológicos y el valor científico adecuados para ser presentado y defendido para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

En Valencia a 19 de Noviembre de 2012

FIRMADO:

M. DÍAZ LLOPIS

R. GALLEGO-PINAZO

MD. PINAZO-DURÁN

Agradecimientos

A todos los que directa o indirectamente me habéis ayudado en estos meses, en especial a mis padres por su incansable apoyo.

A mis directores de tesis el Prof. Díaz Llopis, el Dr. Gallego Pinazo y la Dra. Pinazo Durán, por sus valiosos consejos y por ser un estímulo constante en mi profesión.

Índice.

Resumen	1
Abstract	3
Resum	5
Abreviaturas	7
Listado de figuras	9
Listado de tablas	13
1. Introducción.	17
1.1. Embriogénesis de la retina .	17
1.1.1. Embriogénesis temprana	17
1.1.2. Formación de las capas de la retina	19
1.2. Anatomía de la retina.	22
1.2.1. Anatomía macroscópica de la retina	22
1.2.2. Histología de la retina	23
1.2.3. Vascularización de la retina.	32
1.3. Pruebas retinianas funcionales de diagnóstico.	34
1.3.1. Introducción	34
1.3.2. Pruebas electrofisiológicas	37
1.4. El estrés oxidativo.	42
1.4.1. Generalidades	42
1.4.2. Los radicales libres	42

1.4.3. Origen de los radicales libres	43
1.4.4. Mecanismos de daño celular por los radicales libres	44
1.4.5. Mecanismos de defensa frente a los radicales libres	46
1.4.6. El ojo como diana del estrés oxidativo.	48
1.5. Los ácidos grasos.	50
1.5.1. Generalidades	50
1.5.2. Clasificación de los AG	51
1.5.3. AG poliinsaturados	53
1.5.4. Funciones de los PUFAs	55
1.6. Ácido docosahexaenoico (DHA).	58
1.6.1. Generalidades	58
1.6.2. DHA en la retina: distribución y funciones	60
1.6.3. Respuesta ante el estrés oxidativo	65
1.7. Suplementación dietética con AG.	68
1.7.1. AG en la superficie ocular	70
1.7.2. AG en el glaucoma	72
1.7.3. AG en la retina, los fotorreceptores y las neuronas	72
1.7.4. AG en la salud macular	74
1.8. Modelo experimental y estudios de toxicidad.	76
1.8.1. Marco legal	76
1.8.2. Estudios de toxicidad retiniana	78
1.9. Justificación del estudio.	83
2. Objetivos e hipótesis de trabajo.	87
2.1. Objetivos del estudio.	87

2.2.	Hipótesis de trabajo.	89
3.	Metodología.	93
3.1.	Animales.	96
3.2.	La inyección intravítrea.	96
3.3.	Electrorretinograma.	100
3.4.	Examen histológico	103
3.5.	Análisis bioquímico de humor vítreo y acuoso.	108
3.6.	Análisis estadístico.	112
3.7.	Criterios de fin de estudio.	113
4.	Resultados y desarrollo argumental.	115
4.1.	Observación clínica.	116
4.2.	Electrorretinograma.	121
4.3.	Hallazgos histológicos	128
4.4.	Análisis bioquímico de las muestras de humor acuoso y vítreo.	140
5.	Discusión.	143
6.	Conclusiones.	153
7.	Bibliografía	157
	Anexo 1	193

Resumen.

Objetivo: Evaluar la toxicidad retiniana a corto plazo de la administración intravítrea de una dosis única de ácido docosahexaenoico (DHA) en un modelo experimental de conejo.

Material y métodos: Dieciséis conejos albinos Nueva Zelanda fueron seleccionados para este estudio toxicológico preclínico. Se prepararon seis concentraciones de DHA (Brudy Laboratorios, Barcelona, España): 10mg/50µl, 5mg/50µl, 2'5mg/50µl, 50µg/50µl, 25µg/50µl, 5µg/50µl. Cada concentración fue inyectada por vía pars plana en inyección intravítrea en el ojo derecho de dos conejos. La solución vehículo se inyectó en el ojo derecho de cuatro animales que se consideraron el grupo control. Se evaluó la seguridad retiniana de cada concentración de DHA mediante la exploración clínica oftalmológica y la realización del electrorretinograma. Los animales fueron eutanasiados y sus ojos fueron enucleados y procesados para el estudio histológico mediante microscopía óptica. Al mismo tiempo se tomaron muestras de humor acuoso y vítreo

Resumen

para la cuantificación de ácidos grasos por cromatografía de gases. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 21.0.

Resultados: El examen clínico reveló una gran reacción inflamatoria en el segmento anterior en los conejos a los que se administró las concentraciones más altas (10mg/50µl, 5mg/50µl, 2'5mg/50µl). Las concentraciones inferiores de DHA no produjeron respuesta inflamatoria. Los parámetros estudiados en el electroretinograma y el examen histológico morfológico y morfométrico no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los conejos de los grupos control y aquellos en los que se administró una inyección intravítrea de DHA, salvo para la dosis de 50µg/50µl.

Conclusión: Nuestros resultados indican que el DHA administrado por vía intravítrea es un agente farmacológico seguro en el modelo de conejo albino con una dosis máxima tolerada de 25µg/50µl. Este estudio deberá completarse con nuevos estudios que permitan evaluar el efecto de la administración intravítrea de DHA como tratamiento, *per se* o en combinación con otros fármacos, de diferentes enfermedades de la retina.

Abstract.

Purpose: to evaluate the retinal toxicity of a unit dose of intravitreal pure docosahexaenoic acid (DHA) in rabbit eyes over a short-term period.

Methods: Sixteen New Zealand albino rabbits were selected for this toxicology pre-clinical study. Six concentrations of DHA (Brudy Laboratories, Barcelona, Spain) were prepared: 10mg/50 μ L, 5mg/50 μ L, 2.5mg/50 μ L, 50 μ g/50 μ L, 25 μ g/50 μ L, and 5 μ g/50 μ L. Each concentration was injected intravitreally in one eye of two rabbits. As a control, the vehicle solution was injected into one eye of four animals. Retinal safety was studied by slit-lamp examination, and electroretinography. All the rabbits were euthanized one week after the intravitreal injection of DHA and the eyeballs were processed to morphologic and morphometric histologic examination by light microscopy. At the same time aqueous and vitreous humor samples were taken to quantify the concentration of omega-3 acids by gas chromatography. Statistical analysis were performed by SPSS 21.0

Abstract

Results: Slit-lamp examination revealed an important inflammatory reaction on the anterior chamber of the rabbits injected with the higher concentrations of DHA (10mg/50 μ l, 5mg/50 μ l, 2'5mg/50 μ) Lower concentrations showed no inflammation. Electroretinography and histological studies showed no significant difference between control and DHA-injected results at any of the concentrations except for the group injected with 50 μ g/50.

Conclusions: Our results indicate that administration of intravitreal DHA is safe in the albino rabbit model up to the maximum tolerated dose of 25 μ g/50 μ L. Further studies should be performed in order to evaluate the effect of intravitreal injection of DHA as a treatment, alone or in combination of different retinal diseases.

Resum.

Objectiu: Avaluar la toxicitat retiniana a curt termini de l'administració intravitria d'una dosi única d'àcid docosahexaenoic (DHA) en un model experimental de conill.

Material i mètodes: Setze conills albins Nova Zelanda van ser seleccionats per a aquest estudi toxicològic preclínic. Es van preparar 6 concentracions de DHA (Brudy Laboratoris, Barcelona, Espanya): 10mg/50µl, 5mg/50µl, 2'5mg / 50µl, 50µg/50µl, 25µg/50µl, 5µg/50µl. Cada concentració va ser injectada per via pars plana en injecció intravitria a l'ull dret de dos conills. La solució de vehicle es va injectar a l'ull dret de quatre animals que es van considerar el grup control. Es va avaluar la seguretat retiniana de la injecció intravitria de cadascuna de les concentracions de DHA mitjançant l'examen anatòmic i funcional que va incloure l'exploració oftalmològica i la realització de l'electroretinograma. Els animals van ser eutanasiats i els seus ulls van ser enucleats i processats per a l'estudi histològic mitjançant microscòpia òptica. Al mateix temps es

Resum

varen obtenir mostres de humor aquós i vitre per a la quantificació de àcids omega-3 per cromatografia de gasos. L'anàlisi estadística es va realitzar amb el programa SPSS 21.0.

Resultats: L'examen clínic va revelar una gran reacció inflamatòria en el segment anterior en els conills als quals es va administrar les concentracions més altes de DHA (10mg/50µl, 5mg/50µl, 2'5mg / 50µl). Les concentracions inferiors de DHA no van produir resposta inflamatòria. Els paràmetres estudiats al electrorretinograma i l'examen histològic morfològic i morfomètric no van mostrar diferències estadísticament significatives entre els conills dels grups control i aquells en què es va administrar una injecció intravitria de DHA, excepte per a la dosi de 50µg/50µl.

Conclusió: Els nostres resultats indiquen que el DHA administrat per via intravitria és un agent farmacològic segur en el model de conill amb una dosi màxima tolerada de 25µg/50µl. Aquest estudi s'ha de completar amb nous estudis que permetin avaluar l'efecte de l'administració intravitria de DHA com a tractament, per se o en combinació amb altres fàrmacs, de diferents malalties de la retina.

Abreviaturas.

AG: ácido graso.

CCG: capa de células ganglionares.

CFN: capa de fibras nerviosas.

CG: células ganglionares.

CNE: capa nuclear externa.

CNI: capa nuclear interna.

CPE: capa plexiforme externa.

CPI: capa plexiforme interna.

DHA: ácido docosahexaenoico.

DPA: ácido docosapentaenoico.

EOG: electrooculograma.

EPA: ácido eicosapentaenoico.

EPR: epitelio pigmentario de la retina.

ERG: electrorretinograma.

Fa: factor de conversión derivado de la magnificación del análisis de imágenes.

Abreviaturas

Fc: factor de conversión derivado de la magnificación del microscopio.

NB: neuroblástica.

NPD1: neuroprotectina D1.

PEV: potenciales evocados visuales.

PL: peroxidación lipídica.

PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados del inglés PolyUnsaturated Fatty Acids.

RL: radicales libres.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SEF/SE: segmentos externos de los fotorreceptores.

SIF/SI: segmentos internos de los fotorreceptores.

Listado de figuras.

Figura 1: Esquema del desarrollo embriológico del ojo humano.

Figura 2: Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales de la retina humana.

Figura 3: Retinografía.

Figura 4: Imagen histológica de la retina.

Figura 5: Detalle de la estructura histológica de la retina a nivel de la mácula.

Figura 6: Esquema de la estructura formada por los fotorreceptores, el EPR y la coriocapilar.

Figura 7: Estructura de los fotorreceptores.

Figura 8: Representación de las principales estructuras de la vía óptica (percepción y transmisión) y las pruebas electrofisiológicas para evaluarlas.

Figura 9: Esquema de las fuentes exógenas de radicales libres.

Listado de figuras

Figura 10: Sistemas de defensa enzimáticos frente al estrés oxidativo.

Figura 11: Clasificación y nomenclatura de los ácidos grasos esenciales.

Figura 12: Metabolismo del DHA con producción de NPD1, su metabolito más importante.

Figura 13: Imágenes de retinas de humana, de mono, de conejo y de rana donde se muestra la distribución de DHA.

Figura 14: Distribución del DHA en la retina.

Figura 15: Esquema del metabolismo del DHA desde que se ingiere hasta su incorporación a los fotorreceptores.

Figura 16: Dispositivo portátil de ERG y utensilios necesarios para la realización de las pruebas electrofisiológicas.

Figura 17: Aspecto clínico macroscópico de los conejos de los grupos 2,3 y 4.

Figura 18: Detalle del aspecto clínico macroscópico de uno de los conejos del grupo 4.

Figura 19: Aspecto clínico macroscópico de los conejos de los grupos 6,7 y 8.

Figura 20: Diagramas de cajas para las distintas variables ERG estudiadas según los grupos.

Figura 21: Montaje de cortes histológico de cada conejo estudiado.

Figura 22: Gráfico de cajas de la media de densidad de núcleos teñidos de células ganglionares en los distintos grupos.

Figura 23: Diagrama de cajas para las distintas variables histológicas estudiadas según los grupos.

Listado de figuras

Listado de tablas.

Tabla 1: Esquema de las capas de la retina y los componentes celulares que las forman.

Tabla 2: Esquema de los tipos de vascularización retiniana existentes en los animales vertebrados.

Tabla 3: Signos indicativos de dolor en el conejo.

Tabla 4: Distribución por grupos según las concentraciones de DHA administradas por vía intravítrea.

Tabla 5: Distribución por grupos según las concentraciones de DHA administradas con código de colores gradual proporcional a la concentración.

Tabla 6: Datos estadísticos descriptivos de ERG por grupos de tratamiento.

Tabla 7: Datos de comparación de 2 variables relacionadas (Variables de ERG pre-inyección y variables de ERG post-inyección) analizados por el test de Wilcoxon.

Listado de tablas

Tabla 8: Comparación de variables de ERG en grupos tratados respecto a grupos control mediante el test estadístico U de Mann-Whitney.

Tabla 9: Correlación entre las distintas variables de ERG post-inyección y la dosis de DHA inyectadas según los test no paramétricos de Tau de Kendall y Rho de Spearman.

Tabla 10: Datos de correlación entre la dosis de DHA administrada y la densidad de células ganglionares.

Tabla 11: Datos de comparación de medias de la densidad de núcleos teñidos de células ganglionares de cada grupo inyectado con DHA respecto a los grupos control mediante el test U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon.

Tabla 12: Datos estadísticos descriptivos de las distintas medidas histológicas por grupos de tratamiento.

Tabla 13: Datos de correlación entre la dosis de DHA empleada y los valores de espesor retiniano total y por capas según el test de Tau de Kendall y Rho de Spearman.

Tabla 14: Comparación de medias de las variables histológicas en grupos tratados respecto a grupos control mediante el test estadístico U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon.

Tabla 15: Concentraciones de DHA medidas en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en humor vítreo y acuoso una semana después de la inyección intravítrea de DHA.

Tabla 16: Datos de correlación entre la dosis inoculada y la concentración de DHA en humor acuoso y vítreo una semana post-inyección.

Listado de tablas

1. Introducción

1.1. Embriogénesis de la retina

1.1.1. Embriogénesis temprana

La placa neural, derivada del ectodermo, es el precursor embrionario del sistema nervioso, incluyendo la retina. La primera manifestación del desarrollo de la retina en el ser humano aparece a partir de la tercera semana de gestación, antes del cierre del tubo neural (Creuzet S et al, 2005; Meier S, 1982; Barishak RY y Ofri R, 2007). Inicialmente se forman unos surcos poco profundos a cada lado del cerebro anterior (**surcos ópticos**), que en pocos días dan lugar a las **vesículas ópticas** (Etchevers HC et al, 1999). Entre la cuarta y la sexta semana las vesículas ópticas empiezan a invaginarse formando la **copa óptica** que queda unida al encéfalo por el **tallo óptico**. Esta invaginación en forma de cáliz deja una hendidura que se cerrará progresivamente, la **fisura retiniana**, por la que accede la arteria hialoidea, rama de la arteria oftálmica que aporta la irrigación a la retina y el cristalino en desarrollo.

Introducción

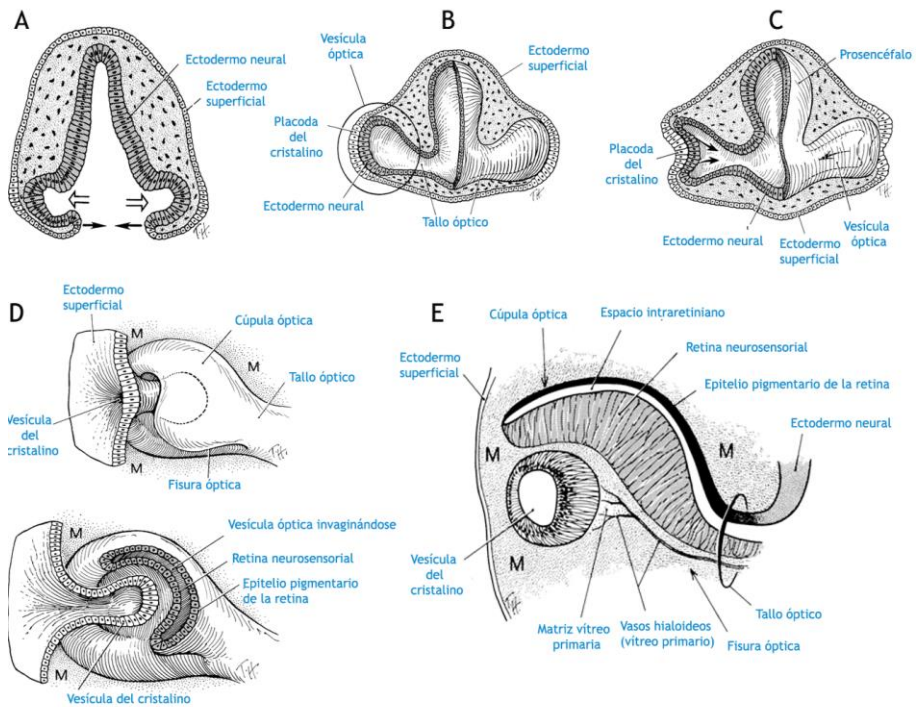


Figura 1: Esquema del desarrollo embrológico del ojo humano que muestra el desarrollo de las vesículas ópticas a partir del tubo neural (A y B), con la progresiva invaginación de las vesículas ópticas (C) para finalmente formar las copas ópticas (D). En el detalle de la copa óptica (E), correspondiente a un embrión de 5 semanas, se aprecia la diferenciación entre retina neurosensorial y epitelio pigmentario de la retina. Modificada de Cook CS et al, 1995.

La gruesa pared interna de la copa óptica (**disco retiniano primitivo**), que dará lugar a la retina neural, se subdivide en capa interna (*marginal enucleada*) en contacto con la placoda del cristalino y capa nuclear externa (*germinativa o proliferativa*). Por otra parte, la pared externa de la copa óptica comienza a tener

gránulos de pigmento melánico a partir del día 33 de desarrollo y formará posteriormente el epitelio pigmentario de la retina (EPR). (Barishak RY y Ofri R, 2007; Creuzet S et al., 2005; Fuhrmann S, 2010; Hollenberg MJ y Spira AW, 1972; Meier S, 1982).

1.1.2. Formación de las capas de la retina

Las estructuras oculares siguen creciendo, produciéndose la mayoría de divisiones celulares en la capa externa germinativa, desde donde oleadas de células emigran en dirección al cuerpo vítreo primitivo (Zaghloul NA et al, 2005). Además, la capa germinativa proyecta unos cilios hacia la superficie de la capa del futuro EPR que desaparecerán durante la séptima semana de gestación y serán reemplazados por los precursores de los segmentos externos de los fotorreceptores durante el cuarto mes de desarrollo embrionario. Por otro lado, los axones de las células de la retina neural crecen en dirección al cerebro por medio del tallo óptico, que se convertirá en el **nervio óptico** (Williams RW et al, 1991).

Introducción

La diferenciación de las capas de la retina comienza cuando prácticamente han cesado las mitosis y tiene lugar entre la sexta semana y el octavo mes de desarrollo. Esta maduración se extiende desde las zonas internas en contacto con el humor vítreo (*zona marginal*) hacia las capas externas de la cúpula óptica, y desde el centro hacia su periferia. Las células ganglionares de la retina y las células de Müller se desarrollan simultáneamente con la misma distribución desde el centro hacia la periferia (Hagedorn M et al, 1998; Willbold E et al, 1996). Debido a estos movimientos celulares migratorios, en torno a la semana 7 de gestación, el epitelio neural se separa en dos capas: *neuroblástica interna* y *externa*, separadas por una estrecha banda acelular llamada *capa fibrilar transitoria de Chievitz* que desaparecerá entre la octava y décima semanas de desarrollo embrionario. Las células ganglionares, los conos, las células horizontales y algunas células amacrinas son las primeras en abandonar el ciclo celular y por tanto madurar (Fujitani Y et al, 2006; Gallego-Pinazo R et al, 2010). Le siguen el resto de células amacrinas y por último los bastones y las células bipolares (Chalupa LM, 1998).

En el momento del nacimiento, están presentes las células ganglionares y horizontales y la mayoría de células amacrinas y conos; sin embargo, algunos bastones de la periferia, las células de Müller y algunos conos continuarán diferenciándose hasta el tercer mes de vida.

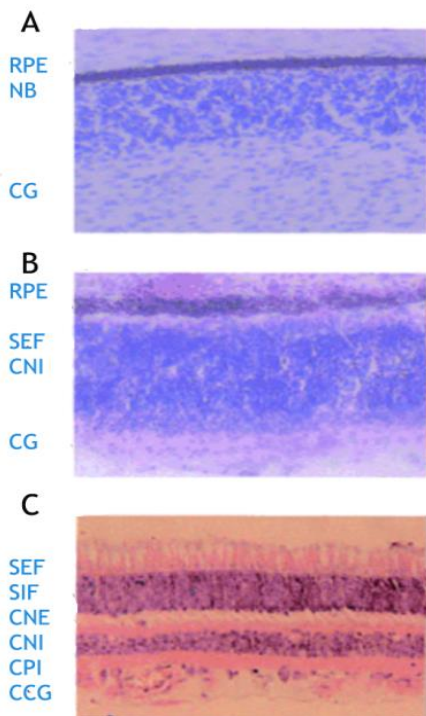


Figura 2: Imágenes de microscopía óptica de secciones transversales de la retina humana. A: semana 8 de desarrollo embrionario, se observa el epitelio pigmentario de la retina (EPR), la capa neuroblástica (NB) y las células ganglionares (CG). B: Progresivamente aparecen los segmentos externos de los fotorreceptores (SEF) y la capa nuclear interna (CNI). C: En las últimas semanas de desarrollo embrionario podemos observar la mayoría de las capas de la retina madura; Los segmentos externos e internos de los fotorreceptores (SEF y SIF), las capas nuclear externa e interna (CNE y CNI), la capa plexiforme interna (CPI) y la capa de células ganglionares (CCG). (Imagen extraída de Gallego-Pinazo R, 2010)

En la semana 9 de desarrollo, aparecen dos nuevas capas que rodean a la retina neural, la *membrana limitante externa* entre el EPR y la parte externa de la neurorretina, y la *membrana limitante*

Introducción

interna que la separa del cuerpo vítreo primitivo. Las capas definitivas de la retina adulta se pueden visualizar a partir del octavo mes y se originan de las capas neuroblástica interna (capa de células ganglionares y células de soporte) y externa (capa de fotorreceptores).

1.2. Anatomía de la retina

1.2.1. Anatomía macroscópica de la retina

Se pueden distinguir varias regiones en la retina, desde la periferia hacia el centro (Grenn WR; 1996).

- **Periférica o anterior:** desde la ora serrata, adyacente a la pars plana, hasta el ecuador.
- **Ecuatorial:** alrededor del ecuador
- **Mácula:** región central de la retina, donde encontramos desde la periferia; la perifóvea, la parafóvea y la fóvea. En la figura 3 se puede observar con detalle la estructura macroscópica de la mácula.

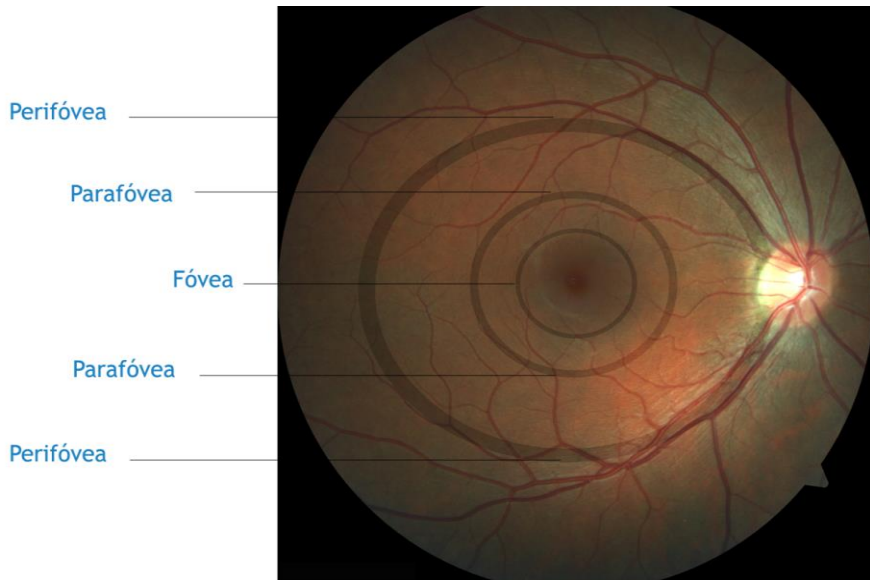


Figura 3: Retinografía que muestra la localización topográfica en la mácula de la fovea, la parafóvea y la perifovea.

1.2.2. Histología de la retina

La retina consta de 10 capas distinguibles en los cortes histológicos. Simplificando esta estructura, en todos los vertebrados podemos encontrar tres capas celulares y dos capas sinápticas. En el esquema de la figura 4 se muestra la organización histoarquitectural de la retina y con más detalle en la figura 5. La composición de cada capa se esquematiza en la tabla 1 (Kaufman PL y Alm A, 2003; Spaide RF et al, 1999; Ramón y Cajal S, 1884-1892).

Introducción

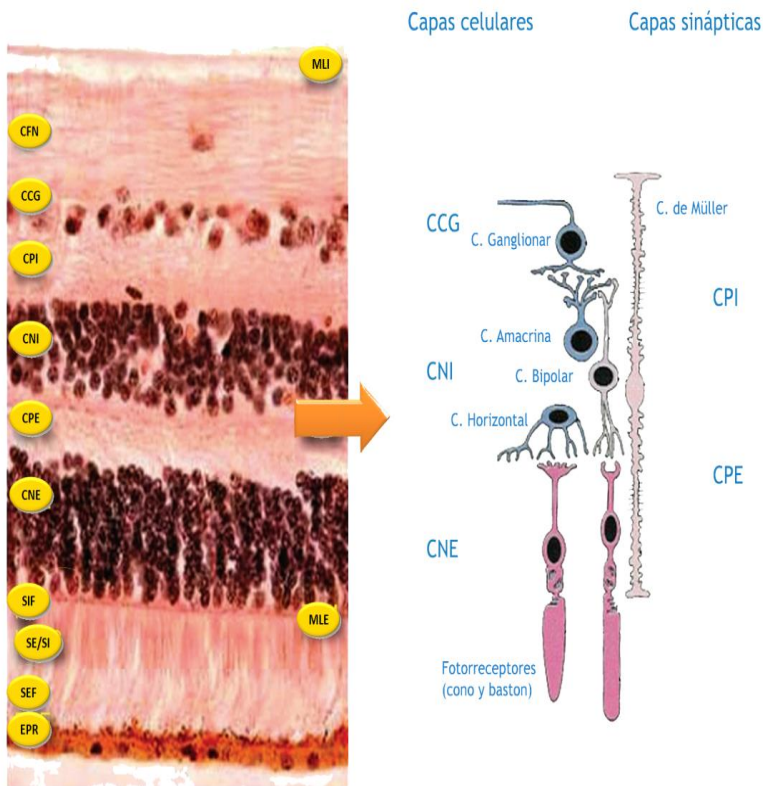


Figura 4: A la derecha, imagen histológica en la que se diferencian las 10 capas de la retina; desde las capas externas a las internas: EPR (Epitelio pigmentario de la retina), capa de los fotorreceptores donde se distingues los SEF (segmentos externos de los fotorreceptores), la SE/SI (unión entre los segmentos externos e internos de los fotorreceptores, SI (segmentos internos de los fotorreceptores; MLE (membrana limitante externa); CNE (capa nuclear externa); CPE (capa plexiforme externa); CNI (capa nuclear interna); CPI (capa plexiforme interna); CCG (capa de células ganglionares); CFN (capa de fibras nerviosas) y MLI (membrana limitante interna). A la izquierda, esquema básico de la arquitectura celular de la retina, donde se distinguen tres capas celulares y dos sinápticas.

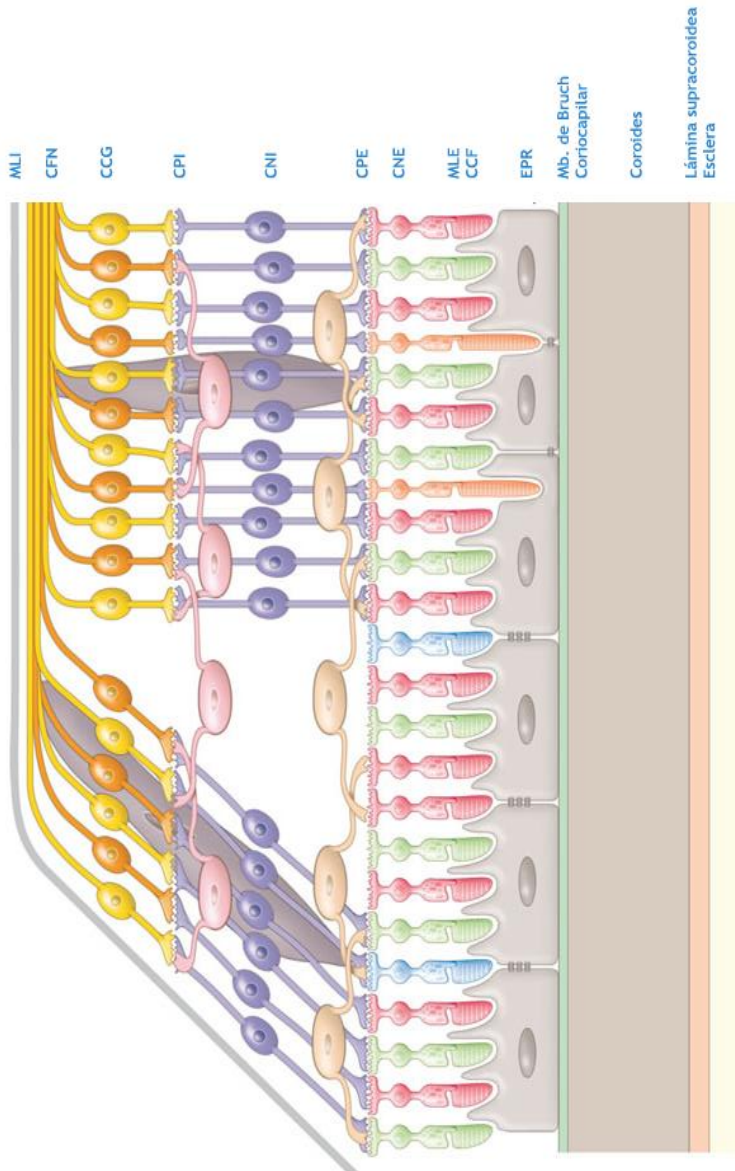


Figura 5: Detalle de la estructura histológica de la retina a nivel de la mácula. Extraída de Caputo G, Décollements de rétine, Rapport 2011 Société Française d’Ophtalmologie.

CAPA	COMPONENTES
EPR	Células del epitelio pigmentario de la retina.
C. Fotorreceptores	Segmentos externos de los fotorreceptores y de las células de Müller.
Mb. Limitante Externa	Segmentos internos de los fotorreceptores (conos y bastones) y parte de las células de Müller.
C. Nuclear Externa	Somas de los conos y los bastones.
C. Plexiforme Externa	Axones de los conos y bastones que hacen sinapsis con las dendritas de las células bipolares, de las células horizontales y con otros fotorreceptores.
C. Nuclear Interna	Somas de las células bipolares, de las células de Müller, células horizontales y células amacrinas.
C. Plexiforme Interna	Axones de las células bipolares y amacrinas que hacen sinapsis con las dendritas de las células ganglionares.
C. C. Ganglionares	Somas de las células ganglionares.
C. Fibras Nerviosas	Axones de las células ganglionares.
Mb. Limitante Interna	Membrana basal y extremos distales de las células de Müller.

Tabla 1: Esquema de las capas de la retina y los componentes celulares que las forman.

Células del EPR: Es la capa más externa de la retina, y descansa sobre la membrana de Bruch que la separa de la coroides. Se trata de una monocapa celular hexagonal con fuertes uniones celulares y prolongaciones en su zona apical que rodean los segmentos externos de los fotorreceptores, sin unirse a ellos. Tiene varias funciones muy importantes: 1) barrera hematorretiniana entre la coroides y la retina neural, 2) transporte activo de metabolitos, 3) fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores y reciclaje de los pigmentos visuales, 4) absorción de la luz dispersa. En la figura 6 se ilustra el complejo formado por la coroides, el EPR y los fotorreceptores (Marmor MF y Wolfensberger TJ, 1998) .

En muchos animales vertebrados se encuentra una estructura que facilita la visión en situaciones escotópicas. Se trata del **tapetum lucidum**, situado entre el EPR y la coroides. Aquí el EPR de la retina carece de pigmento, por lo que los fotones que no han sido absorbidos por los fotorreceptores atraviesan el EPR sin ser absorbidos y llegan al tapetum para ser reflejados de nuevo hacia la retina neural. Por tanto esta estructura actúa como un espejo que

Introducción

refleja los la luz dispersa para aumentar las probabilidades de que sea absorbida y facilitar la visión en condiciones de escasa luminosidad (Ollivier FJ et al, 2004).

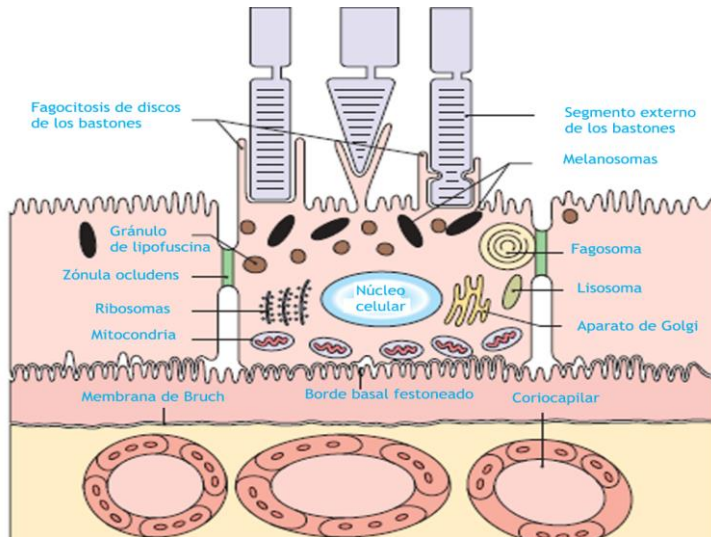


Figura 6: esquema de la estructura formada por los fotorreceptores, el EPR y la coriocapilar, la estructura intracelular del EPR, con gran cantidad de organelas intenta poner de manifiesto la actividad metabólica realizada por éste. Imagen modificada de Spalton DJ et al, Atlas of Clinical Ophthalmology. 3rd Edition. 2005 Ed. Elsevier.

Fotorreceptores: Existen dos tipos de fotorreceptores, los bastones y los conos. Los primeros, se encargan de la visión en condiciones escotópicas, mientras que los conos lo hacen en condiciones fotópicas y contribuyen a la visión cromática. Los dos

tipos tienen la misma estructura básica que se explica en la figura 7 (Hagedorn M et al, 1998).

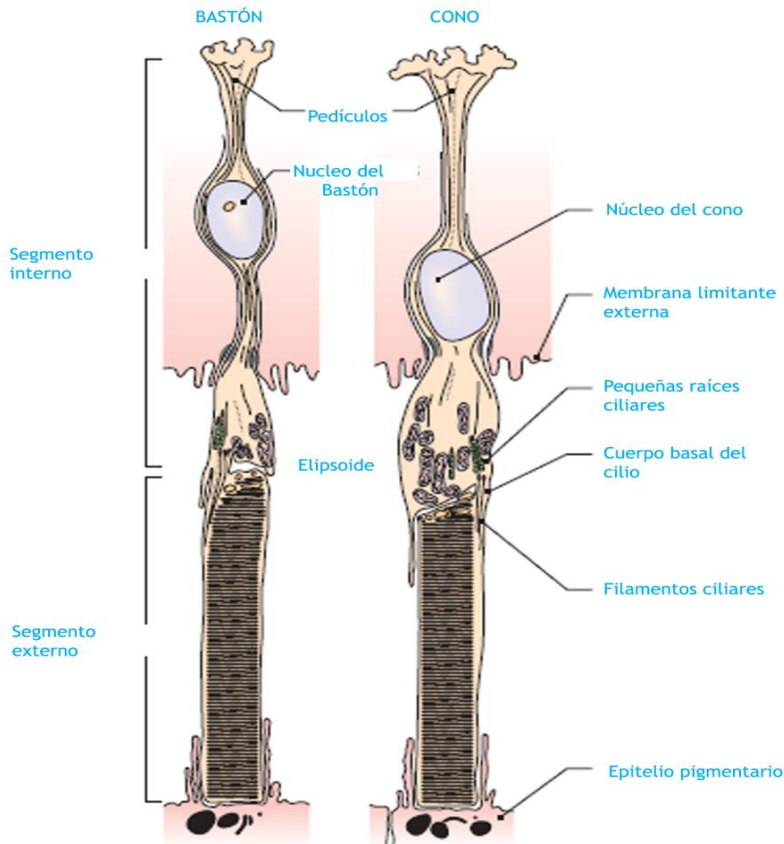


Figura 7: Los fotorreceptores se estructuran en: 1) segmento externo que constituye la porción fotosensible ya que está compuesto por discos que contienen el pigmento visual; 2) Cilio: región estrechada; 3) Segmento interno: subdividida a su vez en porción elipsoide, que contiene mitocondrias y porción mioide, que contiene el aparato de Golgi y ribosomas; 4) una fibra conectora entre el segmento interno y el núcleo que es corta en los conos y de tamaño variable en los bastones; 5) Un núcleo; 6) Una fibra conectora interna que conecta el núcleo con la región sináptica; 7) Región sináptica. Imagen modificada de Spalton DJ et al, Atlas of Clinical Ophthalmology. 3rd Edition. 2005 Ed. Elsevier.

Células horizontales: Son neuronas que interconexionan con otras células a nivel de la CPE y cuyo soma se encuentra en la CNI. En los mamíferos podemos distinguir el tipo HI, con axón, cuyas dendritas contactan con los conos y los bastones y el tipo HII, en el humano con axón y en el conejo sin axón, que sólo contacta con conos.

Células bipolares: Son las células encargadas de conducir la señal desde las CPE, donde hacen sinapsis con los fotorreceptores, hasta la CPI donde conectan con las células ganglionares y amacrinas. Su soma se encuentra en la CNI. Existe clara diferencia entre las células bipolares para bastones, de las que sólo se conoce un subtipo, y las células bipolares para cono, que se subdivide en 8 o 10 subtipos dependiendo del patrón de ramificación de sus dendritas (Fujitani Y et al, 2006).

Células amacrinas: Son neuronas con una gran cantidad de dendritas pero carentes de axón. Su soma asienta en la CNI. Sus terminaciones dendríticas hacen sinapsis con otras células

amacrinas, con los axones de las células bipolares y con las dendritas de las células ganglionares.

Células interplexiformes: Son neuronas cuyo pericarion se encuentra en la CNI y emite terminaciones sinápticas a ambas capas plexiformes.

Células gliales: El principal grupo celular glial de la retina lo constituyen las células de Müller. Estas células aportan un soporte estructural a la retina de forma radial, atravesando todas sus capas, y rodeando el resto de neuronas. Su soma se localiza en la CNI. Tiene importantes funciones como almacenar glucógeno y proveer glucosa a las neuronas, mantener la homeostasis y el equilibrio iónico y reciclar los aminoácidos liberados en las sinapsis. Otros tipos de células gliales son los astrocitos que se localizan en la CPI y la CCG y las células microgliales de naturaleza fagocítica.

Células ganglionares: Destaca de estas células su gran soma, localizado en la CCG, sus dendritas hacen sinapsis en la CNI como ya hemos comentado, y sus axones pasan a formar la CFN, siguiendo la

Introducción

dirección hacia la papila para formar el nervio óptico. Constituye la tercera neurona de la vía óptica.

1.2.3. Vascularización de la retina.

La retina es uno de los tejidos con mayor actividad metabólica del organismo, de ahí la importancia del aporte de nutrientes y oxígeno. La retina más externa (fotorreceptores) recibe el aporte vascular de la capa coriocapilar, un sistema capilar de las arterias coroideas que se ramifica desde las arterias ciliares. La retina interna, en cambio, se nutre de los vasos propios de la retina que son ramas de la arteria central de la retina que a su vez es rama de la arteria oftálmica. Las arterias de la retina interna forman dos capas capilares, la primera de ellas, más superficial, se sitúa en la capa de células ganglionares y la capa de fibras nerviosas. La segunda red capilar se localiza en la capa nuclear interna. Las retinas se pueden clasificar según su patrón de vascularización como vemos en la tabla 2.

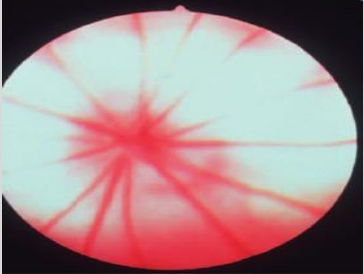
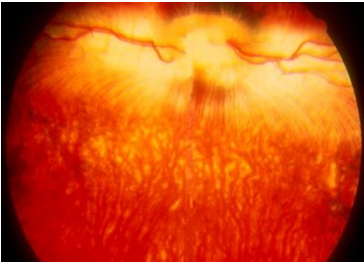
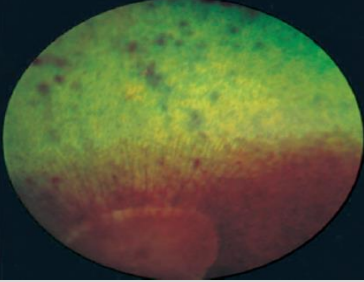
Tipo	Características	Retinografía y ejemplos
Holoangiótica	<p>Toda la retina interna recibe aporte sanguíneo de una arteria central (primates) o de arterias ciliarretinianas que emergen radialmente desde el nervio óptico (mayoría de mamíferos)</p>	 <p>Mayoría de los mamíferos</p>
Merangiótica	<p>El aporte vascular se localiza a nivel nasal y temporal únicamente</p>	 <p>Conejos</p>
Paurangiótica	<p>Los vasos son filiformes y abarcan un reducido espacio alrededor del nervio óptico, dejando la mayor parte de la retina avascular</p>	 <p>Caballo, rinoceronte, elefante y marsupiales</p>
Anangiótica	<p>Ausencia de vasos en la retina interna</p>	<p>Aves, reptiles y anfibios y algunos mamíferos (armadillo, Chinchilla, ...)</p>

Tabla 2: Esquema de los tipos de vascularización retiniana existentes en los vertebrados.

Introducción

Otro aspecto importante en la vascularización de la retina, y que diferencia lo diferencia de otros tejidos, es la existencia de la barrera hematorretiniana. Está compuesta principalmente por el EPR, que separa la retina neural de la coroides. El segundo componente de esta barrera es el endotelio de los vasos de la retina interna.

1.3. Pruebas retinianas funcionales de diagnóstico.

1.3.1. Introducción

La activación de las células visuales retinianas provoca unas reacciones bioquímicas que, a su vez, desencadenan los fenómenos eléctricos que propagan los influjos sensoriales a lo largo de las vías ópticas hasta la corteza occipital. Podemos clasificar la vía óptica en 2 grandes estructuras (Brigell M et al, 1998) representadas en la Figura 8:

Estructuras de percepción: fotorreceptores -conos y bastones.

La región macular o central contiene una gran densidad de conos y la retina periférica, con una superficie mil veces mayor, contiene un

número de bastones mucho mayor que el de conos; la densidad de estos últimos va disminuyendo desde el centro hacia la periferia.

Estructuras de transmisión: Son tres neuronas: La célula bipolar, la célula ganglionar y la tercera neurona que conduce el estímulo visual desde el diencefalo hasta el córtex occipital a través de las radiaciones ópticas.

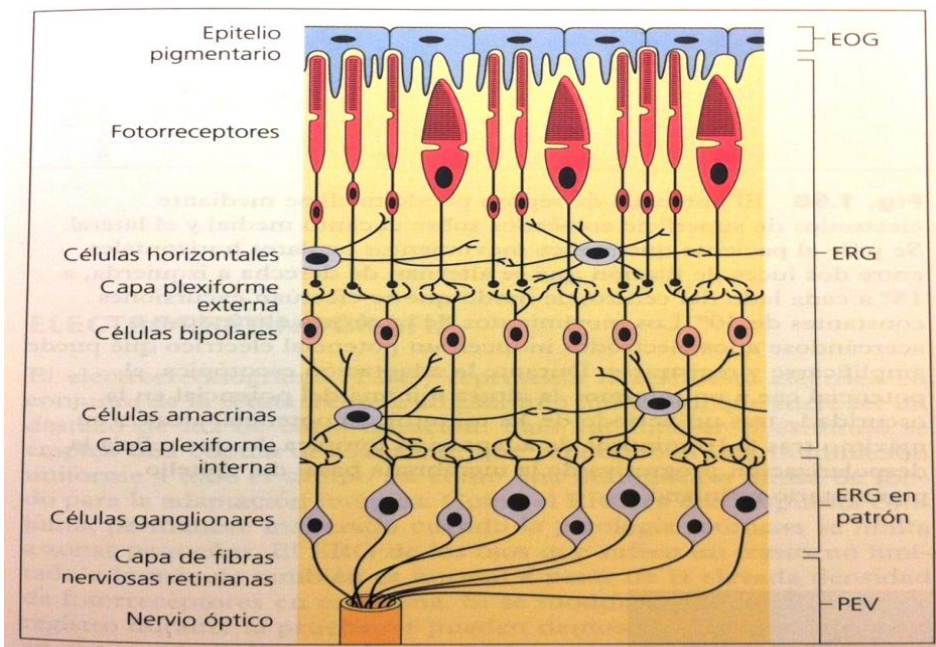


Figura 8: Representación de las principales estructuras de la vía óptica (percepción y transmisión) y las pruebas electrofisiológicas que evalúan cada tipo celular. Extraída de Spalton DJ et al, Atlas de Oftalmología Clínica. 3ª Edición. 2006. Ed. Elsevier

Introducción

El ser humano es capaz de ver en las longitudes de onda comprendidas entre 400 y 750 nanómetros. La máxima sensibilidad del ojo es variable según esté adaptado a la luz o a la oscuridad y así hablamos de visión fotópica, escotópica y mesópica. Los conos son responsables de la visión fotópica, es decir: los colores y detalles. Los bastones son responsables de la visión escotópica, acromática y muy sensible a bajos niveles luminosos.

Para provocar respuestas eléctricas de la retina y la vía óptica se utilizan básicamente dos tipos de estímulos: los **estímulos luminosos con flash** (destellos de corta duración - luz blanca o filtros de color rojo, azul o naranja-) y los **estímulos estructurados o pattern** (dameros, -generalmente en blanco y negro-).

El registro de las respuestas eléctricas se realiza mediante la colocación de electrodos y generalmente se usa un amplificador de la señal obtenida. Finalmente un sistema informático recibe y analiza las señales eléctricas provenientes de los electrodos.

1.3.2. Pruebas electrofisiológicas.

A continuación se describen las principales técnicas electrofisiológicas empleadas para evaluar el sistema visual y su utilidad clínica.

Electrooculograma (EOG): mide la variación del potencial de reposo (unos 6 milivoltios) entre la córnea (positivo) y la parte posterior del ojo (negativo) en relación con los cambios de incidencia de la luz sobre la retina que se producen con los movimientos oculares. El coeficiente de Arden (1962) compara la variación de la amplitud de dicho potencial en condiciones de iluminación y oscuridad, es normal cuando es superior a 1,85 (Marmor MF, 1998). El EOG explora la **integridad del epitelio pigmentario** (oscuridad) y el complejo fotorreceptores-epitelio pigmentario (iluminación).

Es especialmente útil en el diagnóstico de la enfermedad de Best, siendo secundario en otras degeneraciones retinianas hereditarias. Puede ser un buen parámetro de seguimiento en las enfermedades inflamatorias difusas y en la oclusión de vena central

Introducción

de la retina, así como en la monitorización del tratamiento con didanosina (Papakostopoulos D et al, 1992; Ohn YH et al, 1991; Ikeda H et al, 1989; Francis PJ et al, 2005; Neubauer AS et al, 2003; Hayreh SS et al, 1989).

Electrorretinograma flash (ERG): es el registro de la respuesta eléctrica en masa de los **fotorreceptores y células no neuronales** de la retina inducida por estímulos luminosos difusos. La respuesta eléctrica retiniana se manifiesta como una onda formada por: la **onda a** (negativa): se origina en los fotorreceptores: conos y bastones; las **ondas b1 y b2** (positivas): se originan en las células de Müller y las células bipolares; las **ondas e** o potenciales oscilatorios: aparecen en la cresta ascendente de la onda b, se forman en las capas medias de la retina (células amacrinas) y se correlacionan con la irrigación de esta zona. Cabe destacar que las células ganglionares no participan en el ERG flash.

Las distrofias difusas de fotorreceptores son las enfermedades en las que clásicamente se ha utilizado el ERG como prueba de

diagnóstico y seguimiento. En la retinosis pigmentaria y síndromes asociados las alteraciones electrofisiológicas suelen preceder a los cambios fundoscópicos (Kaye SB et al, 1988; Krauss GL et al, 1998, Neubauer AS et al, 2003; Hayreh SS et al, 1989).

Electrorretinograma multifocal (mfERG): consiste en la estimulación simultánea de diferentes áreas de la retina central permitiendo la obtención de un mapa topográfico de la respuesta de los 30 a 50° centrales de la retina (Sutter EE y Tran D, 1992). Es muy sensible a las **alteraciones de los fotorreceptores** y puede detectar y delimitar la extensión de lesiones incluso antes de que podamos ver cambios fundoscópicos. En casos de degeneración macular asociada a la edad la afectación de la densidad de respuesta y del tiempo de latencia es mayor en las formas húmedas que en las atróficas. El mfERG es especialmente útil en el seguimiento de la DMAE y en las membranas neovasculares asociadas a miopía, sobre todo tras la aplicación de tratamientos como la terapia fotodinámica (Marmor MF et al, 2003; Kretschmann U et al, 2000; Kondo M et al, 1995; Li J y Tso MO, 2001).

Electrorretinograma patrón (pERG): consiste en la medición de la respuesta retiniana central ante un estímulo estructurado, generalmente un damero de luminancia constante que alterna blanco y negro. Dependiendo de la frecuencia de alternancia del estímulo obtendremos el pERG transitorio o “transient” (menos de 6 cambios por segundo, 3 Hz), o bien el pERG regular o “steady-state” (proceso de inversión superior a 10 veces por segundo, 5 Hz). Se trata de una prueba muy interesante puesto que evalúa la **función macular** a diferencia del ERG convencional que evalúa la respuesta retiniana en masa. Además permite la diferenciación electrofisiológica entre maculopatías y neuropatías y facilita la interpretación de los potenciales evocados visuales.

Potenciales evocados visuales (PEV): Consisten en la respuesta eléctrica provocada por las estimulaciones visuales de la corteza occipital. Los PEV exploran la **integridad de la vía visual** desde la mácula hasta la corteza occipital, valorando la función desde los fotorreceptores (especialmente del área central) hasta el córtex occipital, pasando por las células bipolares y las células ganglionares.

En la práctica clínica habitual se obtienen básicamente tres tipos de registros: los **PEV estructurados reversibles** o **“pattern reversal”**: el estímulo es un damero que alterna de blanco a negro con luminancia constante; los **estructurados tipo “onset/offset”**: el estímulo no alterna sino que aparece y desaparece manteniendo la luminancia constante y los **PEV tipo flash** en los que el estímulo es una fuente de luz.

En los estudios realizados con animales de experimentación el análisis funcional objetivo de la función retiniana y de la vía visual es realizado mediante las pruebas electrorretinográficas. Este método ha sido ampliamente utilizado en evaluaciones de toxicidad retiniana (Gao H et al, 2006; Albin TA et al, 2007; Pereira de Almeida Manzano RP et al, 2009; Ginsanti F et al, 2008; Fiore T et al, 2010). Existen artículos que han protocolizado el estudio de ERG según las distintas especies animales utilizadas y sus características principales (diurnas o nocturnas) que comportan cambios en el protocolo de adaptación para el estudio escotópico y fotópico respectivamente (Rosolen SG et al, 2005).

1.4. El estrés oxidativo

1.4.1. Generalidades

El estrés oxidativo es un desequilibrio en la homeostasis de óxido-reducción intracelular. Este fenómeno se puede producir por una deficiencia de antioxidantes, una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o una combinación de ambos, conduciendo al daño celular cuando los mecanismos de reparación y recambio de biomoléculas no son suficientes.

1.4.2. Los radicales libres

Desde el punto de vista químico, todo compuesto que puede aceptar electrones es un agente oxidante; por el contrario, los compuestos que donan electrones son reductores. Una reacción de oxidación va siempre acompañada de una de reducción y viceversa (reacción REDOX) (Halliwell B y Gutteridge JM, 1990).

Generalmente los agentes oxidantes se denominan en biología ROS y se pueden clasificar en dos grupos: radicales y no radicales. El

grupo de *agentes radicales*, llamados RL tienen en común que todos poseen un electrón desapareado en su orbital más externo, lo cual le confiere inestabilidad y una gran reactividad. Son agentes radicales el oxígeno, el anión superóxido, el anión hidroxilo, el anión peróxido, el anión alcoxilo y el óxido nítrico. Por otra parte, el grupo de *compuestos no radicales* engloba una gran variedad de sustancias reactivas tales como el peróxido de hidrógeno, el ozono, el peróxido orgánico, el ácido hipocloroso, los aldehídos, el oxígeno singlete y el peroxinitrito.

Las ROS se forman en gran cantidad de situaciones tanto fisiológicas como patológicas, pero existen mecanismos de defensa antioxidantes para mantener el equilibrio REDOX. (Fridovich I, 1978).

1.4.3. Origen de los radicales libres

Las ROS pueden ser tanto exógenas como endógenas. Las **fuentes exógenas**, resumidas en la figura 9, son: el oxígeno, el ozono, las radiaciones y los xenobióticos. (Roth RN y Weiss LD, 1994, Pinazo-Durán MD et al, 1999).

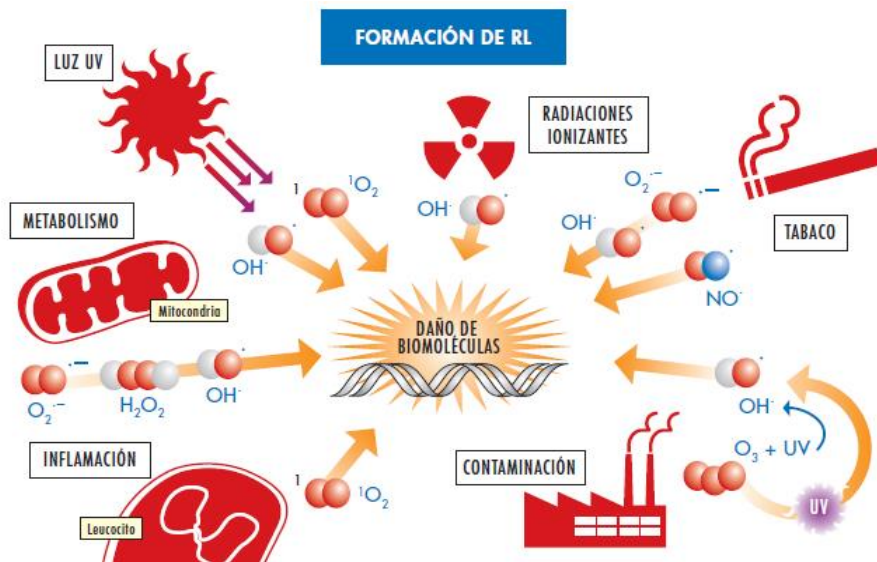


Figura 9: Esquema de las fuentes exógenas de radicales libres (Tomado de García Medina et al., 2005).

Las principales **fuentes endógenas** son: la oxidación mitocondrial o cadena respiratoria, la fagocitosis, los enzimas, la síntesis de prostaglandinas, la isquemia-reperfusión y la NO-sintetasa. (Cadenas E y Sies H, 1998; Freeman BA y Crapo JD, 1982).

1.4.4. Mecanismos de daño celular por los radicales libres

Los principales efectos citotóxicos de los RL y de las especies reactivas no radicales son consecuencia de su interacción con los lípidos de las membranas celulares, las proteínas y los ácidos nucleicos. Las alteraciones que se enumeran a continuación han sido

implicadas en la muerte celular y otros procesos tales como el envejecimiento, la carcinogénesis y la apoptosis y son: la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación de ácidos nucleicos.

- **Daño a lípidos: la peroxidación lipídica (PL).** Todas las membranas celulares, mitocondriales y del retículo endoplásmico son especialmente vulnerables a la oxidación debido a su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs del inglés PolyUnsaturated Fatty Acids) (Ross R, 1993). Se produce una reacción en cadena: *iniciación*, *propagación* y *terminación*, siendo la consecuencia final el daño de la membrana celular, así como la inhibición de la actividad de proteínas enzimáticas y estructurales asociadas a la propia pared celular que condicionan una rápida muerte celular.

- **Daño a Proteínas.** Pueden actuar sobre las proteínas de diferentes formas (Comporti M, 1985; Stadtman ER, 1992): *oxidando los aminoácidos aromáticos* (triptófano, tirosina), *fragmentando*

Introducción

proteínas, formando entrecruzamientos y agregación de proteínas producidos por la creación de puentes disulfuro intramoleculares.

- **Daño de los Ácidos Nucleicos.** El principal agente lesivo es el radical hidroxilo que puede dañar directamente las cadenas de ADN o modificar las bases nitrogenadas que van a ser incorporadas al ADN, dando lugar a compuestos anómalos del tipo de la deoxiguanosina (Fraga CG et al., 1990; Izzoti A et al, 2006). Estas alteraciones causan desde deleciones y mutaciones puntuales hasta ruptura de cadenas y/o trastornos estructurales incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida de cromosomas.

1.4.5. Mecanismos de defensa frente a los radicales libres

- **Sistemas de defensa enzimáticos:** se trata de un mecanismo intracelular en el que las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y el sistema aldehído-deshidrogenasa eliminan las ROS una vez formadas. (Keller GA et al. 1991; Barja G, 1997; Holmes RS et al, 1991; Pinazo-Durán et al. 2000).

- **Captadores de RL o "scavengers":** enlentecen considerablemente las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a los RL transformándolos en otras sustancias menos agresivas. Pueden ser hidrosolubles o citosólicos (glutation y ácido ascórbico) o liposolubles o de membrana (vitamina A y E). (Koskela TK et al, 1989; Krinsky NL, 1993; Galbis-Estrada et al, 2012).

- **Quelantes de metales de transición:** son moléculas que captan el hierro (ferritina y transferrina) y el cobre (ceruloplasmina) impidiendo que estos metales actúen como catalizadores de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss.

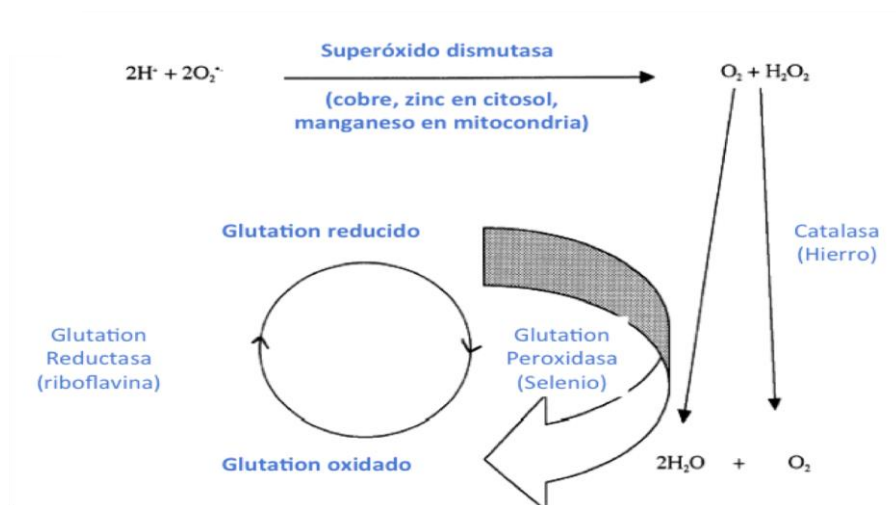


Figura 10: Sistemas de defensa enzimáticos frente al estrés oxidativo en el organismo. (Imagen modificada de Beatty et al. 2000).

Introducción

1.4.6. El ojo como diana del estrés oxidativo.

Se ha relacionado el estrés oxidativo con diversos procesos de envejecimiento (Doria E et al, 2012) y con muchas enfermedades, como la aterosclerosis (Bian K et al, 2008), las enfermedades de Parkinson (Kumar H et al, 2012) y Alzheimer (Sinha M et al, 2012), la dermatitis (Nakai K et al, 2012), el cáncer (Chen EI, 2012), el asma (Lee IT y Yang CM, 2012), las enfermedades neurodegenerativas (Sultana R et al, 2012), los problemas de infertilidad (Agarwal A y Allemanesi SS, 2011), la hipertensión arterial (Viridis A et al, 2011), la diabetes mellitus (Tran B et al, 2012) o la artritis reumatoide (Winyard PG et al, 2011) entre otras muchas que están en fase de investigación.

Oftalmológicamente, se considera que la exposición constante de los ojos a las radiaciones ionizantes, agentes contaminantes industriales, humo del tabaco y de la conducción determina que los tejidos oculares sean más susceptibles al ataque oxidativo. Todas las

partes del ojo son vulnerables al daño por ROS, sin embargo, la retina es especialmente susceptible, por diversas razones:

Alta producción de RL. Los fotorreceptores en su segmento interno poseen una considerable cantidad de mitocondrias. Esto, unido a que es un tejido que necesita un alto consumo de oxígeno, provoca la formación significativa de RL a partir de la cadena respiratoria.

La **fagocitosis de los fotorreceptores** por el EPR genera **peróxido de hidrógeno**.

Exposición crónica a la luz azul (sumado al efecto lupa generado por la córnea y el cristalino) hacen que la exposición foveal sea hasta 100 veces mayor que la exposición de la piel.

Abundante cantidad de **moléculas diana** susceptibles al daño oxidativo. Se ha encontrado una alta concentración de PUFAs (el 60% es ácido docosahexaenoico, -DHA-) en el segmento externo de los fotorreceptores. La susceptibilidad de estas moléculas para ser dañadas por los RL se debe a la gran cantidad de dobles enlaces que

Introducción

poseen. Cada doble enlace es fuente de átomos de hidrógeno, que contienen un electrón. Dicho electrón es captado por el RL iniciando la cascada de peroxidación lipídica.

Dada esta especial susceptibilidad de los tejidos oculares al daño oxidativo, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto la relación causal entre el estrés oxidativo y diversas enfermedades oculares crónicas. Es el caso de la catarata (Vinson JA, 2006), el glaucoma (Izzoti A et al , 2006; Zanón-Moreno V et al, 2008; Pinazo-Durán MD et al, 2012), la retinosis pigmentaria (Berson EL, 2000), la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (Richer S et al, 2001; AREDS report nº 8, 2001) o la retinopatía diabética y otras alteraciones vasculares retinianas (Kowluru RA, 2005 ; García-Medina JJ, 2005; García-Medina JJ et al, 2011).

1.5. Los ácidos grasos

1.5.1. Generalidades.

Los lípidos del organismo comprenden las grasas neutras (triglicéridos), los fosfolípidos y el colesterol. La parte lipídica de los

triglicéridos y los fosfolípidos son los ácidos grasos (AG). Los AG son ácidos orgánicos de cadena larga de hasta 24 átomos de carbono, un grupo carboxilo y una cadena hidrocarbonada apolar, la cual les confiere su naturaleza insoluble en agua. El colesterol no contiene AG, pero su núcleo esterol se sintetiza a partir de productos de la degradación de dichos ácidos, lo que le confiere muchas de las propiedades físicas y químicas de estos lípidos.

1.5.2. Clasificación de los AG.

El **número de átomos de carbono** nos permite clasificarlos en tres grupos; los de *cadena larga* (más de 12 carbonos); los de *cadena media* (entre 8 y 12 carbonos); los de *cadena corta* (menos de 8 carbonos). Se escribe C seguido del nº de carbonos: C8, C20, C22...;

Un segundo nivel de clasificación lo proporcionan el **número de enlaces dobles** presentes y el nivel de saturación con átomos de hidrógeno (H). Ello nos permite clasificarlos como: de tipo *saturado*, cuando presentan el máximo número posible de H, al no presentar ningún enlace doble (ac palmítico C16:0; ac esteárico C18:0); *monoinsaturados*, cuando presentan dos H menos de los posibles

Introducción

por disponer de un solo enlace doble (ac palmitoleico C16:1 ω 7; ac oleico C18:1 ω -9); y tipo *poliinsaturados*, cuando presentan 4, 6, 8... H menos de los posibles, por presentar un número superior de enlaces dobles (ac linoleico C18:2 ω 6; ac α -linolénico C18:3 ω 3). Los escribimos colocando el número de enlaces dobles detrás del número de átomos de carbono, separando ambas cifras mediante dos puntos(:) (C18: 1).

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Fórmula
<i>Familia Ω-6:</i>			
Linoleico	Cis-9,12, -octadecadienoico (LA)	18:2 Ω -6	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
γ - linolénico	Cis-6,9,12 -octadecatrienoico	18:3 Ω -6	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Dihomoglinolénico	Cis-8,11,14 -eicosatrienoico	20:3 Ω -6	C ₂₀ H ₃₄ O ₂
Araquidónico (AA)	Cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 Ω -6	C ₂₀ H ₃₂ O ₂
Adrénico	Cis-7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4 Ω -6	C ₂₂ H ₃₆ O ₂
Osmond	Cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5 Ω -6	C ₂₂ H ₃₄ O ₂
<i>Familia Ω-3:</i>			
α -linolénico	Cis-9,12,15-octadecatrienoico (ALA)	18:3 Ω -3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Estearidónico	Cis-6,9,12,15-octadecatetraenoico	18:4 Ω -3	C ₁₈ H ₂₈ O ₂
Timnodónico	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA)	20:5 Ω -3	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
Clupanodónico	Cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA)	22:5 Ω -3	C ₂₂ H ₃₄ O ₂
Cervónico	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA)	22:6 Ω -3	C ₂₂ H ₃₂ O ₂

Figura 11: Clasificación y nomenclatura de los ácidos grasos esenciales.

La **posición de los enlaces dobles** en la molécula permite la clasificación metabólica-nutricional. Ello se determina empezando a contar por el carbono más lejano al grupo carboxilo; el del extremo metilo terminal (ω : omega). Cuando el primer enlace doble se halla en posición 6 se habla de la familia *omega 6*, que se escribe añadiendo un 6 después de la letra ω (linoleico; C18: 2 ω 6). Cuando el primer enlace doble se halla en posición 3, hablamos de familia *omega 3*, y se escribe añadiendo un 3 después de la letra ω (Docosahexaenoico; C22: 6 ω 3).

La **ordenación espacial** cis o trans del enlace doble le confiere una estructura más laxa o más compacta que modifica el estado físico (el punto de fusión) del ácido graso: esteárico 69,9 °C; linoleico -5,0 °C, linolénico -11,0 °C, oleico 13,4 °C.

1.5.3. AG poliinsaturados.

Los PUFAs se caracterizan por ser ácidos grasos de cadena larga que contienen en su estructura dos o más dobles enlaces. En los últimos años se han estudiado sus funciones biológicas así como su capacidad preventiva y paliativa en diversas enfermedades

Introducción

(Simopoulos AP, 1991; Gill I y Valivety R, 1997). Entre ellos, cabe destacar los ácidos grasos ω -6 y ω -3. Los ω -6 se encuentran representados principalmente por el ácido graso linoleico (LA) y derivados suyos como el γ -linoleico (GLA), el dihomo- γ -linoleico (DHGLA) y el araquidónico (AA o ARA). Los ω -3 están compuestos por α -linolénico (ALA) y sus derivados, principalmente el ácido eicosapentaenoico (EPA), el docosapentaenoico (DPA) y el docosahexaenoico (DHA).

Los PUFAs se hallan formando parte de una amplísima variedad de seres vivos tanto del reino animal como del reino vegetal. Sin embargo, se encuentran sobre todo en los microorganismos (especialmente las algas, los hongos y las bacterias) y también en los insectos, ya que poseen las enzimas desaturasas y elongasas requeridas para la producción de uno de todos estos ácidos (Yongmanitchai W y Ward OP, 1991; Ratledge C, 1993). Las plantas superiores y los animales superiores rara vez contienen ácidos grasos de cadena superior a 18 carbonos debido a la falta de las enzimas necesarias para producirlos. Por ello no son capaces de sintetizar de

Novo LA, ALA o PUFAs de mayor longitud. Sin embargo, una vez obtenidos, sí son capaces de transformarlos en otros PUFAs (Grammatikos SI, 1994). La consecuencia es que estos ácidos grasos son **esenciales** para los animales superiores, incluidos los mamíferos, que se aprovisionan de ellos a través de fuentes tales como microorganismos o plantas.

Los AG ω -6 se encuentran en mayor concentración en la mayoría de los aceites vegetales, principalmente en los obtenidos del lino, la borraja, la primula, el girasol. En cambio, los ácidos grasos poliinsaturados de la familia ω -3 como el EPA o el DHA los debemos obtener de los aceites que provienen del mar y el plancton, en la grasa del pescado azul y en las microalgas.

1.5.4. Funciones de los PUFAs.

Función estructural. Los PUFAs son componentes esenciales tanto de las membranas celulares como de las organulares, donde se encuentran principalmente formando parte de fosfolípidos (Gill I y Valivety R, 1997; Gawrisch K et al,2003). Son importantes para la regulación de la arquitectura y la dinámica de estas membranas y

Introducción

también para el control de muchos procesos asociados. Regulan proteínas de membrana tales como la ATPasa, proteínas de transporte y complejos de histocompatibilidad y modulan las interacciones con componentes extracelulares como las proteínas de unión a ácidos grasos (Gill I y Valivety R, 1997; Grammatikos SI et al, 1994; Suchner U y Senftleben U, 1994). Así mismo, son capaces de regular la expresión de ciertos genes, incluyendo la ácido graso sintetasa, la óxido nítrico sintetasa, los canales de sodio o la colesterol-7- α -hidrolasa con lo que afectan a diversos procesos que incluyen la biosíntesis de ácidos grasos, la inducción del cáncer y la regulación del colesterol (Clarke SD, 2001; Baillie RA et al, 1996). Además los PUFAs desarrollan importantes funciones sobre la expresión genética de cuatro familias de factores de transcripción, como son los receptores activadores de la producción de peroxisomas (PPAR), receptores X de hígado (LXRs), factor nuclear hepático 4 (HNF-4) y proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) (Jump DB, 2002).

También tienen un impacto importante en actividades bioquímicas de las células, tales como los procesos de transporte y los procesos estímulo-respuesta celulares. Se encuentran implicados en procesos fisiológicos que incluyen el metabolismo lipídico, las respuestas inmunes, la adaptación al frío y cumplen un papel en ciertas condiciones patológicas tales como la carcinogénesis y enfermedades cardiovasculares (Gill I y Valivety R, 1994; Clarke SD, 2001; Baillie RA et al, 1996).

Función como precursores de metabolitos. Los PUFAs son precursores de metabolitos que regulan funciones biológicas críticas: los eicosanoides, las prostaglandinas, las prostaciclina, los hidroxiácidos y los tromboxanos. Todos ellos poseen acciones muy importantes y heterogéneas que condicionan el funcionamiento de los órganos y los receptores celulares, influenciando la actividad del músculo liso, la agregación plaquetaria, la permeabilidad y la contractilidad vascular, la inflamación, el sistema inmunitario, la modulación de la actividad enzimática y la transmisión de los

Introducción

impulsos nerviosos. (Gill I y Valivety R, 1994; Suchner U y Senftleben U, 1994).

1.6. Ácido docosahexaenoico (DHA).

1.6.1. Generalidades.

El ácido docosahexaenoico es el ácido graso de cadena más larga y el más insaturado que se encuentra en los sistemas biológicos. A través de diversos estudios, este ácido graso ha sido relacionado con una enorme variedad de patologías como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la artritis reumatoide, el asma, el lupus eritematosos sistémico, algunas nefropatías, enfermedades respiratorias, las dermatitis, la psoriasis, la fibrosis quística, la esquizofrenia, la depresión, algunas enfermedades neurodegenerativas, la esclerosis múltiple e incluso la migraña (Morin C et al, 2010; Gleissman H et al, 2010; Simopulos AP, 2002, Cardoso HD et al, 2012; Weise C et al, 2011; Nozue T et al, 2012; Shinto L et al, 2011; Pinazo-Durán MD y Boscá-Gomar L, 2012; Elkan AC et al, 2012; Bazan NG et al, 2011).

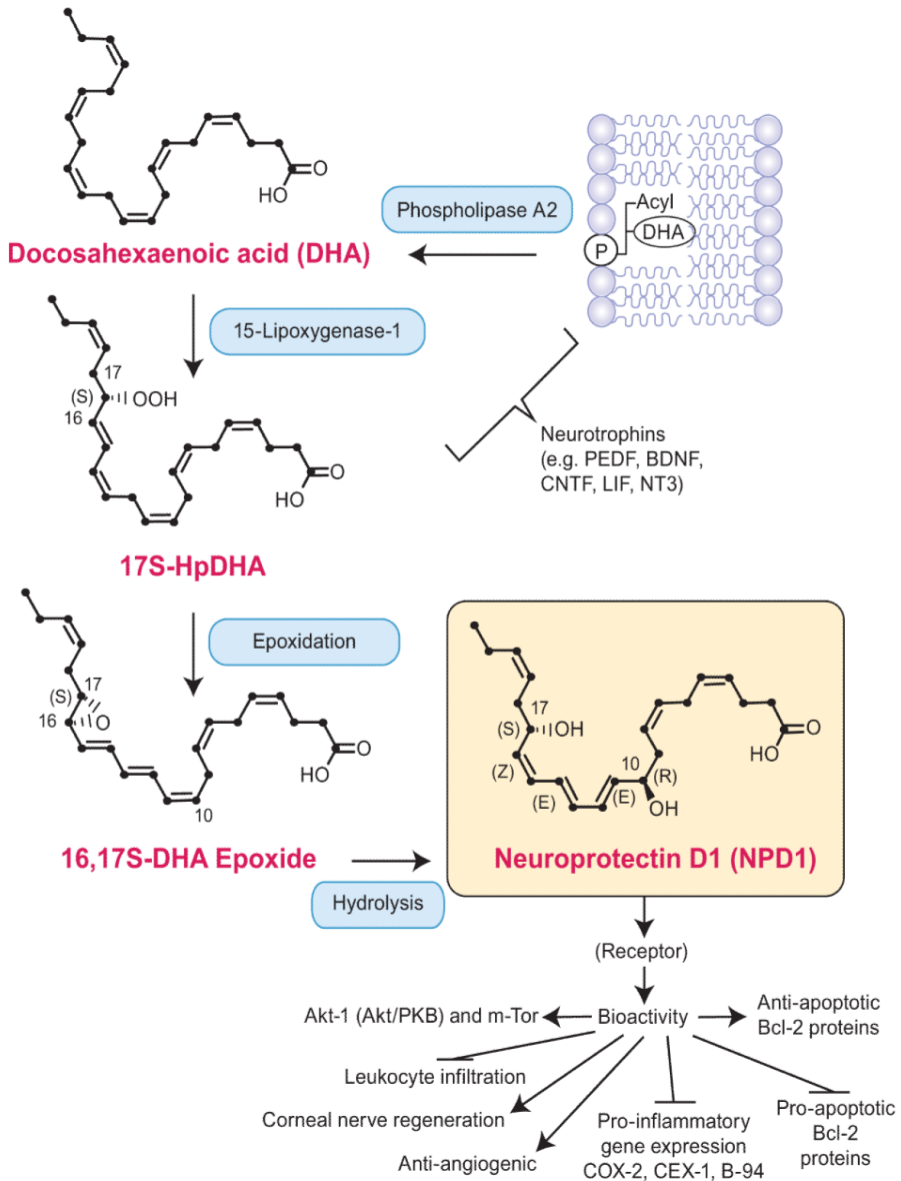


Figura 12: Metabolismo del DHA con producción de NPD1, su metabolito más importante. Una molécula de DH es liberada por la acción de la fosfolipasa A2 desde un fosfolípido de membrana. Este DHA libre es oxidado e hidrolizado y finalmente se genera una molécula de NPD1 que se unirá a su receptor el EPR. (Imagen extraída de Bazan NG, 2007)

Introducción

Cabe destacar la importancia del DHA en el correcto desarrollo neurológico y visual (Pinazo-Durán MD y Boscá-Gomar L, 2012), ya que este AG se encuentra en una gran concentración casi exclusivamente en el cerebro, especialmente las membranas sinápticas, y en la retina, especialmente en los fotorreceptores. El DHA es precursor de derivados bioactivos, los docosanoideos que incluyen la neuroprotectina D1 (NPD1), las maresinas, los neuroprostanos y otros derivados de 22-C. De todos ellos la NPD1 es el más importante, induce procesos homeostáticos en respuesta a daños celulares. Específicamente regula las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y Bcl-xL, inhibiendo las proteínas proapoptóticas Bax y Bad ante estados de aumento del estrés oxidativo (Pinazo-Durán MD et al, 2012).

1.6.2. DHA en la retina: distribución y funciones.

El medio lipídico de la membrana de los segmentos externos de fotorreceptores en el que la rodopsina y otras proteínas desempeñan sus funciones está determinada principalmente por fosfolípidos ricos en DHA y en otros ácidos grasos omega-3 de más

de 22 carbonos. Por lo tanto, una característica única de los segmentos externos de los fotorreceptores es la alta concentración de ácidos grasos omega-3. (SanGiovani JP et Chew Y, 2005; Bazan NG et al, 1992).

En esencia, todos están esterificados en fosfolípidos de membrana en la posición sn-2. En algunos fosfolípidos, existen dos ácidos grasos omega-3 esterificados, tanto en la posición sn-1 como en la sn-2 (Aveldano MJ y Bazan NG, 1973). Estos resultados sumados a la identificación de di-docosahexaenoil diglicéridos en la retina de los anfibios (Aveldano MJ y Bazan NG, 1973) y el descubrimiento de que el DHA de la retina está muy enriquecido en ácido fosfatídico a diferencia de lo que ocurre en el cerebro, sugieren que la composición, el metabolismo y la función del DHA en los fosfolípidos de membrana son importantes en la organización y función de los fotorreceptores.

El DHA llega a los fotorreceptores a través del EPR y la matriz interfotorreceptor que lo toma de la coriocapilar. Esto fue demostrado en diversos estudios con modelos animales en los que

Introducción

tras la administración sistémica de DHA con radio-marcaje, éste pasa por el hígado en aproximadamente 2 h, y llega a la retina 12-14 horas después de la administración (Bazan NG et al, 1991; Scott BL y Bazan NG, 1989). El DHA se distribuye de forma heterogénea entre el EPR (altamente concentrado) y en la retina neural (más concentrado en la capa de células ganglionares) (Gordon WC et al, 1992; Gordon WC y Bazan NG, 1993). Esto sugiere que el EPR regula la captación de DHA a partir de plasma y su liberación a la matriz interfotorreceptor. Una vez en el EPR, el DHA se desvía en un almacenamiento temporal como componente de triglicéridos formando parte de las membranas celulares o es dirigido hacia los segmentos internos de los fotorreceptores. Siguiendo la distribución del DHA marcado se observó que el DHA aparece en un principio y de forma gradual en la porción mioide los segmentos internos de los fotorreceptores, posteriormente se produce una rápida redistribución a las terminales sinápticas y a la región elipsoide de los segmentos internos de los fotorreceptores (Rodríguez de Turco ED et al, 1994). Por último, el DHA pasa a los formar parte de los discos que contienen los

pigmentos visuales en los segmentos externos de los conos y bastones tras ser activado por la adición de coenzima A y luego esterificado en los fosfolípidos de membrana.

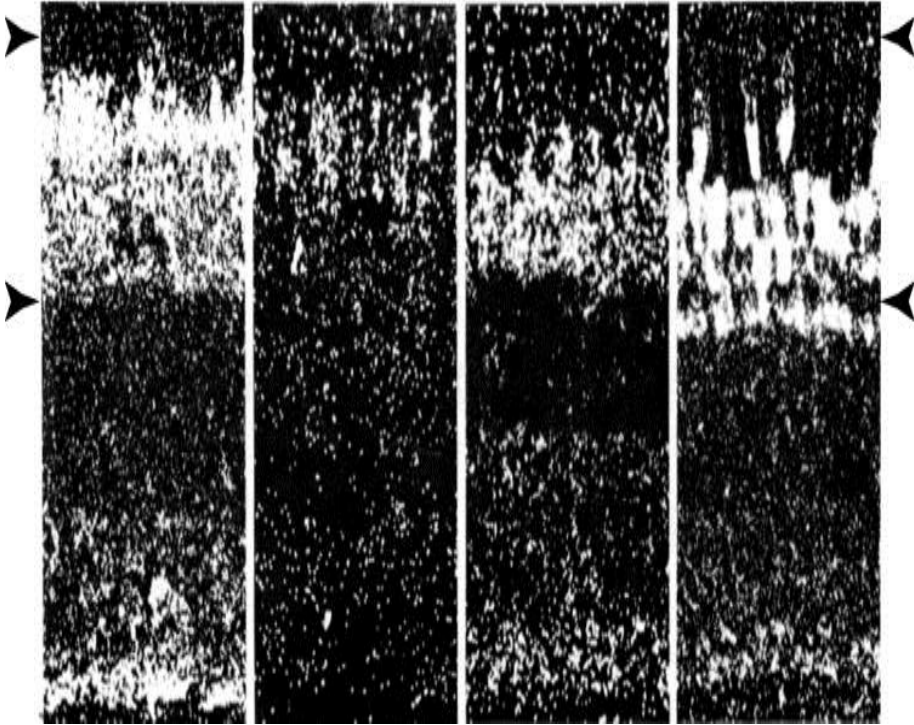


Figura 13: Imágenes de inmunofluorescencia sobre corte transversal histológico de retinas de izquierda a derecha: humana, de mono, de conejo y de rana donde se muestra las distribución de DHA tras incubación 4 horas in vitro con DHA radio-marcado. Obsérvese la similitud de distribución de este ácido graso en las retinas de las distintas especies especialmente la retina humana y la del conejo (Imagen extraída de Bazan NG, 2007)

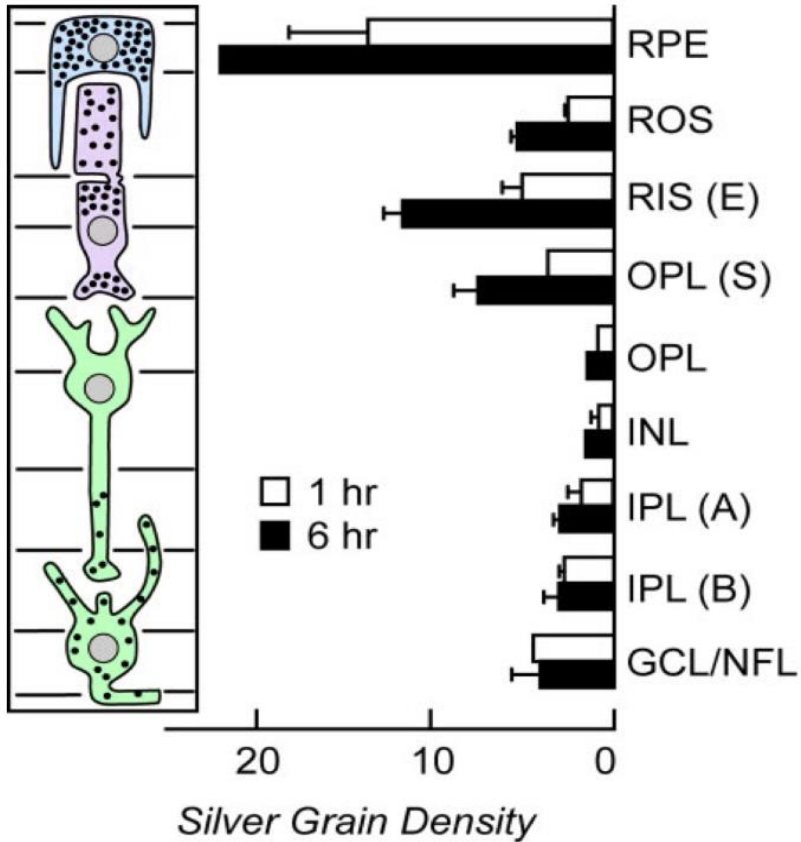


Figura 14: Esquema que muestra la distribución del DHA en las distintas capas de la retina. RPE (epitelio pigmentario de la retina); ROS (segmentos externos de los bastones); RIS (segmentos internos de los bastones); OPL (Capa plexiforme externa); INL (Capa nuclear interna); IPL (Capa plexiforme interna); GCL/NFL (Capa de células ganglionares y capa de fibras nerviosas). (Imagen extraída de Bazan NG, 2007)

Progresivamente se van añadiendo más discos en la región basal del segmento externo, por lo que los discos previamente formados son desplazados externamente de forma progresiva y finalmente los discos llegan a la porción más apical. Cuando esto

sucede, se desprenden a la matriz interfotorreceptor y son fagocitados por el EPR donde se degradan, apareciendo fagosomas altamente concentrados en DHA. Estos fagosomas reciclan el DHA de nuevo hacia los fotorreceptores y una pequeña proporción queda almacenada en las membranas celulares del EPR (Gordon WC et al, 1992; Rodríguez de Turco EB et al, 1994).

1.6.3. Respuesta ante el estrés oxidativo.

Como se comentó anteriormente, los fotorreceptores y el EPR están constantemente sometidos a diversos factores nocivos, así como factores intrínsecos que son potencialmente disruptores de la homeostasis: alta concentración de oxígeno, intensa exposición a la luz, alta concentración de AG en las membranas celulares.

En condiciones normales, el DHA es retenido y protegido de la peroxidación secundaria a estos factores nocivos. Sin embargo, en modelos experimentales de degeneración de la retina, cuando la peroxidación de lípidos tiene lugar, se producen alteraciones de la función de los fotorreceptores, daño y muerte celular (Organiciak DT et al, 1996).

Introducción

Por otra parte, en las drusas (depósitos de material de desecho que se acumulan entre las células del EPR y la membrana de Bruch) de pacientes con AMD, se han encontrado productos de oxidación del DHA (Crabb JW et al, 2002).

En varias formas de retinosis pigmentaria (RP) y en el síndrome de Usher, una disminución del contenido de DHA en la sangre ha sido reportado (McColl AJ y Converse CA, 1995; Maude MB et al, 1998; Bazan NG et al, 1986). Una explicación posible de estos estudios es que la disminución del suministro de DHA en la retina puede alterar la función de fotorreceptores por la disminución de la disponibilidad de DHA en los mismos. Sin embargo, la relación entre la disminución de DHA en la sangre y el inicio y progresión de la enfermedad quedan por establecer aún. En estudios experimentales en modelo de rata con mutaciones en el gen de la rodopsina, homólogas a la RP en humanos muestran menores cantidades de DHA en los fotorreceptores, (Anderson RE et al, 2002).

Además, el DHA ha demostrado promover la supervivencia e inhibir los fenómenos apoptóticos de los receptores (Rotstein NP,

1997). Varios estudios han demostrado las propiedades neuroprotectoras del DHA (SanGiovani JP y Chew EY, 2005; Bazan NG et al, 1985; Rotstein NP, 1996 et al).

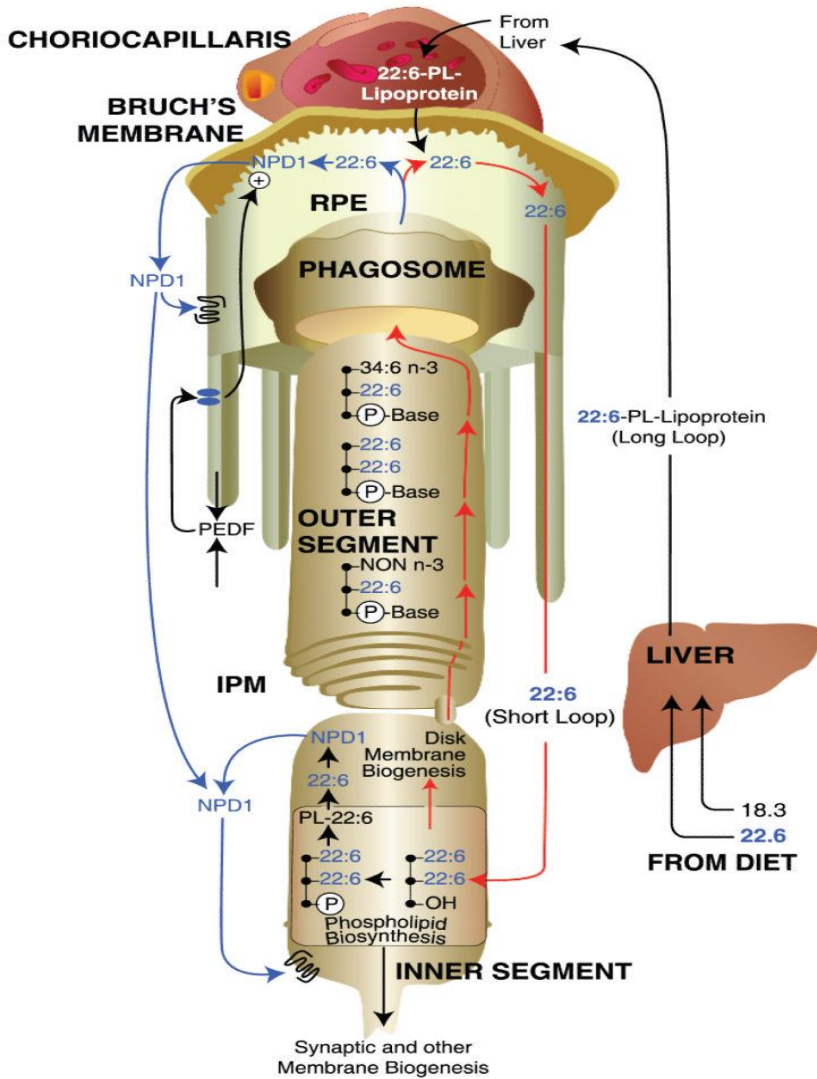


Figura 15: Esquema del metabolismo del DHA desde su ingesta y paso al torrente circulatorio hasta su incorporación a los fotorreceptores, su reciclaje en el EPR y

la producción de sus derivados. EL DHA es obtenido de la dieta, en el hígado es incorporado a lipoproteínas que lo transportan hacia la coriocapilar. De la circulación coroidea pasa al EPR, donde es enviado a los segmentos internos de los fotorreceptores. EL EPR además, fagocita los discos de los fotorreceptores, reciclando los pigmentos maculares que allí se encuentran y el DHA que es devuelto de nuevo a los segmentos internos de los fotorreceptores. (Imagen extraída de Bazan NG, 2007)

Las células RPE responden al estrés oxidativo mediante la activación de la síntesis de un importante mediador neuroprotector endógeno, la NPD1, que como se comentó anteriormente es un derivado metabólico del DHA y que debe su nombre a la potente capacidad para inactivar la señalización pro-apoptótica y pro-inflamatoria (SanGiovani JP y Chew EY, 2005; Bazan NG et al, 1985).

1.7. Suplementación dietética con AG.

Tanto los ácidos graso omega 3 como omega 6 son esenciales y requeridos por el organismos en unas cantidades que rara vez se alcanzan con las actuales dietas en los países industrializados. Esta deficiencias nutricionales unidas a la dificultad en la valoración individual del estilo de dieta que realiza cada paciente justifican la prescripción médica de una suplementación dietética con ácidos grasos esenciales poliinsaturados en diversas situaciones. Ello garantiza su aporte mínimo y evita las situaciones carenciales,

asegurando su necesaria presencia en las membranas de las células, que mejoran su metabolismo y funcionalidad. También afecta positivamente a las células de los epitelios del organismo, incluidos los de revestimiento de la superficie ocular, de la córnea, la mucosa conjuntival, y los anejos; y a los de tipo neurosensitivo de la retina y el EPR (Pinazo-Durán MD et al , 2008; Pinazo-Durán y Boscá-Gómez L, 2012).

Existen numerosos trabajos publicados acerca de la influencia beneficiosa que ejercen los ácidos grasos esenciales ω_3 y ω_6 en las diversas áreas de la economía. Las primeras nociones de su influencia en la salud fueron demostradas mediante estudios epidemiológicos en los esquimales Inuit de Groenlandia (Bang HO y , 1976, Bang HO et al, 1972) que dieron lugar a la hipótesis de que la grasa y los aceites de animales marinos (Ackman RG, 1989), ricos en ácidos grasos omega 3, podían prevenir el desarrollo de la aterosclerosis (Camargo A et al, 2012; Penumetchat M et al, 2012; Bogl LH et al, 2011).

Introducción

A raíz de estas primeras hipótesis, los investigadores han ido ampliando el conocimiento sobre los potenciales beneficios de los ácidos grasos esenciales para la salud en distintos campos de la medicina. Hoy sabemos que la mayor proporción de ácidos grasos omega 3 en la dieta influye de manera significativa en el perfil lipídico plasmático y en la aterogénesis cardiovascular (Salter AM, 2011); y también sabemos que su mayor consumo se traduce en una incorporación mayor en los fosfolípidos de las membranas celulares de los eritrocitos, las plaquetas, los fotorreceptores, las neuronas y el esperma, y que de ello se derivan cambios en la flexibilidad de las membranas celulares y de las organelas y en el funcionalismo celular (Bazan NG et al, 2002).

1.7.1. AG en la superficie ocular .

La película lipídica de la lágrima se compone de dos fases: una fase polar delgada adyacente a la fase acuosa-mucínica y otra más gruesa no polar que se ubica entre la fase polar y el aire atmosférico. (McCulley JP y Shine W, 1997).

La composición de la secreción lipídica en pacientes afectados de blefaritis crónica y pacientes sanos presenta diferencias bioquímicas en la distribución de los ésteres que muestran el importante papel que deben jugar en la enfermedad, (Osgood JK et al, 1989).

Además existen numerosos estudios que evalúan la efectividad de la suplementación con AG en el tratamiento de las enfermedades oculares que secundariamente alteran la superficie ocular, ya que la frecuente falta de respuesta a las lágrimas artificiales en el tratamiento del ojo seco, se debe a que solamente un 11,1% de los pacientes con ojo seco presenta un déficit en el componente acuoso. Por el contrario, un 42,3% presenta déficits combinados (componente acuoso y componente lipídico) de los diferentes componentes de la misma, y hasta en el 76,7% de los pacientes existen carencias en el componente lipídico, beneficiándose por tanto de estos tratamientos como suplementación y ayuda al tratamiento clásico (Heiligenhaus A et al, 1994; Verbey NL y van Haeringen NJ, 1990; Horrobin DF y Campbell A, 1980; Bilgihan A et al, 2001).

Introducción

1.7.2. AG en el glaucoma.

Se ha demostrado la eficacia de la administración del suplemento dietético con DHA, vitamina E y complejo vitamínico B como un soporte terapéutico positivo para prevenir o retrasar el curso de la enfermedad, (Cellini M et al, 1998)

1.7.3. AG en la retina, los fotorreceptores y las neuronas.

La suplementación dietética de ácidos grasos ω_3 sobre las especies moleculares de fosfolípidos en la retina y el cerebro de simios, ejercen profundos efectos cualitativos y cuantitativos sobre éstos (Lin DS et al, 1994). Del mismo modo, dietas exentas en DHA a estos animales, producen una disminución en los niveles de DHA en la retina que se asocia a alteraciones funcionales de la misma, evidenciadas mediante electroretinografía (Jeffrey BG et al, 2001).

Contrariamente a lo que podría esperarse, la suplementación dietética con DHA no incrementa la peroxidación de las membranas de los segmentos externos de los bastones in vivo y bajo condiciones de iluminación normales (Wang JY y Saito M, 2001). Se comprobaron estos hallazgos estudiando el posible incremento en la peroxidación

lipídica tras la suplementación con ácidos grasos ω 3, mediante la determinación de la excreción urinaria de F2-isoprostanos, que presentan reducciones de entre el 20 y el 27%, lo que según los autores pone de manifiesto que los ácidos grasos ω 3 reducen in vivo el estrés oxidativo en el humano (Mori TA et al, 2000).

A partir del análisis de un buen número de estudios clínicos randomizados que han estudiado los efectos funcionales de los ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados en la dieta maternal e infantil, también se aconseja incluir DHA y ácido araquidónico en las fórmulas de neonatos prematuros y a término y se plantean además la conveniencia de incluirlos en la dieta de las mujeres embarazadas y de las mujeres lactantes (Koletzko B et al, 2001).

Mediante monitorización electrorretinográfica, se ha estudiado el papel protector de la administración de DHA en la lesión isquémica transitoria de la retina, provocando aumentos y disminuciones en la PIO. Las amplitudes de las ondas en la post-isquemia respecto a las obtenidas antes de la isquemia fueron mayores en el grupo DHA que en el grupo control, lo cual demuestra

Introducción

la protección efectiva de la retina en la isquemia transitoria (Miyachi O et al, 2001)

Otros autores han confirmado el papel preventivo del DHA frente a la lesión isquémica inducida en la retina de los mamíferos, mostrando actividad protectora de la retina sensorial frente a la lesión celular de la isquemia-reperfusión, no sólo inhibiendo la formación de radicales hidroxilo sino también la respuesta inflamatoria (Murayama K et al,2002)

1.7.4. AG en la salud macular.

Actualmente se sugiere que la eliminación del DHA en la dieta produce defectos en la estructura y funcionamiento de los conos. Hay evidencias de que el aceite de pescado rico en DHA puede ser útil como protector en la DMAE (AREDS report no. 8, 2001). Existen otras enfermedades genéticas asociadas a la degeneración macular como la enfermedad de Stargardt, donde se ha hallado un trastorno en una proteína de membrana llamada ABC responsable de transportar una amplia variedad de lípidos, incluido el DHA en los peroxisomas, citoplasma y mitocondria (Hetteema EH et al, 1996),

pudiendo de esta manera explicarse por qué no resultó eficaz la ingesta oral de DHA en la enfermedad de Stargardt. Esta misma proteína ABC responsable del transporte de una amplia variedad de lípidos procedentes de la beta-oxidación en los peroxisomas se ha hallado alterada también en la Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X, que sufre Retinosis Pigmentaria (Hettema EH y Tabak HF, 2000). En las enfermedades asociadas a defectos en los peroxisomas, como la adrenoleucodistrofia y la enfermedad de Stargardt, a diferencia del síndrome de Zellweger donde la ingesta de DHA corrige el déficit y mejora clínicamente, parece que el trastorno del DHA podría estar asociado con el transporte de proteínas, por lo que la ingesta oral de DHA no sería útil en estos casos.

Ha sido demostrado que la prevalencia de la maculopatía asociada a la edad (MAE) se asocia al tipo de grasa ingerida en la dieta, hallándose inversamente relacionada con la mayor frecuencia de consumo de pescado y que la mayor ingesta de colesterol se relacionaba con un mayor riesgo de padecer MAE (Smith W et al,

2000). Del mismo modo, el riesgo de padecer degeneración macular asociada con la edad (DMAE) se relaciona inversamente con el consumo de DHA, y una dieta rica en pescado puede

1.8. Modelo experimental y estudios de toxicidad.

1.8.1. Marco legal

El investigador y el cuidador deben asegurar un adecuado bienestar a los animales de experimentación según las normativas vigentes para cada especie animal en cuanto a ciclos de luz, temperatura, humedad, ruido, limpieza, socialización, entre otros aspectos. Estas disposiciones se encuentran especificadas en diferentes sectores legislativos como, por ejemplo, normas básicas que deben cumplir los estabularios, Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos disponible en el BOE nº 252, de 21 de octubre, p. 34367, que traspone y desarrolla la Directiva 86/609/CEE y la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de

los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

En cuanto a la reglamentación, hay cuatro puntos básicos:

a) régimen de autorización, esto es, las experiencias científicas o experimentales con animales no pueden ser practicadas más que por personas autorizadas;

b) condiciones adecuadas de tenencia y mantenimiento de los animales, y control de procedencia;

c) procedimientos experimentales aprobados por un comité ético de experimentación animal, y

d) control de los experimentos por parte del comité así como por una unidad de garantía de calidad del centro. De estos puntos se deduce que la competencia se encuentra íntimamente ligada con la responsabilidad.

Por lo que respecta a la limitaciones, las experiencias con animales sólo se deben realizar cuando los estudios pretendan

Introducción

obtener un resultado científico hasta ahora no confirmado, o bien si ayudan a esclarecer problemas sin solución actual.

1.8.2. Estudios de toxicidad retiniana en modelo experimental.

Las terapias intravítreas se han convertido en una práctica muy frecuente oftalmología en el seguimiento y tratamiento de una gran diversidad de patologías retinianas –endofalmitis, edema macular diabético, DMAE, uveítis posteriores, entre otros-(Bourges JL et al, 2003; Ziche M et al, 2004; Bhatnagar P et al, 2007; Friedman AH et al, 1983). La elección de esta vía de administración del fármaco conlleva diversas ventajas frente a las terapias sistémicas (España E y Díaz-Llopis M, 1996):

- Ausencia de efectos secundarios sistémicos.
- Ausencia de interacciones medicamentosas con otros tratamientos sistémicos.
- Tratamiento ambulatorio frente a hospitalización en algunos casos de tratamiento sistémico.
- Mayores niveles intraoculares del fármaco.

Previamente a la incorporación de estas terapias a la clínica habitual se realizaron los consiguientes estudios preclínicos de toxicidad en modelos animales (Gao H et al, 2006; Albini TA et al, 2007; Pereira de Almeida Manzano RP et al, 2009; Ginsanti F et al, 2008; Fiore T et al, 2010). De hecho, uno de los requisitos científicos, éticos y reglamentarios antes de probar cualquier medicamento en humanos es evaluar su seguridad en animales (Declaración de Helsinki; NC3Rs, 2009). Estas pruebas tienen como principal objetivo evaluar la toxicidad potencial asociada con el medicamento estudiado. Dado que el objetivo de los estudios es la identificación de los posibles efectos tóxicos en los seres humanos, algunos de los animales utilizados pueden sufrir efectos adversos, sin embargo, un cuidadoso diseño del estudio es requerido para reducir el impacto sobre los animales sin comprometer los objetivos científicos o de seguridad humana y de hecho puede mejorar la calidad de los datos científicos (Penha FM et al, 2010).

Los estudios de toxicidad preclínica en animales pueden dividirse según el objetivo principal y la duración del estudio en:

Introducción

- Estudios preliminares de corta duración regulatorios o no regulatorios que se requieren para iniciar la primera prueba en humanos.
- Estudios de larga duración para apoyar la Fase II de ensayos clínicos en humanos.
- Estudios de más larga duración para apoyar la Fase III de ensayos clínicos en humanos previos al registro del nuevo fármaco.

Los distintos tipos de estudios toxicológicos se realizan como parte de un programa escalonado. Los primeros estudios realizados se conoce como estudios piloto, estudios preliminares, estudios de ensayo o de diferentes dosis y se utilizan para seleccionar las dosis para posteriores estudios reglamentarios de hasta un mes. Los estudios de un mes a su vez se utiliza para informar a la dosis para estudios de regulación a largo plazo (por ejemplo, tres y / o seis meses).

Para iniciar un estudio de toxicidad pre-clínico debemos definir previamente unos conceptos sobre la concentración del fármaco de estudio y la dosis empleada. En canto a la concentración del producto, tendremos en cuenta diversos conceptos:

- **Concentración efectiva:** Proporción de una sustancia en un medio que causa un determinado efecto.
- **Concentración letal:** Proporción de una sustancia tóxica en un medio, que causa la muerte después de un cierto período de exposición.
- **Concentración Letal Mínima:** mínima proporción de una sustancia en un medio que produce la muerte.
- **Concentración Tóxica Mínima:** mínima proporción de una sustancia en un medio que produce un efecto tóxico.

Por otra parte, la elección cuidadosa de las dosis utilizadas en los estudios preclínicos es muy importante (NC3Rs, 2009), minimizando el impacto sobre el animal sin dejar de lograr el

Introducción

objetivo científico del estudio. En general, esto se puede lograr mediante el uso de tres grupos de animales que recibieron el producto de ensayo, a dosis baja, media y alta, además de un grupo de control que recibe el vehículo solo.

Hay cinco criterios generales para definir la dosis alta en un estudio de toxicología:

Dosis máxima tolerada: es el límite alto de dosis a partir de la cual el efecto del fármaco se acompaña de efectos secundarios.

Dosis límite: la dosis más alta que se debe utilizar en la ausencia de una dosis máxima tolerable demostrable.

Toxicocinética y la saturación de la exposición: objetivo principal es describir la exposición sistémica o local alcanzada en los animales y su relación con la dosis, el sexo, la especie y el curso de tiempo del estudio de toxicidad. Estos estudios se realizan en muestras de sangre, orina, humor acuoso, etc y

refuerzan los estudios de toxicidad ya que demuestran la exposición al producto en estudio.

Dosis máxima posible: en algunos casos la alta dosis está limitada por lo que es técnicamente factible en base a la máxima concentración posible del producto de ensayo en la formulación y el volumen de dosis que se puede administrar durante la duración del estudio.

Dosis que proporcionan un margen de 50-veces de la exposición: más aceptable como la dosis máxima para los estudios de toxicidad aguda y de dosis repetidas en cualquier especie .

Una vez administrado el fármaco debemos evaluar parámetros de seguridad de la dosis máxima. El parámetro primario usado en la selección de la dosis es la **tolerabilidad** del producto de ensayo en animales que se puede determinar mediante observaciones como signos clínicos, las reducciones en el peso corporal o una disminución en el consumo de alimentos. Otros parámetros clave tales son la

exposición (medida por ejemplo como la concentración del producto de ensayo en el humor acuoso o vítreo) y la **histopatología**. Dada la naturaleza peculiar de nuestro producto y nuestra especialidad, administración intravítrea, se utilizan otros parámetros funcionales como el ERG.

1.9. Justificación del estudio.

Tras la exhaustiva revisión bibliográfica en MedLine/PubMed realizada para el diseño, elaboración y redacción de este trabajo de tesis doctoral no se ha encontrado ninguna referencia o trabajo previo que haya estudiado la seguridad de la administración in vivo de DHA puro por vía intravítrea en dosis única.

Este es por tanto, el primer trabajo de evaluación preclínica de la toxicidad retiniana del ácido graso DHA puro administrado por vía intravítrea en dosis única en modelo animal de conejo, estudiado mediante estudio retiniano macroscópico, histológico y funcional.

El estudio preclínico con animales de experimentación es necesario en el caso de fármacos no probados con anterioridad en humanos (Declaración de Helsinki). Es el caso del agente objeto de

este estudio, el DHA, cuya suplementación por vía oral ha sido analizada “in extenso”, pero del cual no se conocen estudios previos sobre la seguridad de la administración intravítrea.

Además los modelos animales permiten un control más estricto de diversas variables (ambientales, dietéticas y genéticas) que pueden actuar como factores confusión en los datos obtenidos en los estudios de suplementación en humanos.

La elección del conejo como modelo experimental obedece a razones anatómicas y funcionales por su semejanza al humano respecto a otras especies utilizadas en el laboratorio; siendo la estructura celular de la retina del conejo muy similar a la del humano. El principal motivo anatómico de selección de esta especie fue sido el tamaño del globo ocular, que presenta un buen abordaje vía *pars plana* lo que es esencial para inocular una solución en la cavidad vítrea que pueda difundir de forma correcta y observar los efectos en los tejidos oculares. Además, la falta de pigmento de esta especie, permite visualizar fácilmente la sustancia inyectada a través de la córnea. De hecho, el conejo ha sido utilizado en numerosas

Introducción

ocasiones como modelo experimental de toxicidad retiniana de fármacos por vía oral o intravítrea en oftalmología (Fiore t et al, 2010; Crafoord S et al, 2011; Zayit-Soudry S et al, 2010) por lo que estimamos que era el animal idóneo para el diseño de nuestro estudio.

2. Objetivos e Hipótesis de trabajo.

2.1. Objetivos del estudio

El objetivo primordial de este experimento fue determinar si la inyección intravítrea en dosis única de soluciones decrecientes de DHA inducía toxicidad en la retina de los conejos, tanto desde el punto de vista estructural (macroscópico y microscópico), como clínico (patología oftalmológica) y funcional (electroretinográfico).

Los objetivos secundarios fueron:

1. Ensayar concentraciones decrecientes de una solución de DHA puro para administración intraocular mediante inyección intravítrea única y estudiar los efectos de las mismas sobre la integridad de las estructuras del globo ocular del conejo, desde el punto de vista macroscópico.
2. Identificar posibles signos patológicos en el globo ocular del conejo mediante examen oftalmológico de los segmentos

Objetivos e hipótesis de trabajo

anterior, y posterior, tras las inyecciones intravítreas de las soluciones decrecientes de DHA puro.

3. Determinar la concentración tóxica para la retina de las soluciones decrecientes de DHA puro capaces de inducir cambios microscópicos mediante estudios histológicos de las diferentes capas de la retina, a nivel celular y tisular.
4. Determinar la concentración tóxica del producto que induce alteraciones funcionales en la retina mediante ensayos con diversas concentraciones decrecientes del producto y realizando pruebas electrofisiológicas antes y después de la administración del producto.
5. Analizar las concentraciones de DHA en el humor acuoso y humor vítreo del conejo tras la inyección intravítrea de las soluciones decrecientes de DHA puro.
6. Definir la dosis máxima tolerada de DHA puro para la administración en dosis única, la cual podría ser probada en nuevos estudios con inyección intravítrea única de DHA con un periodo de seguimiento mayor.

7. Establecer un rango de dosis óptimo de DHA puro para la administración en dosis única por inyección intravítrea en el que no se observen efectos adversos y que podrían servir para ser inyectada en nuevos estudios de efectividad de dosis en relación a la variable tiempo (mayor duración de la exposición al agente farmacológico).

2.2. Hipótesis de trabajo.

La retina es el tejido con mayor concentración de ácidos grasos esenciales de todo el organismo (Querques G et al, 2011; Simopoulos AP, 2009).

Los ácidos grasos esenciales α -linolénico (omega 3- ω 3) y linoleico (omega 6- ω 6) son considerados precursores de los principales ácidos grasos poliinsaturados (Bazan NG et al, 2011; Bazan NG et al, 1992). Así, el ácido linoleico (ω 6) da lugar al ácido γ -linolénico (GLA), precursor del ácido araquidónico. A partir del ácido α -linolénico (ω 3) se sintetiza el ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) (Calder PC, 2001). El EPA es precursor

Objetivos e hipótesis de trabajo

de las prostaglandinas de la serie 3 (antiinflamatorias), y exclusivamente el DHA forma parte activa de las principales membranas del sistema nervioso y la retina (Querques G et al, 2011). Como consecuencia del control enzimático y de la β -oxidación, la ingesta de EPA no aumenta significativamente el nivel de DHA, pero sí ocurre al contrario (Simopoulos AP , 2002).

Otro aspecto dietético importante es que si estimuláramos (o suplementáramos) una dieta demasiado rica en ω 6 se obstaculizaría o paralizaría la síntesis de ω 3, fenómeno conocido como biomagnificación, de enorme relevancia para la nutrición y la salud (Strandvik B, 2011; Gómez-Candela C et al, 2011). Por ejemplo, en la dieta japonesa la relación ω -6/ ω -3 es 4:1 con una concentración 5 veces mayor de DHA. Por el contrario, en la dieta occidental esta relación es aproximadamente de 20:1 y por tanto con unas concentraciones de DHA menores.

Cabe destacar que la dosis recomendada por la OMS de consumo de DHA es de 300 mg/día, sin embargo, en las dietas

occidentales representa sólo la tercera parte. La única fuente útil para conseguir la absorción de DHA es la de algunos tipos de pescado azul, pero se necesita consumir grandes cantidades de producto para alcanzar las dosis recomendadas (Ackman RG 1989; Kinsella J, 1987; Bang HO, 1972; Bang HO, 1980).

Por otra parte, se han descrito recientemente diferentes mecanismos a nivel de las células nerviosas, de los vasos sanguíneos y de las células de la sangre por los cuales los ácidos grasos omega-3, y en concreto el DHA, tienen un efecto antiangiogénico, neuroprotector y antiinflamatorio a nivel microvascular. (Ibrahim A et al, 2011; Binion DG et al, 2008; Todoric J et al, 2006).

La gran biodisponibilidad de DHA en la retina, principalmente en las membranas de los fotorreceptores, nos lleva a pensar que la inyección intravítrea de una solución de DHA puro, en concentración que podemos suponer biocompatible, no debe inducir efectos tóxicos en las estructuras del segmento posterior ocular.

Objetivos e hipótesis de trabajo

Si obtuviéramos la evidencia científica de que la inyección intravítrea de DHA puro no es tóxica para la retina, podría utilizarse “per sé” o como coadyuvante y potenciador de otros agentes farmacológicos, en solución intravítrea para aumentar la concentración de DHA a nivel retiniano. Con este aumento podría mejorar el pronóstico de los pacientes afectados de enfermedades degenerativas de la retina con una base inflamatoria, angiogénica o apoptótica ya que ha quedado demostrado que la disminución de este ácido graso se asocia a diversas enfermedades oculares (McColl AJ y Converse CA, 1995; Maude MB et al, 1998; Bazan NG et al , 1986).

3. Metodología

El presente estudio se realizó tras la aprobación por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia (Documento adjunto en Anexo 1). Las manipulaciones de los animales fueron realizadas en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, bajo la supervisión de los veterinarios responsables de dicho centro y de acuerdo con las directrices para el uso de animales en investigación oftalmológica y visión de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO, Association for Research in Vision and Ophthalmology) y la normativa vigente del Consejo de Europa y de España (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos disponible en el BOE nº 252, de 21 de octubre, p. 34367, que traspone y desarrolla la Directiva 86/609/CEE y la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio).

Metodología

Los animales se mantuvieron en ambiente tranquilo con ciclo diario de luz-oscuridad. El control diario fue realizado por el personal responsable del animalario y por nuestra parte. La valoración del bienestar animal se realizó según los protocolos vigentes, haciendo especial énfasis en el control de los síntomas y signos de dolor. Las manifestaciones clínicas del dolor en los conejos son muy características pero pueden pasar inadvertidas si el dolor es de intensidad leve, se revisaron los criterios indicativos de analgesia, resumidos en la tabla 3 (Mayer J et al, 2007; Universidad de Zaragoza, 2007).

Al inicio del estudio se realizó un examen general de los conejos con medida del peso. Se completó un examen oftalmológico basal incluyendo la exploración con lámpara de hendidura portátil y la visualización del fondo de ojo mediante oftalmoscopio directo. Como criterios de exclusión del estudio se incluyeron la presencia de opacidades en la córnea o el cristalino y la presencia de cualquier lesión retiniana que pudiese influir posteriormente en los datos del estudio.

SIGNOS Y SÍNTOMAS INDICATIVOS DE DOLOR EN EL CONEJO	
Signos generales:	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad reducida, permanece inmóvil o se desplaza lentamente o con esfuerzo, cojera • Deshidratación: pelo sin brillo, piel sin elasticidad, ojos hundidos • Depresión, letargia, apatía • Acicalamiento anormal y empeoramiento del pelaje • Cambios en la ingestión de agua y alimento: es reducida, se prolonga en el tiempo o incluso, la comida se cae de la boca • Estrabismo, secreciones oculares, ojos cerrados, palidez (albinos) • Posturas anormales: contracciones del abdomen con tensión de la pared muscular, arqueamiento al estar sentado, presión con la cabeza en la pared de la jaula • Autoprotección de la zona dolorosa, frotarse con la esquina de la jaula, tendencia a esconderse (cuando no lo suele hacer) o agresividad súbita inesperada • Pérdida del interés por lo que le rodea • Rechinar de dientes • Vocalización o rechinar de dientes cuando se mueve, defeca, orina o durante la manipulación • Patrón respiratorio modificado (incluso cambios sutiles) • Incapacidad para descansar o dormir o trastornos del sueño • Expresión facial de ansiedad: pupilas dilatadas, ausencia reflejo palpebral Salivación incrementada • Aislamiento del grupo
Dolor leve a moderado:	<p>Descarga ocular, protrusión de la membrana nictitante o fotofobia, constipación o diarrea, depresión, apoyo de la espalda en el fondo de la jaula, acicalamiento excesivo, ingesta reducida de agua y alimento, desinterés, agresividad o vocalización durante la manipulación, rechinar de dientes</p>
Dolor intenso o crónico:	<p>Rechinar de dientes, letargia, deshidratación, pérdida de peso, presencia de heces en la zona anal, pérdida de masa muscular en cuartos traseros, producción reducida de heces nocturnas, falta de respuesta a estímulos</p>
Signos clínicos que aconsejan analgesia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Apariencia anormal: ansiedad, depresión, inactivo, inquieto 2. Chillidos o quejidos 3. Rechinar de dientes 4. Inmovilidad tónica 5. Rechaza el agua y/o el alimento 6. Pérdida de peso

Tabla 3: Signos indicativos de dolor en el conejo.

3.1. Animales.

Dieciséis conejos albinos Nueva Zelanda (*Oryctolagus Cuniculis*) con un peso entre 2'6 y 3'1 kg se utilizaron para el presente estudio.

3.2. La inyección intravítrea.

Se prepararon diferentes concentraciones de DHA elaboradas en un laboratorio externo (Brudy Laboratorios, Barcelona, España) y preparadas como nanoemulsiones de DHA con solución salina como solución vehículo.

Los experimentos se realizaron en dos fases, una primera fase con inyección de DHA en altas concentraciones para definir la dosis máxima tolerada o en su defecto el límite de dosis, y una segunda fase con inyección de DHA con concentraciones corregidas mucho menores para definir el rango de dosis óptimo para utilización como dosis única de inyección intravítrea de DHA en futuros estudios.

Durante la FASE 1, los conejos 8 conejos utilizados se dividieron en 4 grupos: 3 grupos de dos animales cada uno (Grupos 2,3,4) para

recibir una concentración diferente decreciente de DHA en la inyección intravítrea, y un grupo control (Grupo 1) de dos conejos para recibir la solución vehículo (solución salina).

Durante la FASE 2, los 8 conejos utilizados fueron divididos del mismo modo que en la fase anterior en 4 grupos: 3 grupos de dos animales cada uno (Grupos 5,6,7) para recibir una concentración diferente decreciente de DHA en la inyección intravítrea, y un grupo de control (Grupo 8) de dos conejos para recibir la solución de vehículo (solución salina).

GRUPOS	CONCENTRACIÓN DHA
1	Control
2	2'5mg/50 μ L = 2500 μ g/50 μ L
3	5mg/50 μ L = 5000 μ g/50 μ L
4	10mg/50 μ L = 10000 μ g/50 μ L
5	Control
8	5 μ g/50 μ L
7	25 μ g/50 μ L
6	50 μ g/50 μ L

Tabla 4: Distribución por grupos de las concentraciones de DHA administradas por vía intravítrea.

Metodología

Cada una de las concentraciones preparadas se inyectó intravítreamente por vía pars plana a 2 mm del limbo esclero-corneal en el ojo derecho de dos animales según la técnica descrita a continuación (Peyman GA et al, 2009).

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de clorhidrato de ketamina (50mg/ml) y clorhidrato de xilazina (5mg/ml). Se aplicó anestesia tópica consistente en una mezcla comercial de clorhidrato de oxibuprocaina 4mg/ml y clorhidrato de tetracaína 1mg/ml (Colircusi anestésico Doble, laboratorios Alcon, Barcelona, España). Se procedió a esterilizar la región palpebral y orbitaria del conejo aplicando povidona yodada diluida al 50% con suero fisiológico antes y después de la inyección depositando varias gotas del mismo sobre la superficie ocular. Bajo microscopio quirúrgico (TOPCON S.A) y previa colocación de un blefaróstato, se inyectó la solución problema, por pars plana, de forma lenta e ininterrumpida, mediante una aguja de 32 Gauges unida a una jeringa de tuberculina a nivel del cuadrante ínfero-externo.

El **grupo 2** recibió 0'05 ml de DHA con una concentración de 2'5mg/50 μ L conteniendo 2'5 mg de DHA; el **grupo 3** recibió 0'05 ml de DHA con una concentración de 5mg/50 μ L conteniendo 5 mg de DHA; el **grupo 4** recibió 0,05 ml de DHA con una concentración de 10mg/50 μ L conteniendo 10 mg de DHA; el **6 grupo** recibió 0'05 ml una concentración de 5 μ g/50 μ L conteniendo 5 μ g de DHA; el **grupo 7** recibió 0'05 ml una concentración de 25 μ g/50 μ L conteniendo 5 μ g de DHA; el **grupo 8** recibió 0'05 ml de DHA con una concentración de 50 μ g/50 μ L conteniendo 50 μ g de DHA. El **grupo control** recibió 0,05 ml de solución de vehículo (solución salina) en el ojo derecho.

Como profilaxis antibiótica todos los conejos fueron tratados con la aplicación de pomada de antibiótico ciprofloxacino (Oftacilox pomada, laboratorios Alcon, Barcelona, España) cada 12 horas durante 5 días. Los conejos se mantuvieron durante 1 semana en un ambiente cíclico de 12 horas de luz y oscuridad.

Tras la inyección intravítrea se realizó un nuevo examen oftalmológico con la lámpara de hendidura y fondo de ojo indirectos

Metodología

para evaluar posibles cambios en la córnea, el cristalino, el humor vítreo, la retina y el nervio óptico.

3.3. Electrorretinograma.

Todos los ojos derechos (tratados) de los animales fueron evaluados mediante electroretinograma (ERG) antes de la inyección y 1 semana después de la inyección.

El estudio electrofisiológico fue realizado siguiendo el siguiente protocolo (Rosolen SG et al, 2005; Gao H et al, 2003; Fiore T et al, 2010). Después de inducir midriasis farmacológica con 1 gota de tropicamida (1%), los animales fueron adaptados a la oscuridad durante al menos 1 hora y, a continuación se realizó un ERG estándar de campo completo mediante un electrodo tipo lente contacto corneal ERG-jet (MicroComponents, UniversoPastique, Suiza). Los electrodos de referencia y de tierra eran de tipo aguja quirúrgicas inoxidable (Neuroline, Ambu Lab, Ballarup, Dinamarca), que se colocaron subcutáneamente en la frente (tierra) y a nivel preauricular (de referencia). Las señales ERG se registraron utilizando

el sistema portátil ERG EPH-01 (Ephiós ab, Rejmyre, Suecia). Se registró la respuesta escotópica tras adaptación a la oscuridad de 1 hora (respuesta bastones) y la respuesta fotópica (respuesta máxima, conos y bastones). La intensidad del flash fue de 1,7 cd-s/m² y el tiempo de adquisición fue de 200 ms para cada registro.

Las amplitudes de las ondas A y B medidas en miliVoltios (mV) se calcularon antes y 1 semana después de la inyección. Las variaciones en el ERG se consideraron significativas si las diferencias en amplitud (ondas A y B) fueron superiores al 30% entre los valores electrofisiológicos preinyección y los valores finales (Rosolen SG et al, 2005; Gao H et al, 2003).

Los datos fueron interpretados y se eliminaron las interferencias de forma automática mediante la utilización del software EPH-01 versión 1.2 (Ephiós ab, Rejmyre, Suecia) proporcionado con el aparato de electrorretinografía.

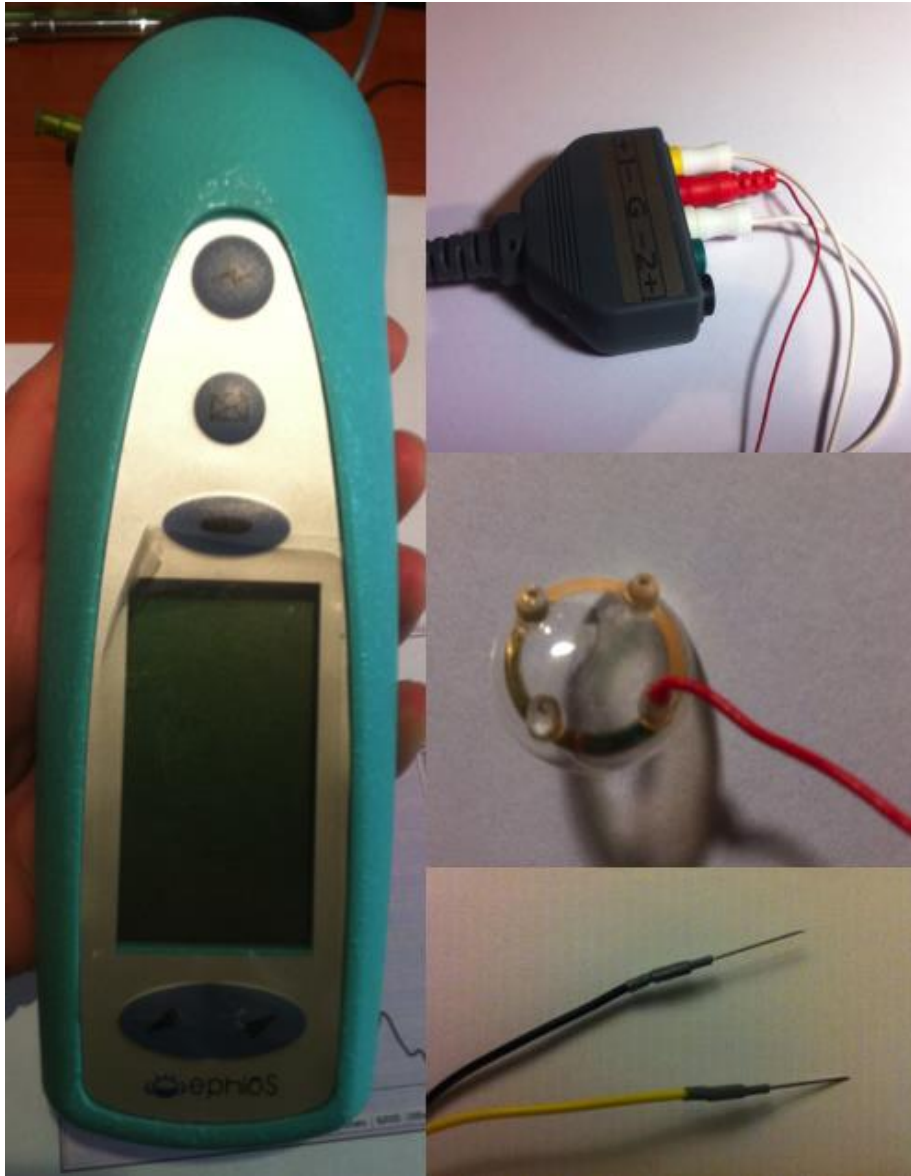


Figura 16: Dispositivo portátil de ERG y utensilios necesarios para la realización de las pruebas electrofisiológicas. En la imagen de la izquierda se observa el dispositivo portátil ERG EPH-01 (Ephiós ab, Rejmyre, Suecia). La imagen superior de la derecha muestra los distintos canales utilizados conectados a los distintos electrodos (tierra, referencia y electrodo de estudio). El electrodo de estudio era de tipo lente de contacto como se observa en la imagen central de la derecha, y los electrodos de referencia y tierra eran de tipo aguja quirúrgica con inyección subcutánea como se observa en la imagen inferior de la derecha.

3.4. Examen histológico

Una semana después de la inyección intravítrea, los conejos fueron eutanasiados con una sobredosis letal de pentobarbital intravenoso (100 mg/kg) bajo el control de la veterinaria responsable del estabulario de la Facultad de Medicina de Valencia. El proceso se realizó de acuerdo con la normativa vigente para la manipulación de animales experimentales y siguiendo el protocolo pautado y aprobado por el Comité de Ética de Bienestar Animal (Anexo 1).

Se instilaron gotas de la dilución Betadine® con suero fisiológico al 50% y mediante una aguja de 27G unida a una jeringuilla tipo insulina, se obtuvieron muestras de humor acuoso y de humor vítreo, que se depositaron en criotubos estériles que se identificaron convenientemente y se llevaron a congelación (-20°C) por 2 horas pasando luego a congelador de -80°C para su almacenamiento hasta el procesamiento protocolizado. Inmediatamente los ojos fueron enucleados. Se fijó la conjuntiva mediante una pinza de Barraquer y se realizaron incisiones en la

Metodología

misma con una tijera Wescott para separar el globo ocular, seccionando los músculos extraoculares y cortando a nivel posterior el nervio óptico (2-3 mm por detrás del ojo) para prolapsar el globo y enuclearlo (Pinazo-Durán MD et al, 2005; Pons-Vázquez S et al 2011). Se realizaron 3 lavados en solución salina tamponada con fosfato libre de proteínas (PBS) y a continuación se realizó una incisión en la esclerótica a unos 2 mm posterior al limbo para facilitar la posterior fijación en solución de formaldehído al 4% con PBS durante 24 horas a 4°C.

Posteriormente las muestras fueron procesadas para poder luego ser preparadas para la observación mediante microscopía óptica convencional utilizando el siguiente protocolo (Zygar CA et al, 1998, Galbis-Estrada C et al, 2012; Pons-Vazquez S et al, 2011)

- Fijación de pieza completa (globo ocular) en una solución fijadora de paraformaldehído 4% en tampón PBS 0.01M y pH 7.4 durante 24h a 4°C.

- Lavado durante 2 horas a 4º C en tampón PBS 0.01M y pH 7.4. Se realizan 3 lavados más con el mismo tampón, cada uno de ellos de 10 minutos a 4º C.
- Depósito de cada pieza convenientemente identificada en tampón PBS 0.01M y pH 7.4 en un eppendorf y se almacenamiento en nevera a 4º C hasta su posterior procesamiento para la inclusión.

Una vez fijados en formaldehido, los ojos fueron seccionados a lo largo de un plano horizontal que pasa adyacente al nervio óptico, y se obtuvieron piezas de la retina retroecuatorial. Para la desecación y posterior inclusión de las muestras se utilizó el siguiente protocolo (Pons-Vázquez S, 2011):

- Baños con etanol a concentraciones crecientes. Con Etanol al 70% se realizaron 2 baños de 30 minutos a 37ºC en un baño de agua, agitando ocasionalmente. Posteriormente se pasó a una concentración mayor de Etanol (100%) realizando de nuevo 3 baños de 30

Metodología

minutos, a 37°C en un baño de agua, y agitando ocasionalmente.

- Baño con Xileno. Se realizan 3 baños de 30 minutos a temperatura ambiente. Agitando ocasionalmente.
- Posteriormente las muestras se depositaron en los contenedores de plástico en rejilla preparadas para la inmersión en parafina fundida a 65°C, en el Amershan Life Science Hybridization oven/shaker. Este paso se realiza 3 veces para que el xileno sea sustituido por la parafina.
- Enfriado de las muestras.

Para realizar los cortes de estos bloques de parafina que contenían las muestras y obtener microsecciones transversales de retina retroecuatorial de 5 micras de espesor que se colocaron sobre portas se utilizó un micrótopo (Leica RM 2135). Después se procedió a desparafinar las muestras, invirtiendo el proceso de inclusión en parafina y se procedió a teñirlas alternativamente con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

Los portaobjetos conteniendo las secciones transversales de la retina se examinaron mediante un microscopio óptico Leica DMLB.

El examen morfológico incluyó la evaluación del tejido retiniano “in toto”, así como la morfología de las capas retinianas y la integridad anatómica de las células y prolongaciones celulares de las distintas capas retinianas. Las células retinianas se identificaron mediante sus características fenotípicas: células del epitelio pigmentario, fotorreceptores (conos y bastones), células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células ganglionares y astrocitos.

Se midió la densidad de núcleos teñidos de células ganglionares, medidas en tres cortes de retina distintos para obtener la media aritmética. Además mediante el programa de análisis de imágenes ImageJ se realizaron medidas del espesor total de la retina y por capas (capa de células ganglionares, capa plexiforme interna, capa nuclear interna, capa plexiforme externa, complejo de fotorreceptores –capa nuclear externa, segmentos internos y

Metodología

externos de fotorreceptores-). Se realizaron 3 medidas de cada valor obteniendo después la media aritmética de cada uno. Las medidas se realizaron en píxeles, realizando después la conversión a micras según las siguientes fórmulas:

$$1 \text{ píxel} = 264'583333 \text{ micras}$$

$$\text{Resultado en micras}/(\text{fa} \times \text{fc})^2$$

Se realizó también la corrección de la ampliación de la imagen mediante el factor de conversión (fc) de la magnificación del microscopio (20x en nuestro caso) y el factor de conversión adicional propio del procesamiento de la imagen (fa) que fue de 40x en nuestro caso, por tanto las medidas y análisis histológico se realizaron con una magnificación resultante final de 800x.

3.5. Análisis bioquímico de humor vítreo y acuoso.

La concentración de los ácidos grasos principales en las muestras de humor acuoso y vítreo fueron medidas por cromatografía de gases dentro del estudio toxicocinético del DHA.

Para analizar los ácidos grasos por cromatografía de gases deben ser transformados en compuestos más volátiles. La transformación mas usual es la transformación a ésteres metílicos, ya que esto permite mejorar la forma de los picos obtenidos y así favorece una separación óptica (Liu DS et al, 1994). La formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realiza en presencia de un agente catalizador disuelto en metanol. La catálisis puede ser ácida o básica.

La técnica para determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos, en forma de sus ésteres metílicos es la cromatografía de gases (Seppänen-Laakso et al, 2002). El uso de columnas capilares polares permite separar una gran cantidad de ésteres metílicos de ácidos grasos en relación a su polaridad y su temperatura de ebullición (Ravandi A, 1995). Los ácidos grasos de cadena corta y los de menor número de insaturaciones alcanzan la ebullición antes que los de cadena larga y mayor número de dobles enlaces.

Metodología

La fase estacionaria más utilizada se compone de biscianoprolipsiloxano. A mayor proporción del mismo en la fase, mayor grado de polaridad en la columna. La combinación de la cromatografía de gases con un detector de espectrometría de masas es la mejor técnica para determinar la concentración de ácidos grasos esenciales como el DHA.

Se determinó por tanto, mediante esta técnica, la concentración de DHA en el humor acuoso y humor vítreo de los conejos de este estudio.

El análisis de ácidos grasos se realizó basándonos en el método descrito por Lepage y Roy. Se partió de 10 μL de muestra (humor acuoso/humor vítreo) a los que se añadieron 50 μL de patrón interno (C17:0 y C23:0, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada uno). Seguidamente se transesterifican con cloruro de acetilo en metanol (1,75 mL de metanol y 100 μL de cloruro de acetilo por muestra) durante 18 horas a 50°C. Los metilésteres de los ácidos grasos obtenidos se analizaron por cromatografía de gases con detección por

espectrometría de masas. La columna empleada fue una HP-INNOWAX® (30 m, 0,25 μ M, 0,1 mm). La temperatura del inyector se fijó a 250°C y las muestras se inyectaron en modo Split-less. Se inyectó 1 μ L de muestra en los PMN y PMBC y 0,2 μ g de muestra para el plasma. El horno del cromatógrafo de gases operó a temperatura inicial de 50°C hasta 200°C a 25°C/min, y a continuación la temperatura se aumentó hasta 230°C a 1,5°C/min y se mantuvo durante 8 min. El tiempo total de cada inyección fue de 35 min. El espectrómetro de masas operó en modo SIM (selective ion monitoring), con un dwell time de 25 msec. Se seleccionó un ión cuantificador y 3 iones cualificadores para DHA. La estabilidad del tiempo de retención se fijó utilizando bloqueo del tiempo de retención respecto al pico del ácido araquidónico (C20:0).

La concentración de DHA se obtuvo tras integración de las señales correspondientes a los iones cuantificadores para estas sustancias e interpolación del valor de las áreas sobre las curvas de calibración a 6 niveles (100 μ g, 50 μ g, 25 μ g, 12,5 μ g, 6,25 μ g y 3.125 μ g) construidas a partir de un patrón de concentración conocida

Metodología

(GLC-462, NuCheck-INC) empleando el método del patrón interno. La composición porcentual de AA, EPA y DHA en cada muestra se realizó dividiendo la concentración de cada ácido graso por la concentración de ácidos grasos totales en cada muestra de humor acuoso o vítreo de cada uno de los conejos utilizados en este estudio.

3.6. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se analizaron y se realizó un estudio estadístico con el programa SPSS Statistics 21.0 (IBM Corp). Se utilizaron test descriptivos para la agrupación de los datos en tablas resumen. Los datos fueron plasmados en forma de diagramas de cajas agrupados por las distintas variables estudiadas en los distintos grupos de estudio. Para todos los estudios estadísticos realizados se utilizaron test no paramétricos dada la pequeña n muestral en nuestro estudio. Para los estudios de correlaciones entre las variables *dosis* y las variables *electroretinográficas e histológicas* se realizaron tanto el test de Tau_b de Kendall como el test Rho de Spearman. Para la comparación de muestras independientes

(variable X para cada grupo de estudio) se utilizó el test U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon. El intervalo de confianza para todos los test estadísticos fue del 95%

3.7. Criterios de fin de estudio.

Dado que este era el primer estudio en el que se evaluó la seguridad de la administración intravítrea de DHA puro, *a priori* no se conocían los posibles efectos adversos que pudiera tener. Se definieron por tanto las situaciones ante las que se procedería al fin del estudio o al sacrificio del animal de estudio.

Se valoró diariamente el peso del animal, el nivel de ingesta y el nivel de actividad como signos de su estado físico y de dolor. Ante la presencia de cambios en el comportamiento de algún animal atribuibles a alguna complicación local post-inyección o sugestivas de reacción adversa sistémica medicamentosa se procedería a la salida del estudio de dicho animal y eutanasia paliativa.

Metodología

Ante la presencia de complicaciones oftalmológicas menores (erosión corneal, hipertensión ocular leve-moderada post-inyección), se procedería al tratamiento de la clínica con pomada de ciprofloxacino (1 aplicación cada 8 horas) en el caso de la erosión corneal y colirio de timolol maleato (Cusimolol 0'25%®, Laboratorios Alcon, Barcelona, España) en el caso de hipertensión ocular (1 gota cada 12 horas).

Ante la presencia de alguna complicación oftalmológica mayor (desprendimiento de retina, perforación ocular, enoftalmitis infecciosa o hipertensión ocular severa no controlable con el tratamiento tópico descrito) se procedería a la salida del estudio con tratamiento de la clínica si fuera posible y/o eutanasia paliativa.

4. Resultados y desarrollo argumental

Para facilitar la visualización de los resultados, éstos se presentarán en las tablas de resumen de datos por grupos con un código de colores gradual proporcional a la concentración de DHA puro administrada en la inyección intravítrea; para los grupos control se ha mantenido el color blanco.

GRUPOS	CONCENTRACIÓN DHA
1	Control
2	2'5mg/50 μ L
3	5mg/50 μ L
4	10mg/50 μ L
5	Control
8	5 μ g/50 μ L
7	25 μ g/50 μ L
6	50 μ g/50 μ L

Tabla 5: Distribución por grupos según las concentraciones administradas con código de colores gradual proporcional a la concentración.

4.1. Observación clínica

En la **primera fase** del estudio no hubo complicaciones directamente relacionadas con la inyección intravítrea (hemorragia subconjuntival o vítrea, catarata, desprendimiento de retina). No obstante el examen con la lámpara de hendidura reveló una inflamación importante en los conejos del grupo 4. En uno de los ojos de este grupo hubo una reacción inflamatoria de gran magnitud que se asoció a ectasia corneal aguda y edema corneal circundante. Con el fin de evitar cualquier depreciación de la magnitud de la inflamación se trató la lesión solamente con pomada de ciprofloxacino, consiguiendo la resolución progresiva y espontánea de la inflamación. El conejo no mostró alteraciones en su comportamiento atribuibles a la clínica oftalmológica, manteniendo el nivel de ingesta y de actividad normal por lo que no precisó la salida del estudio con eutanasia paliativa. La decisión de no salida de estudio y no administración de analgesia fue tomada junto con el personal responsable del estabulario por su mayor experiencia en el trabajo con conejos. En el seguimiento mejoró la ectasia corneal

quedando un leucoma corneal paracentral inferior en la evaluación final de dicho conejo. También fue notable una leve a moderada hiperemia conjuntival periquerática en los grupos 2 y 3 de intensidad directamente proporcionales a la concentración inyectada. Por tanto, las concentraciones de DHA usadas en los grupos 2, 3 y 4 (2'5mg/50 μ l, 5mg/50 μ l y 10mg/50 μ l respectivamente) se consideraron inseguras desde le punto de vista clínico macroscópico debido a la reacción inflamatoria que produjeron, que fue directamente proporcional a la concentración de DHA administrada.

La **segunda fase** del estudio se llevó a cabo tras realizar un ajuste en las concentraciones de DHA. No se observaron tampoco en estos conejos complicaciones directamente relacionadas con la inyección intravítrea (hemorragia subconjuntival o vítrea, catarata o desprendimiento de retina). El examen con lámpara de hendidura en los grupos 6, 7, 8 y los grupos control (1 y 5) fue estrictamente normal sin observarse reacción inflamatoria en la cámara anterior ni vítrea, opacidad corneal o del cristalino y la retina permaneció a plano si cambios macroscópicos.

Resultados

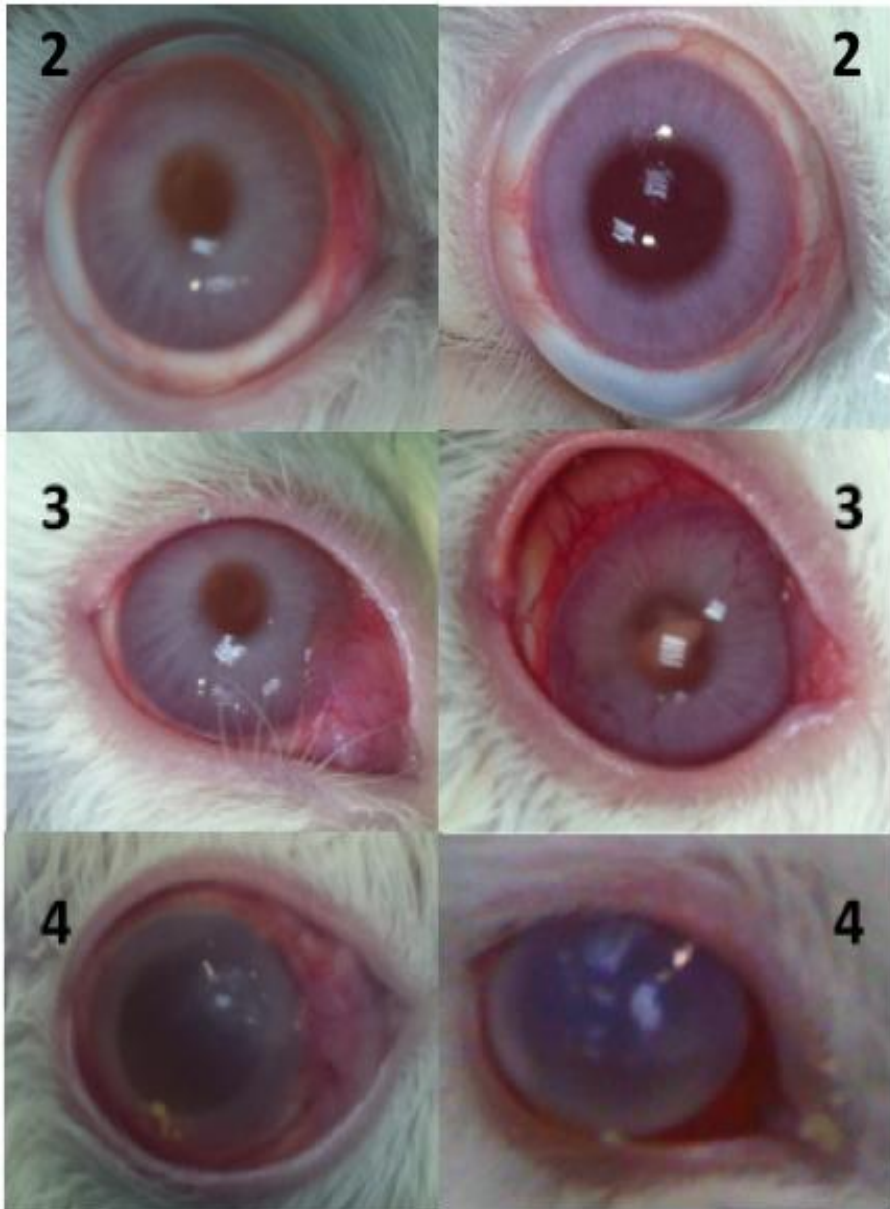


Figura 17: Aspecto macroscópico grupos 2,3,4. Las imágenes están rotuladas con el número del grupo al que corresponde cada conejo. Puede observarse el aumento gradual de hiperemia conjuntival periquerática y turbidez de la cámara anterior (valorable por la visibilidad del iris) desde el grupo 2 al grupo 4, pudiendo estar relacionada con la dosis administrada de DHA.

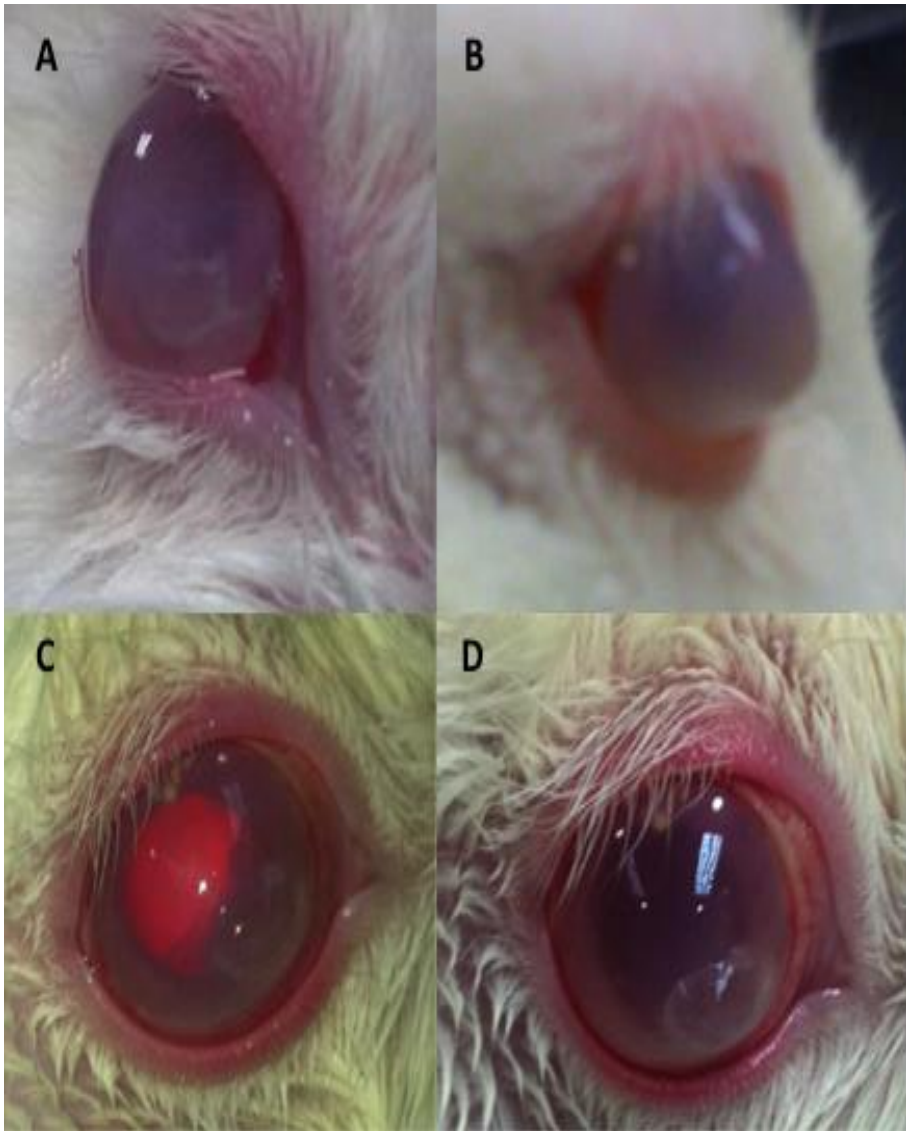


Figura 18: Aspecto macroscópico del conejo del grupo 4 que desarrolló una ectasia corneal aguda asociada a inflamación ocular. Detalle de la gran reacción inflamatoria presente en unos de los conejos inyectados con la dosis máxima probada 10mg/50µg. En la imagen A y B se observa una gran ectasia corneal aguda con edema corneal y gran reacción inflamatoria de la cámara anterior que dificulta la visualización del iris. En la imagen C se observa el fulgur retiniano conservado tras 1 semana de tratamiento tópico con pomada de ciprofloxacino y el leucoma resultante puede observarse en la imagen D.

Resultados

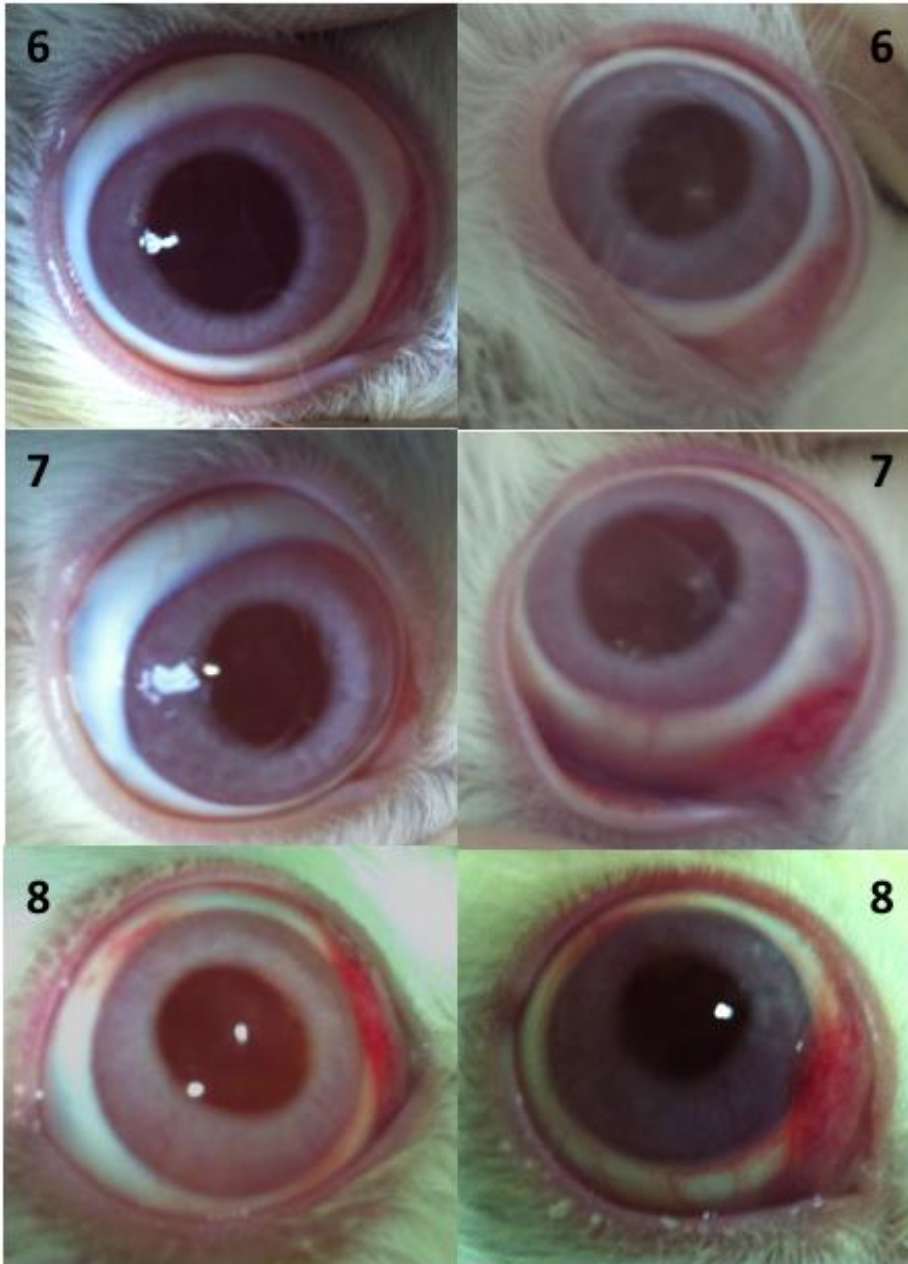


Figura 19: Aspecto macroscópico grupos 6,7,8. Las imágenes están rotuladas con el número del grupo al que corresponde cada conejo. Puede observarse la normalidad del polo anterior con conjuntiva y córnea clara, ausencia de turbidez de la cámara anterior y cristalino transparente.

4.2. Electroretinograma

Se muestran a continuación los datos estadísticos descriptivos del estudio electrofisiológico realizado en la exploración basal y 1 semana post-inyección.

GRUPOS	VARIABLES	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
1	ONDAESCOT	5	-199,50	-185,50	-191,60	5,68
	ONDABESCOT	5	320,00	345,00	333,40	10,92
	ONDAFOTOP	5	-145,00	-137,50	-141,38	3,24
	ONDABFOTOP	5	98,60	102,00	100,48	1,39
	ONDAESCOTPOST	5	-198,30	-183,40	-188,02	6,69
	ONDABESCOTPOST	5	319,90	343,00	331,30	9,36
	ONDAFOTOPPOST	5	-148,70	-134,30	-144,30	5,84
	ONDABFOTOPPOST	5	97,00	103,00	101,22	2,46
	N válido (según lista)	5				
2	ONDAESCOT	5	-197,80	-183,10	-189,60	6,56
	ONDABESCOT	5	325,00	339,00	333,80	6,45
	ONDAFOTOP	5	-148,60	-144,80	-146,32	1,71
	ONDABFOTOP	5	101,40	104,10	102,30	1,12
	ONDAESCOTPOST	5	-199,10	-188,10	-193,46	5,07
	ONDABESCOTPOST	5	327,40	337,30	331,52	4,04
	ONDAFOTOPPOST	5	-147,30	-137,50	-142,08	3,82
	ONDABFOTOPPOST	5	99,50	103,40	101,22	1,40
	N válido (según lista)	5				
3	ONDAESCOT	5	-193,20	-181,00	-185,42	4,96
	ONDABESCOT	5	328,60	337,50	332,02	3,52
	ONDAFOTOP	5	-145,00	-142,40	-143,86	0,98
	ONDABFOTOP	5	98,60	102,00	100,66	1,53
	ONDAESCOTPOST	5	-192,20	-179,10	-185,22	5,51
	ONDABESCOTPOST	5	328,60	345,00	333,42	6,59
	ONDAFOTOPPOST	5	-143,30	-137,30	-139,50	2,27
	ONDABFOTOPPOST	5	99,10	101,40	100,18	1,02
	N válido (según lista)	5				
4	ONDAESCOT	5	-188,30	-177,20	-182,44	4,85
	ONDABESCOT	5	316,50	331,20	327,18	6,16
	ONDAFOTOP	5	-147,20	-132,00	-137,10	6,19
	ONDABFOTOP	5	95,90	102,50	99,08	2,34
	ONDAESCOTPOST	5	-190,50	-179,10	-184,58	4,71
	ONDABESCOTPOST	5	311,10	331,50	323,56	8,55
	ONDAFOTOPPOST	5	-139,40	-133,50	-136,92	2,14
	ONDABFOTOPPOST	5	94,30	100,40	97,94	2,27
	N válido (según lista)	5				

Tabla 6a: Datos estadísticos descriptivos de ERG por grupos de tratamiento.

Resultados

5	ONDAESCOT	5	-192,60	-183,00	-187,08	3,60
	ONDABESCOT	5	328,90	343,00	334,84	5,65
	ONDAFOTOP	5	-145,20	-136,80	-142,54	3,39
	ONDABFOTOP	5	98,70	102,70	100,98	1,79
	ONDAESCOTPOST	5	-198,50	-177,20	-186,06	7,99
	ONDABESCOTPOST	5	317,20	339,90	331,24	8,96
	ONDAFOTOPPOST	5	-149,30	-132,70	-142,24	7,00
	ONDABFOTOPPOST	5	96,20	104,40	100,84	3,32
	N válido (según lista)	5				
6	ONDAESCOT	5	-197,50	-186,10	-192,62	4,35
	ONDABESCOT	5	330,60	338,60	334,06	3,27
	ONDAFOTOP	5	-148,30	-136,80	-143,52	4,40
	ONDABFOTOP	5	98,70	103,90	101,64	1,99
	ONDAESCOTPOST	5	-193,90	-181,60	-185,22	5,08
	ONDABESCOTPOST	5	313,80	334,30	321,12	8,26
	ONDAFOTOPPOST	5	-144,90	-131,90	-136,80	5,09
	ONDABFOTOPPOST	5	95,70	102,30	98,60	2,65
	N válido (según lista)	5				
7	ONDAESCOT	5	-195,00	-183,20	-188,98	5,06
	ONDABESCOT	5	318,50	331,00	323,30	4,94
	ONDAFOTOP	5	-145,00	-133,50	-138,88	4,92
	ONDABFOTOP	5	96,60	102,00	99,32	2,32
	ONDAESCOTPOST	5	-198,10	-181,30	-188,54	7,02
	ONDABESCOTPOST	5	313,10	339,40	326,72	10,22
	ONDAFOTOPPOST	5	-148,90	-135,30	-140,36	6,06
	ONDABFOTOPPOST	5	94,90	104,20	99,48	3,68
	N válido (según lista)	5				
8	ONDAESCOT	5	-199,50	-181,80	-188,60	8,49
	ONDABESCOT	5	314,50	337,70	324,92	10,65
	ONDAFOTOP	5	-147,60	-131,10	-138,00	7,33
	ONDABFOTOP	5	95,30	103,60	98,22	3,36
	ONDAESCOTPOST	5	-195,10	-183,90	-189,30	5,08
	ONDABESCOTPOST	5	320,00	335,50	327,46	7,54
	ONDAFOTOPPOST	5	-145,90	-134,70	-140,52	4,99
	ONDABFOTOPPOST	5	97,20	102,80	100,52	2,42
	N válido (según lista)	5				

Tabla 6b: Datos estadísticos descriptivos de ERG por grupos de tratamiento.

No se observaron cambios significativos en las amplitudes de las ondas A y B medidas en condiciones escotópicas y fotópicas expresadas en mV comparando los datos del ERG al inicio (antes de la inyección) y 1 semana después de la inyección intravítrea de DHA (teniendo en cuenta el global de los grupos $p=0,472$ para la onda A escotópica; $p=0,202$ para la onda B escotópica; $p=0,232$ para la onda

A fotópica y $p=0,395$ para la onda B fotópica). En la tabla 6 se desglosa el análisis estadístico mediante la prueba de Wilcoxon para cada variable dentro de cada uno de los grupos incluyendo los grupos control.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la media de la amplitud de la onda A fotópica basal (mV) del grupo 2 y las de los grupos control ($p=0,006$). También hubo diferencias estadísticamente significativas entre la media de la amplitud de la onda B escotópica basal del grupo 7 respecto a la de los grupos control ($p=0,02$). El resto de comparaciones de medias de las amplitudes de las ondas A y B escotópicas y fotópicas tanto en el examen inicial como en el examen post-inyección no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los ojos de control y los ojos inyectados con de $5\mu\text{g}/50\mu\text{l}$, $25\mu\text{g}/50\mu\text{l}$, $50\mu\text{g}/50\mu\text{l}$, $2,5\text{ mg}/50\mu\text{l}$, $5\text{mg}/50\mu\text{l}$ y $10\text{mg}/50\mu\text{l}$ de DHA.

No se demostró una correlación estadísticamente significativa entre la dosis de DHA administrada ($5\mu\text{g}/50\mu\text{l}$, $25\mu\text{g}/50\mu\text{l}$, $50\mu\text{g}/50\mu\text{l}$, $2,5\text{ mg}/50\mu\text{l}$, $5\text{mg}/50\mu\text{l}$ y $10\text{mg}/50\mu\text{l}$) y las variables del ERG tras una

Resultados

semana post-inyección (A escot $p=0'906$; B Escot $p=0'887$; A Fotop $p=0'256$; B Fotop $p=0'152$). No se realizó la correlación con las amplitudes de onda basales por carecer de validez clínica.

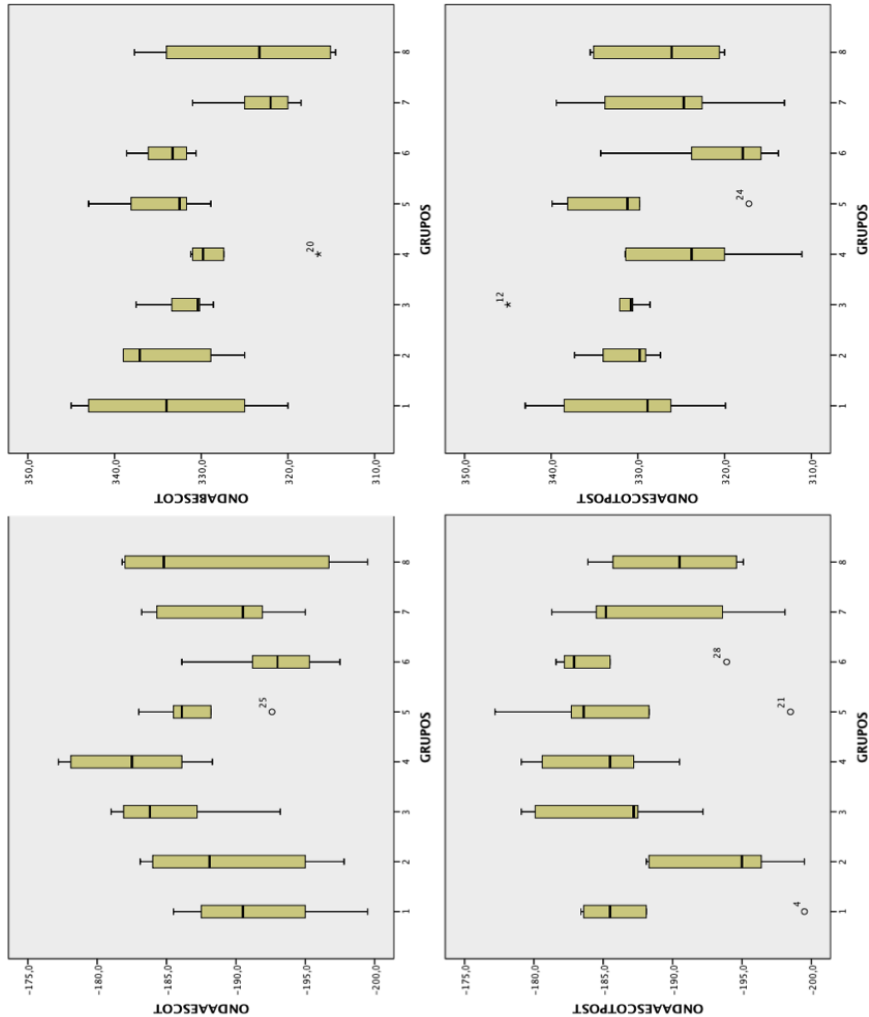


Figura 20a: Diagramas de cajas para las distintas variables de ERG estudiadas según los grupos. Las variables estudiadas incluyen las ondas A y B tanto en condiciones escóticas como fotópicas realizadas en el examen inicial y 1 semana post-inyección.

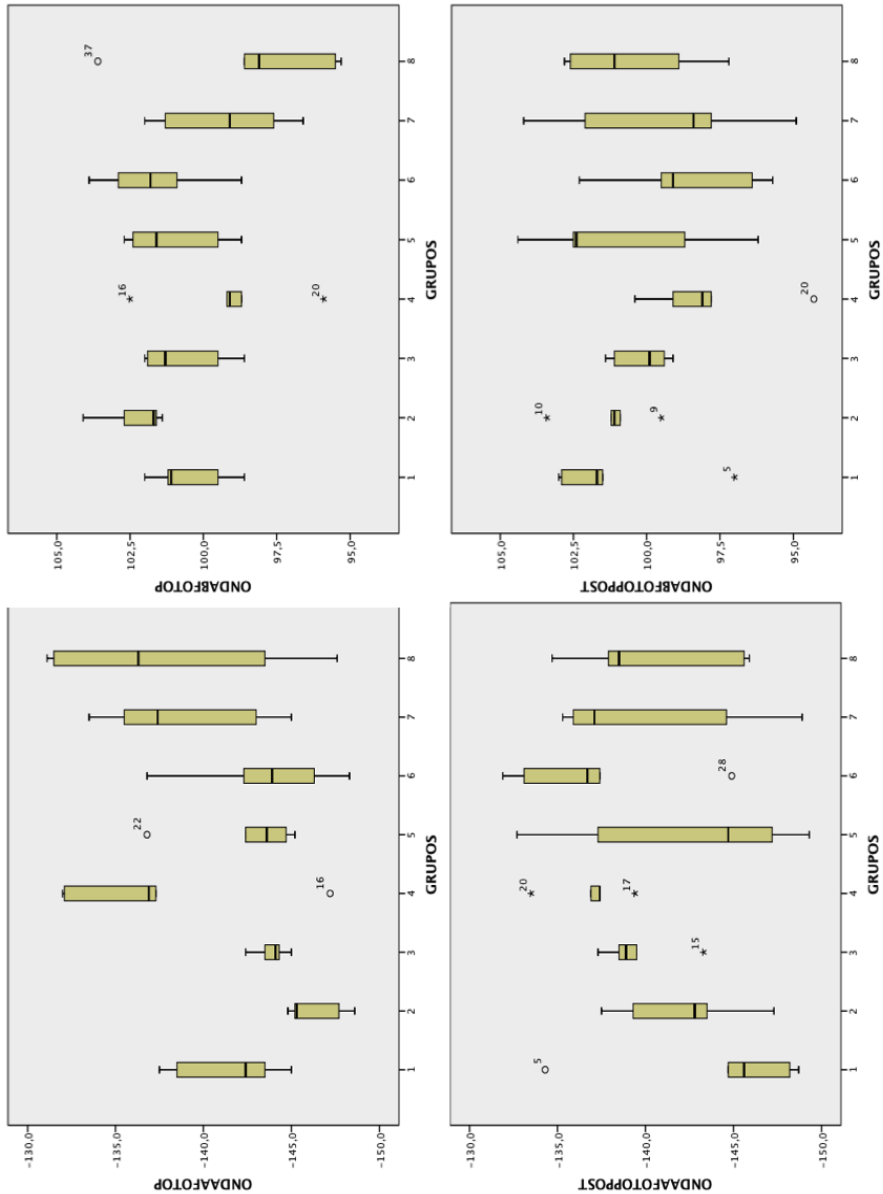


Figura 20b: Diagramas de cajas para las distintas variables de ERG estudiadas según los grupos. Las variables estudiadas incluyen las ondas A y B tanto en condiciones escotópicas como fotópicas realizadas en el examen inicial y 1 semana post-inyección.

Resultados

GRUPOS		ONDAAESCOT- ONDAAESCOTPOST	ONDABESCOT- ONDABESCOTPOST	ONDAAFOTOP- ONDAAFOTOPPOST	ONDABFOTOP- ONDABFOTOPPOST
1	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,816 ^b 0,414	-,405 ^c 0,686	-1,483 ^c 0,138	-,542 ^b 0,588
2	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,813 ^c 0,416	-,944 ^c 0,345	-2,023 ^b 0,043	-2,023 ^c 0,043
3	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,405 ^b 0,686	-,135 ^b 0,892	-2,023 ^b 0,043	-,674 ^c 0,5
4	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,405 ^c 0,686	-1,214 ^c 0,225	-,674 ^c 0,5	-,730 ^c 0,465
5	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,674 ^b 0,5	-,405 ^c 0,686	-,135 ^b 0,893	,000 ^d 1
6	Z Sig. asintót. (bilateral)	-1,753 ^b 0,08	-1,753 ^c 0,08	-1,753 ^b 0,08	-1,753 ^c 0,08
7	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,135 ^c 0,893	-,405 ^b 0,686	-,271 ^c 0,786	-,406 ^b 0,684
8	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,135 ^c 0,893	-,135 ^b 0,893	-,674 ^c 0,5	-1,214 ^b 0,225
TODOS	Z Sig. asintót. (bilateral)	-,719 ^b 0,472	-1,277 ^c 0,202	-1,196 ^b 0,232	-,851 ^c 0,395

Tabla 7: Datos de comparación de variables relacionadas (Variables de ERG pre-inyección y variables de ERG post-inyección). En total se han estudiado 4 variables la onda A escotópica, la onda B escotópica, la onda A fotópica y la onda B fotópica analizados por el test no paramétrico de Wilcoxon.

GRUPO 2 vs CONTROLES	ONDAA ESCOT	ONDAB ESCOT	ONDAA FOTOP	ONDAB FOTOP	ONDAA ESCOTPOST	ONDAB ESCOTPOST	ONDAA FOTOPPOST	ONDAB FOTOPPOST
U de Mann-Whitney	24,5	24	2,5	11	10,5	23,5	19	21
W de Wilcoxon	79,5	39	17,5	66	25,5	38,5	74	36
Z	-0,061	-0,123	-2,761	-1,719	-1,782	-0,184	-0,736	-0,49
Sig. asintót. (bilateral)	0,951	0,902	0,006	0,086	0,075	0,854	0,462	0,624
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,953	0,953	0,003	0,099	0,075	0,859	0,513	0,679

GRUPO 3 vs CONTROLES	ONDAA ESCOT	ONDAB ESCOT	ONDAA FOTOP	ONDAB FOTOP	ONDAA ESCOTPOST	ONDAB ESCOTPOST	ONDAA FOTOPPOST	ONDAB FOTOPPOST
U de Mann-Whitney	13	19	18	24	22	21	14,5	15
W de Wilcoxon	68	34	33	39	77	76	69,5	30
Z	-1,471	-0,736	-0,862	-0,123	-0,368	-0,49	-1,288	-1,225
Sig. asintót. (bilateral)	0,141	0,462	0,389	0,902	0,713	0,624	0,198	0,221
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,165	0,513	0,44	0,953	0,768	0,679	0,206	0,254

GRUPO 4 vs CONTROLES	ONDAA ESCOT	ONDAB ESCOT	ONDAA FOTOP	ONDAB FOTOP	ONDAA ESCOTPOST	ONDAB ESCOTPOST	ONDAA FOTOPPOST	ONDAB FOTOPPOST
U de Mann-Whitney	9,5	11	12	14,5	21,5	16	12	10
W de Wilcoxon	64,5	26	67	29,5	76,5	31	67	25
Z	-1,902	-1,716	-1,594	-1,288	-0,429	-1,102	-1,595	-1,837
Sig. asintót. (bilateral)	0,057	0,086	0,111	0,198	0,668	0,27	0,111	0,066
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,055	0,099	0,129	0,206	0,679	0,31	0,129	0,075

a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO

Prueba U de Mann-Whitney

Tabla 8a: Comparación de medias de las variables de ERG estudiadas en grupos tratados respecto a grupos control mediante el test estadístico U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon.

Resultados

GRUPO 6 vs CONTROLES	ONDAA ESCOT	ONDAB ESCOT	ONDAA FOTOP	ONDAB FOTOP	ONDAA ESCOTPOST	ONDAB ESCOTPOST	ONDAA FOTOPPOST	ONDAB FOTOPPOST
U de Mann-Whitney	13,5	24,5	19,5	17,5	17,5	9	11	12
W de Wilcoxon	28,5	39,5	34,5	72,5	72,5	24	66	27
Z	-1,411	-0,061	-0,675	-0,92	-0,92	-1,96	-1,716	-1,592
Sig. asintót. (bilateral)	0,158	0,951	0,52	0,357	0,357	0,055	0,086	0,111
Sig. exacta [2* (Sig. unilateral)]	0,165	0,953	0,513	0,371	0,371	0,055	0,099	0,129

GRUPO 7 vs CONTROLES	ONDAA ESCOT	ONDAB ESCOT	ONDAA FOTOP	ONDAB FOTOP	ONDAA ESCOTPOST	ONDAB ESCOTPOST	ONDAA FOTOPPOST	ONDAB FOTOPPOST
U de Mann-Whitney	24	6	14,5	15,5	23	18	18	18
W de Wilcoxon	79	21	69,5	30,5	38	33	73	33
Z	-0,123	-2,333	-1,288	-1,166	-0,245	-0,857	-0,858	-0,857
Sig. asintót. (bilateral)	0,902	0,02	0,198	0,244	0,806	0,391	0,391	0,391
Sig. exacta [2* (Sig. unilateral)]	0,953	0,019	0,206	0,254	0,859	0,44	0,44	0,44

GRUPO 8 vs CONTROLES	ONDAA ESCOT	ONDAB ESCOT	ONDAA FOTOP	ONDAB FOTOP	ONDAA ESCOTPOST	ONDAB ESCOTPOST	ONDAA FOTOPPOST	ONDAB FOTOPPOST
U de Mann-Whitney	19,5	12,5	15,5	10,5	15	18	19,5	22
W de Wilcoxon	74,5	27,5	70,5	25,5	30	33	74,5	37
Z	-0,675	-1,534	-1,166	-1,779	-1,226	-0,857	-0,675	-0,367
Sig. asintót. (bilateral)	0,5	0,125	0,244	0,075	0,22	0,391	0,5	0,713
Sig. exacta [2* (Sig. unilateral)]	0,513	0,129	0,254	0,075	0,254	0,44	0,513	0,768

a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO

Prueba U de Mann-Whitney

Tabla 8b: Comparación de medias de las variables de ERG estudiadas en grupos tratados respecto a grupos control mediante el test estadístico U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon.

			ONDAA ESCOTPOST	ONDAB ESCOTPOST	ONDAA FOTOPPOST	ONDAB FOTOPPOST
DOSIS	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación	-0,014	-0,017	0,133	-0,168
		Sig. (bilateral)	0,906	0,887	0,256	0,152
		N	40	40	40	40
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación	-0,029	-0,026	0,172	-0,213
		Sig. (bilateral)	0,86	0,872	0,289	0,187
		N	40	40	40	40

Tabla 9: Correlación entre las distintas variables de ERG post-inyección y la dosis de DHA inyectadas según los test no paramétricos de Tau de Kendall y Rho de Spearman.

4.3. Examen histológico

El análisis de las secciones transversales retroecuatoriales retinianas, teñidas con hematoxilina-eosina mediante microscopía óptica no mostró alteraciones morfológicas en relación a la pérdida significativa de elementos celulares, desorganización de las células en las capas retinianas, núcleos picnóticos ni perfiles compatibles con células apoptóticas o signos de degeneración o necrosis, en los ojos inyectados con las distintas concentraciones de DHA ni en los ojos de los grupos controles.

Resultados

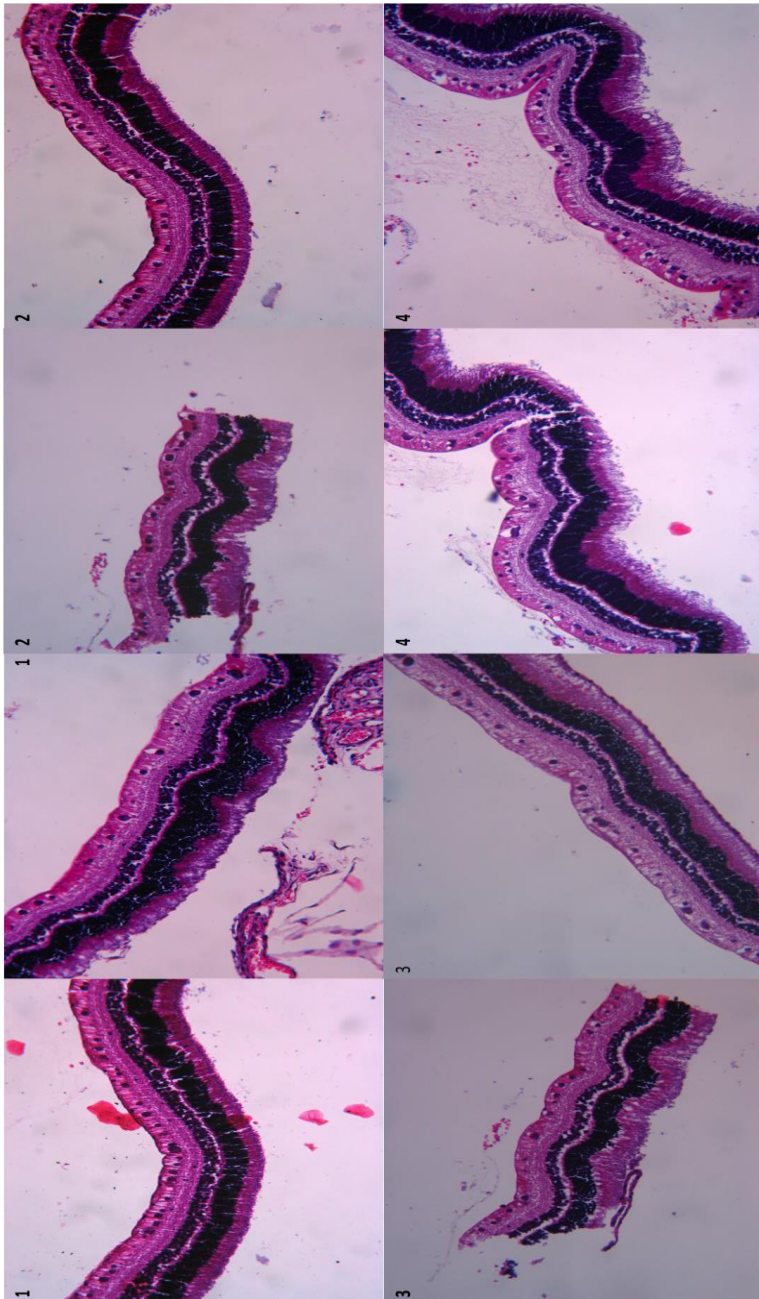


Figura 21a: El montaje de imágenes muestra un corte histológico de cada conejo estudiado, el número rotulado en la parte superior de cada imagen muestra el grupo al que pertenece cada corte histológico.

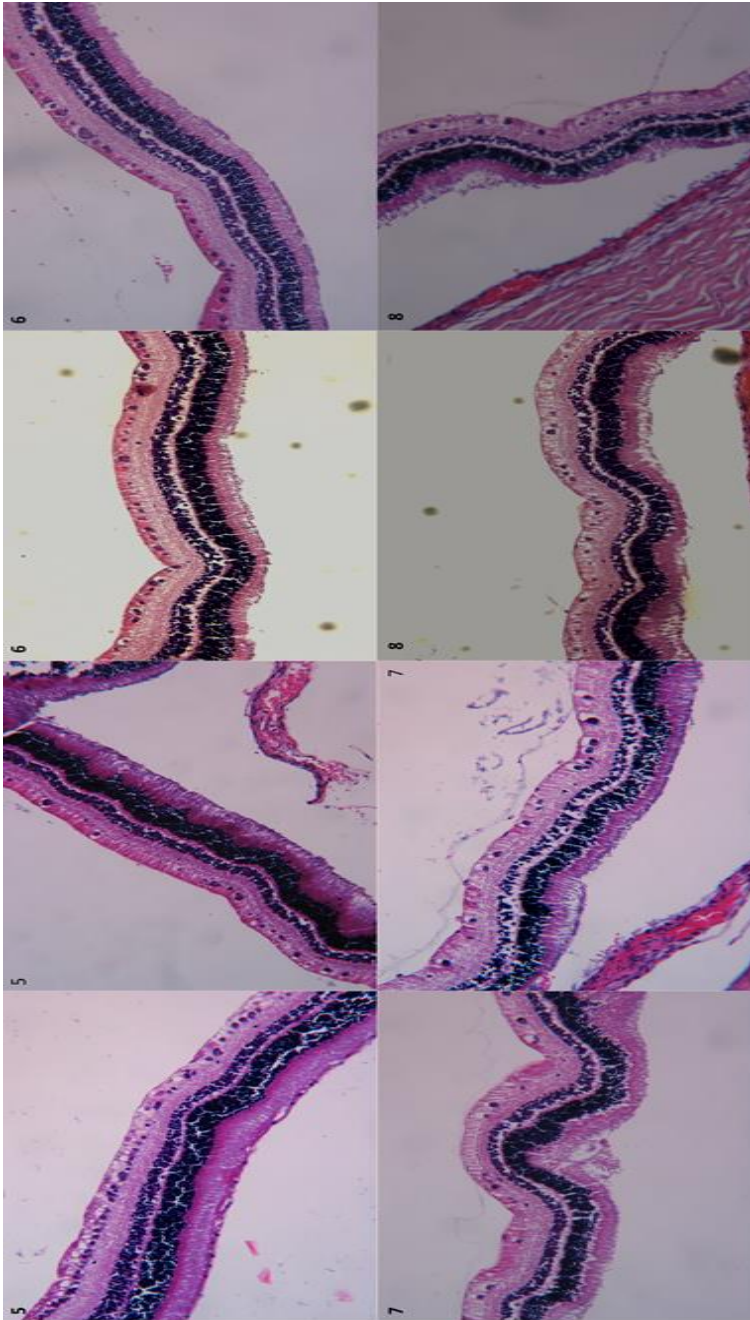


Figura 21b: El montaje de imágenes muestra un corte histológico de cada conejo estudiado, el número rotulado en la parte superior de cada imagen muestra el grupo al que pertenece cada corte histológico.

Resultados

La **densidad nuclear media de los perfiles de células ganglionares**, principal variable morfológica estudiada, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos inyectados con DHA a distintas concentraciones y los grupos controles (grupo 2 $p=0'667$; grupo 3 $p=1$; grupo 4 $p=1$; grupo 6 $p=1$; grupo 7 $p=0'333$; grupo 8 $p=0'333$).

El análisis de la correlación entre la dosis empleada y la densidad nuclear media de las células ganglionares no demostró una relación estadísticamente significativa ($p=0'784$).

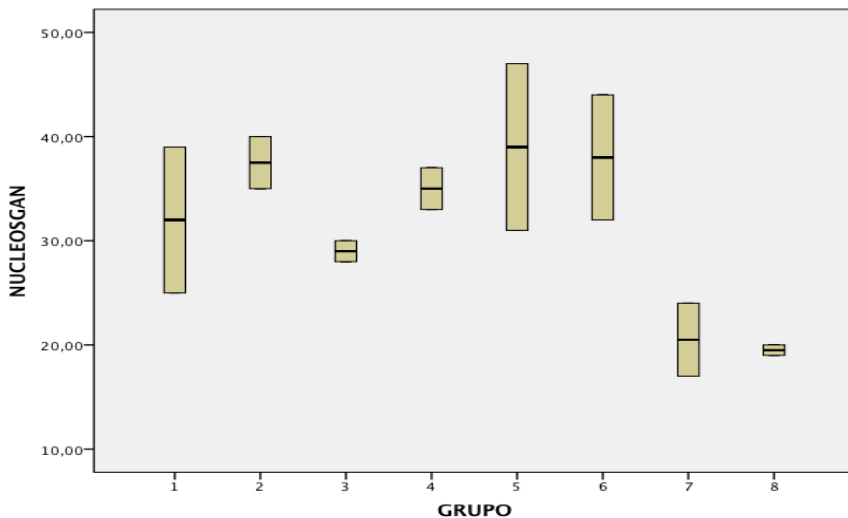


Figura 22: Gráficos de cajas correspondientes a la medias de densidad de núcleos teñidos de células ganglionares en los distintos grupos de estudio.

VARIABLE	ESTUDIO ESTADÍSTICO		DOSIS
NUCLEOS C. GANGLIONARES	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,053 0,784 16
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,089 0,742 16

Tabla 10: Datos de correlación entre la dosis de DHA administrada y la densidad de células ganglionares por el test de Tau de Kendall y Rho de Spearman.

Densidad de núcleos de C Ganglionares	GRUPO 2 vs CONTROLES	GRUPO 3 vs CONTROLES	GRUPO 4 vs CONTROLES	GRUPO 6 vs CONTROLES	GRUPO 7 vs CONTROLES	GRUPO 8 vs CONTROLES
U de Mann-Whitney	1	2	2	2	0	0
W de Wilcoxon	4	5	5	5	3	3
Z	-0,775	0	0	0	-1,549	-1,549
Sig. asintót. (bilateral)	0,439	1	1	1	0,121	0,121
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,667 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	1,000 ^b	,333 ^b	,333 ^b

Tabla 11: Datos de comparación de medias de la densidad de núcleos teñidos de células ganglionares de cada grupo inyectado con DHA respecto a los grupos control mediante el test U de Mann Whitney y W de Wilcoxon.

Una vez corregidos los factores de magnificación del microscopio y del análisis de imagen (800x) se procedió a medir los distintos espesores retinianos para poder establecer la correlación con la dosis de DHA administrada y la comparación de medias de cada variable. Los datos descriptivos estadísticos se resumen en la tabla 12.

Resultados

GRUPO	VARIABLE	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
1	ESPESORTOTAL	6	158,45	193,94	175,165	14,85478
	GANGLIONARES	6	26,72	41,61	34,18667	6,369944
	CPI	6	20,51	33,87	26,42	5,037015
	CNI	6	20,84	27,65	23,96667	2,322487
	CPE	6	5,79	9,13	7,545	1,388708
	CNEISOS	6	62,34	92,24	76,46333	11,18735
	N válido (según lista)	6				
2	ESPESORTOTAL	6	156,04	177,14	168,7433	8,415844
	GANGLIONARES	6	21,03	39,52	29,115	7,28578
	CPI	6	24,87	35,72	29,06	3,847254
	CNI	6	18,88	25,43	22,83	2,747348
	CPE	6	5,95	8,93	7,358333	0,998868
	CNEISOS	6	60,19	91,68	75,47833	13,14761
	N válido (según lista)	6				
3	ESPESORTOTAL	6	167,38	197,21	177,7617	11,51102
	GANGLIONARES	6	17,79	36,31	25,415	6,615944
	CPI	6	24,51	35,12	30,995	4,347278
	CNI	6	14,92	22,65	19,53833	3,132714
	CPE	6	5,95	9,92	8,08	1,699729
	CNEISOS	6	69,82	88,5	78,53167	6,182215
	N válido (según lista)	6				
4	ESPESORTOTAL	6	178,06	198,8	187,4133	7,610697
	GANGLIONARES	6	24,87	34,55	29,57	3,843618
	CPI	6	22,29	42,8	31,50833	8,530068
	CNI	6	21,86	29,77	26,61167	2,735335
	CPE	6	6,65	9,39	7,676667	0,996025
	CNEISOS	6	79,84	101,86	91,90833	9,790862
	N válido (según lista)	6				
5	ESPESORTOTAL	6	173,3	224,53	192,2467	23,01081
	GANGLIONARES	6	22,06	38,96	29,34	7,890845
	CPI	6	29,53	36,61	33,27667	2,449291
	CNI	6	17,07	31,09	23,135	4,692175
	CPE	6	6,35	8,6	7,486667	0,960722
	CNEISOS	6	85,13	103,42	97,25667	6,296541
	N válido (según lista)	6				

Tabla 12a: Datos estadísticos descriptivos de las distintas mediciones histológicas por grupos de tratamiento.

6	ESPESORTOTAL	6	154,22	229,06	192,7217	34,25596
	GANGLIONARES	6	19,98	36,05	28,26667	6,219304
	CPI	6	21,83	34,92	29,04833	4,307916
	CNI	6	23,28	26,99	24,65667	1,480536
	CPE	6	6,12	10,58	7,81	1,602673
	CNEISOS	6	65,72	102,53	80,89333	16,47802
	N válido (según lista)	6				
7	ESPESORTOTAL	6	147,9	187,56	170,8167	13,50178
	GANGLIONARES	6	29,6	33,97	31,39167	1,742187
	CPI	6	18,88	31,88	25,775	5,154938
	CNI	6	15,87	26,99	22,22333	3,679591
	CPE	6	5,79	11,91	8,791667	2,603017
	CNEISOS	6	71,24	82,12	76,51833	4,139683
	N válido (según lista)	6				
8	ESPESORTOTAL	6	141,29	158,62	147,4783	6,225398
	GANGLIONARES	6	23,58	28,94	26,375	2,052284
	CPI	6	18,88	31,88	25,775	5,154938
	CNI	6	15,91	29,4	20,61167	4,836161
	CPE	6	4,96	7,54	6,135	0,876966
	CNEISOS	6	51,83	86,32	67,05	11,78558
	N válido (según lista)	6				

Tabla 12b: Datos estadísticos descriptivos de las distintas mediciones histológicas por grupos de tratamiento.

Las medias de las medidas de los **espesores retinianos totales y por capas** (c. de células ganglionares, c. plexiforme interna, c. nuclear interna, c. plexiforme externa y complejo de células fotorreceptoras –c. nuclear externa y segmento internos y externos de los fotorreceptores-) medidas en micras no mostraron una correlación estadísticamente significativa con las distintas dosis decrecientes de DHA empleadas mediante el test de Tau de Kendall y Rho de Spearman (Espesor total $p=0'907$; C Ganglionares $p=0'136$; CPI $p=0'545$; CNI $p=0'551$; CPE $p=0'942$; CNE-IS/OS $p=0'705$).

Resultados

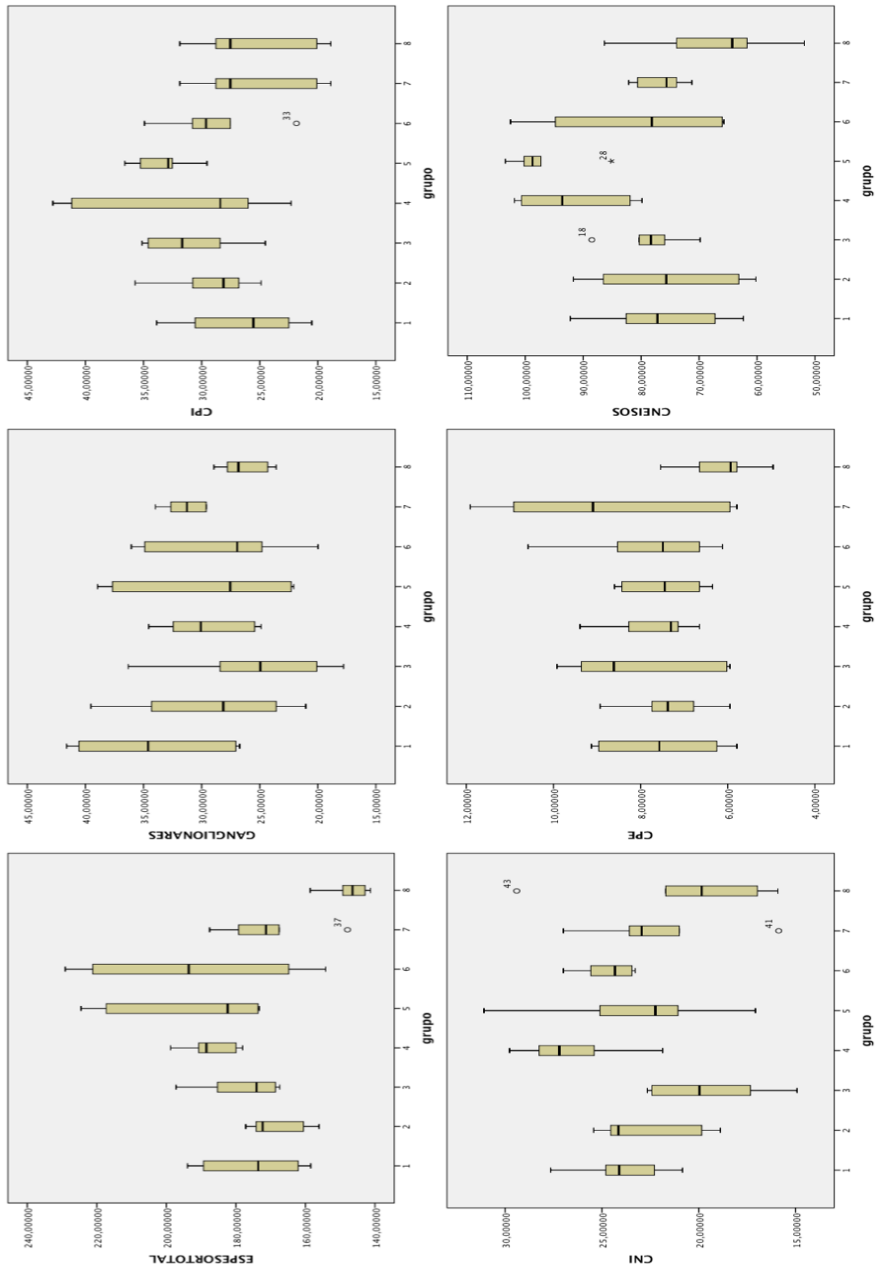


Figura 23: Diagramas de cajas para las distintas variables histológicas estudiadas según los diferentes grupos. Las variables estudiadas incluyen el espesor total retiniano y las medidas por capas de la retina.

VARIABLE	PRUEBA ESTADÍSTICA		DOSIS
ESPESORTOTAL	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	0,014 0,892 48
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,017 0,909 48
GANGLIONARES	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,158 0,136 48
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,194 0,187 48
CPI	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,023 0,828 48
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,011 0,941 48
CNI	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,022 0,836 48
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,016 0,913 48
CPE	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	0,008 0,942 48
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	0,01 0,945 48
CNE-IS/OS	Tau_b de Kendall	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,04 0,705 48
	Rho de Spearman	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-0,067 0,652 48

Pruebas de correlación entre la variable DOSIS y las distintas variables de espesor

Tabla 13: Datos de correlación entre la dosis de DHA empleada y los valores de espesor retiniano total y por capas según los test de Tau de Kendall y Rho de Spearman.

Resultados

En la comparación de las medias de los distintos espesores retinianos medidos en los grupos donde se administró DHA respecto a los grupos control mediante el test estadístico no paramétrico de la U de Mann Whitney, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la media del espesor retiniano total, el espesor de la capa plexiforme externa y el espesor del complejo formado por la capa nuclear externa y los segmentos internos y externos de los fotorreceptores del **grupo 8** respecto a los grupos control, siendo los espesores del grupo tratado menores respecto al grupo control. Los niveles de significación fueron $p > 0,001$ para el espesor total, $p = 0,024$ para la CPE y $p = 0,018$ para el complejo CNE-fotorreceptores según el test no paramétrico de U de Mann-Whitney. El resto de comparaciones de medias de las amplitudes de onda no demostró diferencias estadísticamente significativas. Los datos de los niveles de significación se encuentran esquematizados en la tabla 14.

GRUPO 2 vs CONTROLES	ESPESOR TOTAL	GANGLIONARES	CPI	CNI	CPE	CNE-IS/OS
U de Mann-Whitney	18	29	32	34,5	33	19
W de Wilcoxon	39	50	53	55,5	54	40
Z	-1,686	-0,656	-0,375	-0,141	-0,281	-1,592
Sig. asintót. (bilateral)	0,092	0,512	0,708	0,888	0,779	0,111
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,102	0,553	0,75	0,892	0,82	0,125

a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO
Prueba U de Mann-Whitney

GRUPO 3 vs CONTROLES	ESPESOR TOTAL	GANGLIONARES	CPI	CNI	CPE	CNE-IS/OS
U de Mann-Whitney	31,5	19	24	16	27,5	20
W de Wilcoxon	52,5	40	102	37	105,5	41
Z	-0,422	-1,592	-1,124	-1,873	-0,797	-1,499
Sig. asintót. (bilateral)	0,673	0,111	0,261	0,061	0,426	0,134
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,682	0,125	0,291	0,067	0,437	0,151

a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO
Prueba U de Mann-Whitney

GRUPO 4 vs CONTROLES	ESPESOR TOTAL	GANGLIONARES	CPI	CNI	CPE	CNE-IS/OS
U de Mann-Whitney	25	29	33	16,5	31,5	29
W de Wilcoxon	103	50	111	94,5	109,5	107
Z	-1,03	-0,656	-0,281	-1,827	-0,423	-0,656
Sig. asintót. (bilateral)	0,303	0,512	0,779	0,068	0,673	0,512
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,335	0,553	0,82	0,067	0,682	0,553

a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO
Prueba U de Mann-Whitney

Tabla 14a: Comparación de medias de las variables histológicas en grupos tratados respecto a grupos control mediante el test estadístico U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon.

GRUPO 6 vs CONTROLES	ESPESOR TOTAL	GANGLIONARES	CPI	CNI	CPE	CNE-IS/OS
U de Mann-Whitney	34	26	30	25	35	28
W de Wilcoxon	112	47	51	103	113	49
Z	-0,187	-0,937	-0,562	-1,03	-0,094	-0,749
Sig. asintót. (bilateral)	0,851	0,349	0,574	0,303	0,925	0,454
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,892	0,385	0,616	0,335	0,964	0,494
a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO						
Prueba U de Mann-Whitney						

GRUPO 7 vs CONTROLES	ESPESOR TOTAL	GANGLIONARES	CPI	CNI	CPE	CNE-IS/OS
U de Mann-Whitney	24	32	31	29,5	27	17
W de Wilcoxon	45	53	109	50,5	105	38
Z	-1,124	-0,375	-0,468	-0,609	-0,844	-1,78
Sig. asintót. (bilateral)	0,261	0,708	0,64	0,542	0,399	0,075
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,291	0,75	0,682	0,553	0,437	0,083
a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO						
Prueba U de Mann-Whitney						

GRUPO 8 vs CONTROLES	ESPESOR TOTAL	GANGLIONARES	CPI	CNI	CPE	CNE-IS/OS
U de Mann-Whitney	1	23	18	16,5	12	11
W de Wilcoxon	22	44	39	37,5	33	32
Z	-3,278	-1,218	-1,686	-1,827	-2,25	-2,341
Sig. asintót. (bilateral)	>0,001	0,223	0,092	0,068	0,024	0,019
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	>0,001	0,25	0,102	0,067	0,024	0,018
a. Variable de agrupación: TRATAMIENTO						
Prueba U de Mann-Whitney						

Tabla 14b: Comparación de medias de las variables histológicas en grupos tratados respecto a grupos control mediante el test estadístico U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon.

4.4. Análisis bioquímico de las muestras de humor acuoso y vítreo.

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la determinación por cromatografía de gases de la concentración de DHA (C22:6n3) en humor acuoso y vítreo 1 semana después de la inyección intravítrea de una dosis única de DHA a distintas concentraciones.

H.ACUOSO	1,00	2	3	4	5	6	7	8
DOSIS	0,00	2500	5000	10000	0	5	25	50
Conejo 1	0,34	2,38	3,58	4,74	2,12	3,42	3,61	4,73
Conejo 2	0,57	4,00	4,23	7,44	3,35	5,20	4,32	4,73
H.VITREO	1,00	2	3	4	5	6	7	8
DOSIS	0,00	2500	5000	10000	0	5	25	50
Conejo 1	0,58	29,90	50,11	39,76	3,19	1,58	1,33	2,11
Conejo 2	0,87	22,14	60,03	53,80	28,47	4,01	3,14	4,91

Tabla 15: Concentraciones de DHA medidas en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en humor vítreo y acuoso una semana después de la inyección intravítrea de DHA.

El análisis cuantitativo de la concentración de ácidos grasos en humor acuoso y humor vítreo tras una semana post-inyección

Resultados

mediante cromatografía de gases reveló una correlación estadísticamente significativa ($p=0,004$) entre la dosis de DHA administrada y la concentración de DHA en humor vítreo una semana después de la inyección. No se encontró una correlación estadísticamente significativa en el caso de la concentración de DHA en humor acuoso. ($p=0,134$)

		DHA ACUOSO	DHA VITREO
DOSIS	Correlación de Pearson	0,578	,882**
	Sig. (bilateral)	0,134	0,004
	N	8	8

Tabla 16: Datos de correlación entre la dosis inoculada y la concentración de DHA en humor acuoso y vítreo una semana post-inyección.

5. **Discusión.**

La función visual se fundamenta en la transducción de las señales luminosas que recibe la retina, y su procesamiento para transformarlas en impulsos eléctricos. La fototransducción y el ciclo de la visión tienen lugar principalmente en el epitelio pigmentario y los segmentos externos de los fotorreceptores.

Sabemos que existe un sistema de captación y reutilización del DHA en la retina, que nos previene de la carencia de este ácido graso esencial. Este mecanismo protector se debe a que el DHA desempeña funciones estructurales primordiales para la función visual ya que forma parte de las membranas de los discos de los fotorreceptores que contienen los pigmentos fotosensibles además de otras funciones metabólicas (Bazan NG et al, 1992; Pinazo-Durán MD y Boscá-Gomar L, 2012).

Las degeneraciones retinianas involucran múltiples y complejas vías patogénicas, pero muchas de ellas comparten la alteración de la valiosa relación entre los fotorreceptores y las células del EPR, esencial en el mecanismo de reciclaje de DHA. Ha sido demostrado

Discusión

que la pérdida de DHA en las células fotorreceptoras en la retina ocurre en diferentes degeneraciones de la retina tales como la DMAE, la retinitis pigmentosa, la enfermedad de Stargardt o el glaucoma (McColl AJ y Converse CA, 1995; Maude MB et al, 1998; Bazan NG et al, 1986; Cellini M et al, 1998; Hettema EH et al, 1996; Smith W et al, 2000).

Tras el descubrimiento de estas importantes funciones del DHA, diferentes estudios con este ácido graso poliinsaturado han puesto de manifiesto que las variaciones dietéticas influyen en la captación de DHA y por tanto en la función visual, que inducen incluso cambios en el patrón electroretinográfico (Jeffrey BG et al, 2001).

Estos datos han suscitado un interés creciente en los beneficios del DHA, promoviendo varios ensayos de suplementación dietética para enfermedades oculares como la DMAE, enfermedad de Stargardt, distrofia viteliforme macular de Best y retinitis pigmentosa. Se ha demostrado su eficacia en la DMAE y la retinitis

pigmentosa (AREDS report nº 8, 2001; Hettema EH y Tabak HF, 2000).

Tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica no se encontraron referencias sobre el uso del ácido graso DHA por vía intravítrea por lo que éste es el primer estudio de evaluación preclínica de la toxicidad retiniana tras la administración intravítrea de DHA puro en dosis única en un modelo animal de conejo albino.

Los estudios de toxicología preclínica tienen como objetivo principal localizar el o los órganos diana de toxicidad de una sustancia y estimar el margen de seguridad de un posible agente terapéutico en animales de experimentación (NC3RS, 2009). Estos estudios permiten extraer conclusiones generales de toxicidad que pueden avalarse con resultados propios y compararlos con otros obtenidos por otros investigadores y reportados en la literatura científica (Fiore t et al, 2010; Crafoord S et al, 2011; Zayit-Soudry S et al, 2010).

Discusión

Siguiendo el protocolo estándar para el estudio toxicológico de un fármaco nuevo (Penha FM et al, 2010), se diseñó un estudio preclínico o preliminar de corta duración que necesariamente debe preceder a la administración del fármaco en estudio en humanos (Declaración de Helsinki). En nuestro caso se estudió la seguridad retiniana del DHA administrado por vía intravítrea en dosis única.

La creciente utilización de la vía intravítrea para administrar fármacos en la patología retiniana se debe a las múltiples ventajas de esta técnica frente a algunos tratamientos sistémicos (España E y Díaz-Llopis M, 1996) entre las que cabe destacar la obtención de unos niveles mayores de fármaco a nivel intraocular.

El **examen clínico** realizado tras la inyección de las distintas concentraciones de DHA reveló que las concentraciones más altas no eran seguras ya que se produjo una importante reacción inflamatoria en la cámara anterior, con un caso de ectasia corneal asociada. Se han descrito reacciones inflamatorias similares tras la administración intravítrea de fármacos con una seguridad retiniana

probada. (Antonopoulos C, et al, 2011; Mozayan A y Farah S, 2012) A pesar de esto las concentraciones de **2,5 mg/50µl, 5mg/50µl y 10mg/50µl no fueron consideradas como seguras** desde el punto de vista clínico en la administración en dosis única por vía intravítrea en el modelo animal de conejo albino. Las concentraciones más bajas, 5µg/50µl, 25µg/50µl y 50µg/50µl, no mostraron alteraciones en el estudio oftalmoscópico por lo que se clasificaron como seguras desde el punto de vista macroscópico.

El **examen funcional** no reveló una correlación estadísticamente significativa con la concentración de DHA empleado. Además no se objetivaron cambios en las amplitudes de onda medidas pre y post-inyección. Si que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la media de la amplitud de la onda A fotópica basal (mV) del grupo 2 y las de los grupos control ($p=0,006$). También hubo diferencias estadísticamente significativas entre la media de la amplitud de la onda B escotópica basal del grupo 7 respecto a la de los grupos control ($p=0,02$). Estas diferencias en datos pre-inyección no se

Discusión

manifestaron posteriormente en diferencias post-inyección por lo que representaron variaciones significativas en las amplitudes de onda basales sin una repercusión funcional posterior. Por tanto no fueron tomadas como datos de toxicidad retiniana secundaria a la inyección de DHA, sino como posibles anomalías en la realización del ERG al tratarse éste de un protocolo electroretinográfico en animales que puede ser menos predecible que en humanos. El resto de comparaciones de medias de las amplitudes de onda del ERG no demostraron diferencias estadísticamente significativas.

El **examen histológico morfológico** no mostró una correlación estadísticamente significativa entre las dosis empleadas y la densidad nuclear media de los perfiles de células ganglionares. Tampoco se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la comparación de las medias de las densidades de núcleos teñidos de células ganglionares de los grupos en los cuales se administró DHA respecto a los grupos control.

El **estudio histológico morfométrico** que evaluó los espesores retinianos totales y por capas no reveló una correlación estadísticamente significativa entre las distintas concentraciones de DHA inyectadas y los espesores retinianos obtenidos. Sin embargo, la comparación de medias de los espesores retinianos de los distintos grupos respecto a los grupos control, encontró diferencias estadísticamente significativas en la comparación de la media de las medidas de espesor total ($p > 0,001$), CPE ($p = 0,024$) y el complejo formado por la CNE y los segmentos internos y externos de los fotorreceptores ($p = 0,018$) del grupo 8 respecto a los grupos control. Quedó por tanto demostrado estadísticamente que existía una disminución de grosor significativa en diversas capas retinianas y en el espesor retiniano global del grupo 8 respecto a los grupos control. Podría tratarse por tanto de un signo de toxicidad secundaria al DHA, sin embargo la ausencia de alteraciones histológicas en los grupos tratados con dosis mucho mayores a las administradas en este grupo no apoyan esta hipótesis. No obstante, dada la alta significación de los resultados, la concentración de ***50µg/50µl*** de DHA, se clasificó

Discusión

como *no segura desde el punto de vista histológico*. El resto de comparaciones de medias de los espesores retinianos en los distintos grupos de estudio no demostró diferencias estadísticamente significativas.

El **estudio bioquímico** que cuantificó la concentración de DHA en vítreo una semana después de la inyección demostró una correlación estadísticamente significativa entre la dosis de DHA administrada y los niveles de DHA en vítreo. Este dato toxicocinético demuestra que la administración intravítrea de DHA aumenta la concentración de este ácido graso una semana después de su inyección confirmando la exposición local de la retina al DHA. Este hallazgo podría sugerir que el vítreo actúa como posible reservorio de este ácido graso esencial omega-3 cuando se inyecta de forma intravítrea.

Las limitaciones de este estudio fueron el pequeño tamaño muestral, el corto periodo de seguimiento y la existencia de diferencias anatómicas y funcionales entre la retinas del conejo y la

humana. Además no se determinó la absorción retiniana de DHA tras su administración intravítrea. En parte estas limitaciones se debieron al diseño del trabajo, al tratarse de un estudio preclínico de toxicidad de corta duración.

A pesar de estas limitaciones se ha alcanzado el objetivo principal y los objetivos secundarios del estudio. Por tanto, analizando globalmente nuestros resultados, podemos concluir que las concentraciones 50µg/50µl, 2,5 mg/50µl, 5mg/50µl y 10mg/50µl no son seguras en la administración intravítrea de dosis única en el conejo albino. Por el contrario, las concentraciones 5µg/50µl y 25µg/50µl son seguras desde el punto de vista clínico, funcional e histológico administradas en dosis única intravítrea en el conejo albino. La **dosis máxima tolerada** correspondería a una inyección única de 0'05ml de DHA puro con una concentración de 25µg/50µl, inoculando por tanto 25 µg de DHA por vía intravítrea. El **rango de dosis** incluiría también la concentración de 5µg/ µl siendo por tanto de 5 a 25 µg/50µl de DHA.

Discusión

Se postula que la administración intravítrea de DHA en el vítreo puede ser una terapia potencial para prevenir la progresión de las enfermedades degenerativas de la retina por la restauración de la alta concentración de DHA en los fotorreceptores. Se precisarán nuevos estudios con un mayor tamaño muestral y tiempo de seguimiento, con ajuste de las concentraciones de DHA a administrar (basándose en los datos de nuestro estudio) y con evaluación de variables de dosis-efecto, así como otros aspectos de la seguridad del agente, para conseguir ensayar la eficacia y seguridad de la inyección intravítrea de DHA en la retina humana. Nuestro estudio puede abrir las puertas a nuevas terapias para las degeneraciones retinianas.

6. Conclusiones

1. El diseño de nuestro estudio se ha basado en los estudios preclínicos de toxicidad de fármacos que preceden a los ensayos clínicos en humanos. Este diseño es idóneo para la determinación de la seguridad de una sustancia no utilizada previamente por vía intravítrea, en nuestro caso el DHA puro en dosis única.

2. La inyección intravítrea *per se* por vía pars plana no provoca alteraciones macroscópicas o microscópicas a nivel ocular, siendo una técnica habitual en la práctica clínica actual con beneficios claros respecto a la vía sistémica. En nuestro caso ha sido una técnica segura sin complicaciones asociadas.

3. En la **primera fase** de nuestro trabajo se utilizaron concentraciones altas de DHA preparadas para alcanzar la dosis máxima tolerada. En esta etapa se produjo una uveítis anterior no infecciosa leve-moderada en relación proporcional a la dosis inoculada en cada uno de los conejos tras la inyección intravítrea (concentraciones de 2'5mg/l, 5mg y 10mg de DHA puro). Sin embargo ninguna de ellas provocó cambios retinianos significativos desde el

Conclusiones

punto de vista funcional en el ERG o histológico (cualitativos o cuantitativos). Estas concentraciones de DHA: **2,5 mg/50 μ l**, **5mg/50 μ l** y **10mg/50 μ l** mostraron ser **clínicamente inseguras** en relación a la dosis-efecto.

4. En la **segunda fase** la concentración de **50 μ g/50 μ l** de DHA provocó cambios histológicos retinianos, expresados como una disminución del espesor total de la retina con afectación del grosor de la CPE y el complejo formado por la CNE y los segmentos internos y externos de los fotorreceptores, por lo que esta dosis se consideró **insegura** desde el punto de vista **histológico**.

5. Las restantes concentraciones ensayadas durante la **segunda fase**, **5 μ g/50 μ l** y **25 μ g/50 μ l** de DHA puro, no produjeron anomalías clínicas, funcionales en el ERG ni histológicas morfológicas ni morfométricas. Tampoco se produjeron alteraciones del comportamiento ni en el nivel de ingesta o actividad de los animales, siendo consideradas por tanto **seguras** para inoculación intravítrea en el modelo de conejo albino desde el punto de vista clínico, funcional e histológico.

6. La **dosis máxima tolerada** fue de 25 μ g en dosis única en inyección intravítrea, lo que corresponde a una dosis de 0'05ml de DHA con una concentración de 25 μ g/50 μ l.

7. El **rango de dosis** que demostró ser seguro en nuestro estudio fue de 5 a 25 μ g en dosis única lo que se corresponde a la inyección de 0'05ml de DHA puro con unas concentraciones de entre 5 μ g/50 μ L y 25 μ g/50 μ L.

8. La cuantificación de la concentración de DHA en vítreo una semana después de la inyección demostró una correlación estadísticamente significativa entre la dosis de DHA administrada y los niveles de DHA en vítreo, actuando el vítreo como posible reservorio de este ácido graso.

9. Las principales limitaciones de nuestro estudio derivan de su naturaleza preclínica o preliminar. Entre ellas cabe destacar el pequeño tamaño muestral y el corto periodo de seguimiento, así como la ausencia de determinación de la absorción retiniana de DHA administrado por vía intravítrea.

Conclusiones

10. Nuevos estudios deberán ser realizados para determinar la seguridad de la administración intravítrea de DHA puro en humanos así como su posible eficacia en el tratamiento en monoterapia o como coadyuvante de diversas patologías retinianas.

7. Bibliografía

- Ackman RG. Nutritional composition of fats in seafoods. *Prog. Food Nutr. Sci.* 1989; 13: 161-241.
- Agarwal A, Allamaneni SS. Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc.* 2011 Mar;109(3):184-7.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1417-36.
- Albini TA, Abd-El-Barr MM, Carvounis PE, Iyer MN, Lakhanpal RR, Pennesi ME, Chevez-Barrios P, Wu SM, Holz ER. Long-term retinal toxicity of intravitreal commercially available preserved triamcinolone acetonide (Kenalog) in rabbit eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jan;48(1):390-5.
- Ames BN. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 1986; 206:3-32.

Bibliografía

- Anderson RE, Maude MB, McClellan M, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334ter rhodopsin mutations. *Mol Vis.* 2002;8:351–358.
- Antonopoulos C, Stem M, Comer GM. Acute anterior uveitis following intravitreal bevacizumab but not subsequent ranibizumab. *Clin Ophthalmol.* 2011;5:1659-62. Epub 2011 Nov 24.
- Arden GB. Alterations in the standing potential of the eye associated with retinal disease. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 1962;82:63-72.
- Avelano MI, Bazan NG. Fatty acid composition and level of diacylglycerols and phosphoglycerides in brain and retina. *Biochim Biophys Acta.* 1973;296:1–9.
- Baillie, RA, Jump RD, Clarke SD. Specific effects of polyunsaturated fatty acids on gene expression. *Curr Opin Lipidol*, 1996. 7(1): p. 53-5.

- Bang HO, Dyerberg J, Hj orne N. The composition of food consumed by Greenland eskimos. *Acta Med Scand* 1976; 200:69-73
- Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in northwestern Greenland. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1980; 33,2657- 2661.
- Bang HO, Dyerberg J. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic westcoast Eskimos. *Acta Med Scand*. 1972; 192, 85-94.
- Barishak RY, Ofri R. Embryogenetics gene control of the embryogenesis of the eye. *Veterinary Ophthalmol* 2007; 10:133-136.
- Barja G. Ascorbic acid and aging. In: Harris JR cd. *Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*. New York: Plenum Press. 1996: Vol. 25: 157-188.
- Bazan NG, Colangelo V, Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002; Aug;68-69:197-210.

Bibliografía

- Bazan NG, Gordon WC, Rodriguez de Turco EB. Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992; 318:295–306. [PubMed: 1386177]
- Bazan NG, Molina MF, Gordon WC. Docosahexaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu Rev Nutr.* 2011 Aug 21;31:321-51.
- Bazan NG, Rodriguez de Turco EB, Gordon WC. Docosahexaenoic acid and phospholipid metabolism in photoreceptor cells and in retinal degeneration. In: Anderson RE, Hollyfield JG, LaVail MM, eds. *Retinal Degenerations*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991:151–165.
- Bazan NG, Scott BL, Reddy TS, Pelias MZ. Decreased content of docosahexaenoate and arachidonate in plasma phospholipids in Usher's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;141:

600 – 604.

- Bazan NG. Homeostatic regulation of photoreceptor cell integrity: significance of the potent mediator neuroprotectin D1 biosynthesized from docosahexaenoic acid: the Proctor Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48:4866–81.
- Bazan, NG, Birkle, DL, Reddy, TS. Biochemical and nutritional aspects of the metabolism of polyunsaturated fatty acids and phospholipids in experimental models of retinal degeneration. In: LaVail, MM.; Hollyfield, JG.; Anderson, RE., editors. *Retinal Degeneration: Experimental and Clinical Studies*. Liss; New York: 1985. p. 159-87.
- Beatty S, Kon HH, Henson D, Boulton M. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age- Related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; 45:115–134.
- Berson EL. Nutrition and retinal degenerations. *Int Ophthalmol Clin* 2000; 40: 93-111.
- Bhatnagar P, Spaide RF, Takahashi BS, Peragallo JH, Freund KB, Klancnik JM Jr, Cooney MJ, Slakter JS, Sorenson JA, Yannuzzi LA:

Bibliografía

- Ranibizumab for treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Retina* 2007;27:846– 850.
- Bian K, Doursout MF, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2008 Apr;10(4):304-10.
 - Bilgihan A, Bilgihan K, Toklu Y, Konuk O, Yis O, Hasanreisoglu B. Ascorbic acid levels in human tears after photorefractive keratectomy, transepithelial photorefractive keratectomy, and laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001; 27(4):585-8
 - Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 2008;57:1509e17.
 - Bogl LH, Maranghi M, Rissanen A, Kaprio J, Taskinen MR, Pietiläinen KH. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid intake is related to a protective high-density lipoprotein

- subspecies profile independent of genetic effects: a monozygotic twin pair study. *Atherosclerosis*. 2011 Dec;219(2):880-6.
- Bourges JL, Gautier SE, Delie F, Bejjani RA, Jeanny JC, Gurny R, Ben Ezra D, Behar-Cohen FF: Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3562–3569.
 - Brigell M, Bach M, Barber C, Kawasaki K, Kooijman A. Guidelines for calibration of stimulus and recording parameters used in clinical electrophysiology of vision. *Doc Ophthalmol*. 1998; 95: 1-14.
 - Cadenas E, Sies H. The lag phase. *Free Radic Res* 1998; 28: 601-9.
 - Calder PC. Fatty acid metabolism and eicosanoid synthesis. *Clinical Nutrition*. 2001; 20, Suppl. 4, 1-5.
 - Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Gutierrez-Mariscal FM, Lora-Aguilar P, Rodriguez-Cantalejo F, Fuentes-Jimenez F, Tinahones FJ, Malagon MM, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the

Bibliografía

- Mediterranean diet in elderly people. *Br J Nutr.* 2012 Aug;108(3):500-8
- Caputo G, Décollements de rétine, Rapport 2011 Société Française d'Ophtalmologie.
 - Cardoso HD, Passos PP, Lagranha CJ, Ferraz AC, Santos Júnior EF, Oliveira RS, Oliveira PE, Santos Rde C, Santana DF, Borba JM, Rocha-de-Melo AP, Guedes RC, Navarro DM, Santos GK, Borner R, Picanço-Diniz CW, Beltrão EI, Silva JF, Rodrigues MC, Andrade da Costa BL. Differential vulnerability of substantia nigra and corpus striatum to oxidative insult induced by reduced dietary levels of essential fatty acids. *Front Hum Neurosci.* 2012;6:249.
 - Cellini M, Caramazza N, Mangiafico P, Possati GL, Caramazza R. Fatty acid use in glaucomatous optic neuropathy treatment. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 1998; (227):41-
 - Chalupa LM. Introduction: Development and organization of the retina: Cellular, molecular and functional perspectives. *Seminars in Cell & Developmental Biology* Vol 9, Issue 3 1998; pp 239-240.

- Chen EI. Mitochondrial dysfunction and cancer metastasis. *J Bioenerg Biomembr.* 2012 Aug 15.
- Clarke, S.D., Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr*, 2001. 131(4): p. 1129-32.
- Comporti M. Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest.* 1985 Dec;53(6):599-623.
- Cook CS, Sulik KK, Wright KW: Embryology. In Wright KW [ed]: *Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, pp 3–43. St Louis: Mosby, 1995.
- Crabb JW, Miyagi M, Gu X, Shadrach K, West KA, Sakaguchi H, Kamei M, Hasan A, Yan L, Rayborn ME, Salomon RG, Hollyfield JG. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:14682–14687.
- Crafoord S, Andreasson S, Ghosh F. Experimental vitreous tamponade using polyalkylimide hydrogel. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011 Aug;249(8):1167-74.

Bibliografía

- Creuzet S, Vincent Ch, Couly G. Neural crest derivatives in ocular and periocular structures. *Int J Dev Biol* 2005; 49:161-171.
- Declaration of Helsinki: texto extraído en formato electrónico desde la web:
<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>
- Doria E, Buonocore D, Focarelli A, Marzatico F. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:830257. Epub 2012 May 17.
- Elkan AC, Anania C, Gustafsson T, Jogestrand T, Hafström I, Frostegård J. Diet and fatty acid pattern among patients with SLE: associations with disease activity, blood lipids and atherosclerosis. *Lupus*. 2012;21(13):1405-11.
- España E, Diaz-Llopis M. Retinitis por citomegalovirus. Inyecciones intravítreas. En: *Sida en Oftalmología*. Ponencia Oficial de la SEO, Prof. Manuel Diaz Llopis.1996

- Etchevers HC, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. Anterior cephalic neural crest is required for forebrain viability. *Development* 1999; 126:3533-3543.
- Fiore T, Iaccheri B, Pietrolucci F, Giansanti F, Cavaliere A, Coltella R, Mameli MG, Androudi S, Brazitikos P, Cagini C. Retinal toxicity of intravitreal genistein in a rabbit model. *Retina*. 2010 Oct;30(9):1536-41.
- Fraga CG, Shinegaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4533-7.
- Francis PJ, Marinescu A, Fitzke FW, Bird AC, Holder GE. Acute zonal occult outer retinopathy: towards a set of diagnostic criteria. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89:70-73.
- Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-6.
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978; 201: 875-880.

Bibliografía

- Friedman AH, Orellana J, Freeman WR, Luntz MH, Starr MB, Tapper ML, Spigland I, Rotterdam H, Mesa Tejada R, Braunhut S, Mildvan D, Mathur U: Cytomegalovirus retinitis: a manifestation of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Br J Ophthalmol* 1983;67:372–380.
- Fuhrmann S. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr Top Dev Biol* 2010; 93: 61-84.
- Fujitani Y, Fujitani S, Luo H, Qiu F, Burlison J, Long Q, Kawaguchi Y, Edlund H, MacDonald RJ, Furukawa T, Fujikado T, Magnuson MA, Xiang M, Wright CVE. Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development *Development* 2006; 133:4439-4450.
- Galbis-Estrada C, Pons-Vázquez S, Gallego-Pinazo R, Lleó-Perez A, Garcia-Medina JJ, Bou VV, Sanz-Solana P, Pinazo-Durán MD. Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (ADH3) and low km mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2). New evidence for differential expression in the rat retina in

response to oxidative stress. *Free Radic Res.* 2012 Jan;46(1):77-84.

- Gallego-Pinazo R, Caracterización bioquímica y morfológica de la retina y nervio óptico del ratón que sobreexpresa el gen tp53. Implicaciones en la etiopatogenia de enfermedades oculares mediadas por procesos de apoptosis y angiogénesis. Tesis Doctoral Universitat de Valencia, 2010.
- Gallego-Pinazo R, Pinazo-Durán MD, Serrano M. The cell cycle and gene p53. An approach to molecular ophthalmology. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2010 Jul;85(7):229-31.
- Gao H, Pennesi M, Shah K, Qiao X, Hariprasad SM, Mieler WF, Wu SM, Holz ER. Safety of intravitreal voriconazole: electroretinographic and histopathologic studies. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2003;101:183-9.
- Gao H, Pennesi ME, Qiao X, Iyer MN, Wu SM, Holz ER, Mieler WF. Intravitreal moxifloxacin: retinal safety study with electroretinography and histopathology in animal models. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Apr;47(4):1606-11.

Bibliografía

- García-Medina JJ. Estado oxidativo-metabólico y afectación retiniana en Diabetes Mellitus e Hipertensión arterial. Seguimiento a cinco años. Tesis Doctoral. 2005. Universidad de Valencia.
- Gawrisch, K, Eldho NV, Holte LL. The structure of DHA in phospholipid membranes. *Lipids*, 2003. 38(4): p. 445-52.
- Giansanti F, Ramazzotti M, Vannozzi L, Rapizzi E, Fiore T, Iaccheri B, Degl' Innocenti D, Moncini D, Menchini U. A pilot study on ocular safety of intravitreal infliximab in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008 Mar;49(3):1151-6.
- Gill I, Valivety R. Polyunsaturated fatty acids, Part 1: Occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol*, 1997. 15(10): p. 401-9.
- Gleissman H, Johnsen JI, Kogner P. Omega-3 fatty acids in cancer, the protectors of good and the killers of evil?. *Exp Cell Res*. 2010 May 1;316(8):1365-73.
- Gómez Candela C, Bermejo López LM, Loria Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the

maintenance of health: nutritional recommendations. *Nutr Hosp*. 2011 Mar-Apr;26(2):323-9.

- Gordon WC, Bazan NG. Visualization of [3H]docosahexaenoic acid trafficking through photoreceptors and retinal pigment epithelium by electron microscopic autoradiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:2402–2411.
- Gordon WC, Rodriguez de Turco EB, Bazan NG. Retinal pigment epithelial cells play a central role in the conservation of docosahexaenoic acid by photoreceptor cells after shedding and phagocytosis. *Curr Eye Res*. 1992;11:73– 83.
- Grammatikos, SI, Subbaiah PV, Victor TA, Miller WM. Diverse effects of essential (n-6 and n-3) fatty acids on cultured cells. *Cytotechnology*, 1994. 15(1-3): p. 31-50.
- Green WR. Retina. EN Spencer WH, ed *Ophthalmic Pathology: Atlas and textbook*. 4 vols. 4th Ed. Philadelphia: Saunders; 1996: vol 2, chap 8.
- Guillaume Tresset. The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophys*. 2009; 2: 3.

Bibliografía

- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41:1819-28.
- Hagedorn M, Mack AF, Evans B, Fernald RD. The embryogenesis of rod photoreceptors in the teleost fish retina, *Haplochromis burtoni*. Dev Brain Res. 1998 108:217-27.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. Lancet 1984; 1: 1396-7.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). 1990 Oxford University Press.
- Hayreh SS, Klugman MR, Podhajsky P, Kolder HE. Electroretinography in central retinal vein occlusion. Correlation of electroretinographic changes with papillary abnormalities. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1989; 227: 549-561.
- Heiligenhaus A, Koch JM, Kemper D, Kruse FE, Waubke TN. Therapy of dry eye disorders. Klin Monatsbl Augenheilkd 1994; 204:162-8

- Hettema EH, Tabak HF. Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1486(1):18-27.
- Hettema EH, van Roermund CW, Distel B, van den Berg M, Vilela C, Rodrigues-Pousada C, Wanders RJ, Tabak HF. The ABC transporter proteins pat1 and Pat 2 are required for import of long chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1996; 15(15):3813-22
- Hollenberg MJ, Spira AW: Early development of the human retina. *Can J Ophthalmol* 1972; 7: 472-491
- Holmes RS, van Oorschot RA, VandeBerg JL. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) isozymes in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): tissue and subcellular distribution and biochemical genetics of ALDH3. *Biochem Genet.* 1991 Apr;29(3-4):163-75.
- Horrobin DF, Campbell A. Sjogren's syndrome and the sicca syndrome: the role of prostaglandin E1 deficiency. *Treatment*

Bibliografía

- with essential fatty acids and vitamin C. *Medical Hypotheses* 1980; 6:225-232
- Ibrahim A, Mbodji K, Hassan A, Aziz M, Boukhattala N, Coeffier M, Savoye G, Dechelotte P, Marion-Letellier R. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clinical Nutrition* 30 (2011) 678e687) (
 - Ikeda H, Franchi A, Turnen G, Shilling J, Graham E. Electroretinography and electro-oculography to localize abnormalities in early-stage inflammatory eye disease. *Doc Ophthalmol* 1989; 73: 387-394.
 - Izzoti A, Bagnis A, Sacca SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res* 2006; 612: 105-14.
 - Jeffrey BG, Weisinger HS, Neuringer M, Mitchell DC. The role of docosahexaenoic acid in retinal function. *Lipids* 2001; 36(9):859-71
 - Jump, DB. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr Opin Lipidol*, 2002. 13(2): p. 155-64.

- Kaufman PL, ALm A. Adler's Physiology of the eye. 10th ed. St Louis: Mosby; 2003.
- Kaye SB, Harding SP. Early electroretinography in unilateral central retinal vein occlusion as a predictor of rubeosis iridis. Arch Ophthalmol. 1988; 106: 353-356.
- Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu, Zn, Superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. Proc Nall Acad Sci USA 1991; 88: 7381- 5.
- Kinsella, J. Eicosanoid metabolism: General background and overview. En «Seafoods and fish oils in human health and disease. Edit Dekker M. Inc. 1987; pp. 25-40.
- Koletzko B, Agostoni C, Carlson SE, Clandinin T, Hornstra G, Neuringer M, Uauy R, Yamashiro Y, Willatts P. Long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) and perinatal development. Acta Paediatr 2001; 90(4):460-4

Bibliografía

- Kondo M, Miyake Y, Horiguchi M, Suzuki S, Tanikawa A. Clinical evaluation of multifocal electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 2146-2150.
- Koskela TK, Reiss GR, Brubaker RF. Is the high concentration of ascorbic acid in the eye an adaptation to intense solar radiation? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:2265-7.
- Kowluru RA. Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7 :1581-7.
- Krauss GL, Jonson MA, Millar NR. Vigabatrin-associated retinal cone system dysfunction. *Neurology* 1998; 50: 614-618.
- Kretschmann U, Bock M, Gockeln R, Zrenner E. Clinical applications of multifocal electroretinography. *Doc Ophthalmol* 2000; 100: 99-113.
- Krinsky NL. Actions of carotenoids in biological systems. *Anon Rev Nutr* 1993;13: 561-87.
- Kumar H, Lim HW, More SV, Kim BW, Koppula S, Kim IS, Choi DK. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's

- disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):10478-504. Epub 2012 Aug 21.
- Kuzniarz M, Mitchell P, Cumming RG, Flood VM. Use of vitamin supplements and cataract: the Blue Mountains Eye Study. *Am J Ophthalmol* 2001; 132: 19-26.
 - Lee IT, Yang CM. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol.* 2012 Sep 1;84(5):581-90
 - Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res.* 1986;27:114---20.
 - Li J, Tso MO, Lam TT. Reduced amplitude and delayed latency in foveal response of multifocal electroretinogram in early age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85: 287-290.
 - Lin DS, Anderson GJ, Connor WE, Neuringer M. Effect of dietary N-3 fatty acids upon the phospholipid molecular species of the monkey retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35(3):794-803

Bibliografía

- Marmor MF, Hood DC, Keating D, Kondo M, Seeliger M, Miyake Y et al. Guidelines for basic multifocal electroretinography (mfERG). *Doc Ophthalmol* 2003; 106: 105-115.
- Marmor MF, Wolfensberger TJ (eds). *The retinal pigment epithelium: function and disease*. New York: Oxford University Press; 1998
- Marmor MF. Standardization notice: EOG standard reapproved. *Doc Ophthalmol*. 1998; 95: 91-92.
- Maude MB, Anderson EO, Anderson RE. Polyunsaturated fatty acids are lower in blood lipids of Usher's type I but not Usher's type II. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998 Oct;39(11):2164-6.
- Mayer J. Use of behavior analysis to recognize pain in small mammals. *Lab Anim (NY)*. 2007 Jun;36(6):43-8.
- Mayer, J. Use of behavior analysis to recognize pain in small mammals. *Lab. Animal* 36, 43-48, 2007.
- McColl AJ, Converse CA. Lipid studies in retinitis pigmentosa. *Prog Lipid Res*. 1995;34:1-16.

- McCulley JP, Shine W. A compositional based model for the tear film lipid layer. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1997; 95:79-88; discussion 88-89
- Meier S. The distribution of cranial neural crest cells during ocular morphogenesis. *Prog Clin Biol Res* 1982; 82:1-15.
- Miyauchi O, Mizota A, Adachi-Usami E, Nishikawa M. Protective effect of docosahexaenoic acid against retinal ischemic injury: an electroretinographic study. *Ophthalmic Res* 2001; 33(4):191-5
- Mori TA, Puddey IB, Burke V, Croft KD, Dunstan DW, Rivera JH, Beilin LJ. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in humans: GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion. *Redox Rep* 2000; 5(1):45-6
- Morin C, Fortin S, Cantin AM, Rousseau E. Docosahexaenoic acid derivative prevents inflammation and hyperreactivity in lung: implication of PKC-Potentiated inhibitory protein for heterotrimeric myosin light chain phosphatase of 17 kD in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011 Aug;45(2):366-75. Epub 2010 Nov 5.

Bibliografía

- Mozayan A, Farah S. Acute Anterior Uveitis Following Intravitreal Injection of Bevacizumab. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2012 Aug 30;1-4
- Murayama K, Yoneya S, Miyauchi O, Adachi-Usami E, Nishikawa M. Fish oil (polyunsaturated fatty acid) prevents ischemic-induced injury in the mammalian retina. *Exp Eye Res*. 2002 Jun;74(6):671-6.
- Nakai K, Yoneda K, Kubota Y. Oxidative stress in allergic and irritant dermatitis: from basic research to clinical management. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2012 Sep 1;6(3):202-9.
- National Centre for replacement, refinement and reduction of animals in research. NC3Rs. Guidance on dose level selection for regulatory general toxicology studies for pharmaceuticals. December 2009. Extraído de www.nc3rs.org.uk
- Neubauer AS, Samari-Kermani K, Schaller U, Welge-Lubetaen U, Rudolph G, Berninger T. Detecting chloroquine retinopathy: electro-oculogram versus colour vision. *Br J Ophthalmol*. 2003; 87: 902-908.

- Nozue T, Yamamoto S, Tohyama S, Fukui K, Umezawa S, Onishi Y, Kunishima T, Sato A, Nozato T, Miyake S, Takeyama Y, Morino Y, Yamauchi T, Muramatsu T, Hibi K, Terashima M, Michishita I. Effects of Serum n-3 to n-6 Polyunsaturated Fatty Acids Ratios on Coronary Atherosclerosis in Statin-Treated Patients With Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol.* 2012 Oct 2. pii: S0002-9149(12)02055-3.
- Ohn YH, Katsumi O, Kruger-Leite E, Larson EW, Hirose T. Electrooculogram in central retinal vein obstruction. *Ophthalmologica.* 1991; 203: 189-195.
- Ollivier FJ, Samuelson DA, Brooks DE, Lewis PA, Kallberg ME, Komáromy AM. Comparative morphology of the tapetum lucidum (among selected species). *Vet Ophthalmol* 2004;7:11-22.
- Organisciak DT, Darrow RM, Jiang YL, Blanks JC. Retinal light damage in rats with altered levels of rod outer segment docosahexaenoate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996 Oct;37(11):2243-57.

Bibliografía

- Osgood JK, Dougherty JM, McCulley JP. The role of wax and sterol esters of meibomian secretions in chronic blepharitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30(9):1958-61
- Papakostopoulos D, Bloom PA, Grey RH, Dean Hart JC. The electro-oculogram in central retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol*. 1992; 76: 515-519.
- Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, Dib E, Fiod Costa E, Furlani BA, Nunes Moraes Filho M, Dreyfuss JL, Bottós J, Farah ME. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals--part I: animal models and toxicity assays. *Ophthalmic Res*. 2010;44(2):82-104. Epub 2010 May 13.
- Penha FM, Rodrigues EB, Maia M, Furlani BA, Regatieri C, Melo GB, Magalhães O Jr, Manzano R, Farah ME. Retinal and ocular toxicity in ocular application of drugs and chemicals--part II: retinal toxicity of current and new drugs. *Ophthalmic Res*. 2010;44(4):205-24. Epub 2010 Aug 10.
- Penumetcha M, Song M, Merchant N, Parthasarathy S. Pretreatment with n-6 PUFA protects against subsequent high

fat diet induced atherosclerosis--potential role of oxidative stress-induced antioxidant defense. *Atherosclerosis*. 2012 Jan;220(1):53-8.

- Pereira de Almeida Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Kivilcim M, Chevez-Barrios P, Takahashi W. Testing intravitreal toxicity of rapamycin in rabbit eyes. *Arq Bras Oftalmol*. 2009 Jan-Feb;72(1):18-22.
- Peyman GA, Lad EM, Moshfeghi DM. Intravitreal injection of therapeutic agents. *Retina*. 2009 Jul-Aug;29(7):875-912.
- Pinazo-Duran MD, Boscá-Gomar L. Anti-inflammatory properties of polyunsaturated fatty acid omega 3. Indications in ophthalmology. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2012 Jul;87(7):203-5
- Pinazo-Duran MD, Verdejo C, Azorin C, Renal-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.

Bibliografía

- Pinazo-Duran 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.
- Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, García-Medina JJ, Gallego-Pinazo R. Evaluation of presumptive biomarkers of oxidative stress, immune response and apoptosis in primary open-angle glaucoma. Curr Opin Pharmacol.2012Nov8.doi:pii:S1471-4892(12)00203-2. 10.1016/j.coph.2012.10.007.
- Pinazo-Durán MD, Zanón-Moreno V, Vinuesa-Silva I. Implications of fatty acids in ocular health. Arch Soc Esp Oftalmol. 2008 Jul;83(7):401-4.
- Pons-Vázquez S, Gallego-Pinazo R, Galbis-Estrada C, Zanón-Moreno V, Garcia-Medina JJ, Vila-Bou V, Sanz-Solana P, Pinazo-Durán MD. Combined pre- and postnatal ethanol exposure in rats disturbs the myelination of optic axons. Alcohol Alcohol. 2011 Sep-Oct;46(5):514-22.

- Pons-Vázquez, S. Alteraciones en el desarrollo de la retina y el nervio óptico por exposición crónica a etanol en la rata. Tesis Doctoral Univeristat de Valencia. 2011.
- Querques G, Forte R, Souied EH. Retina and omega-3. *J Nutr Metab.* 2011;2011:748361.
- Ramón y Cajal S. "La rétine des vertébrés", en *La Cellule*, Tomo IX, primer fascículo 1892.
- Ratledge, C. Single cell oils--have they a biotechnological future? *Trends Biotechnol*, 1993. 11(7): 278-84.
- Ravandi A, Kuksis A, Myher JJ, Marai L. Determination of lipid ester ozonides and core aldehydes by high-performance liquid chromatography with on-line mass spectrometry. *J Biochem Biophys Methods.* 1995 Nov;30(4):271-85.
- Richer S, Stiles W, Statkute L, Pulido J, Frankowski J, Rudy D, et al. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST

Bibliografía

- study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry*, 2004; 75: 216-30.
- Rodriguez de Turco EB, Gordon WC, Bazan NG. Docosahexaenoic acid is taken up by the inner segment of frog photoreceptors leading to an active synthesis of docosahexaenoyl-inositol lipids: similarities in metabolism in vivo and in vitro. *Curr Eye Res*. 1994;13:21–28.
 - Rosolen SG, Rigaudière F, Le Gargasson JF, Brigell MG. Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Doc Ophthalmol*. 2005 Jan;110(1):57-66.
 - Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362:801-9.
 - Roth RN, Weiss LD. Hyperbaric oxygen and wound healing. *Clin Dermatol* 1994; 12: 141-56.
 - Rotstein NP, Aveldano MI, Barrantes FJ, Politi LE. Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors in vitro. *J Neurochem*. 1996;66:1851–1859.

- Salter AM. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Animal*. 2011 Nov 11:1-9.
- SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res*. 2005 Jan;24(1):87-138.
- Scott BL, Bazan NG. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:2903–2907.
- Shinto L, Marracci G, Bumgarner L, Yadav V. The effects of omega-3 Fatty acids on matrix metalloproteinase-9 production and cell migration in human immune cells: implications for multiple sclerosis. *Autoimmune Dis*. 2011;134592.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*. 2002 Dec;21(6):495-505.
- Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids, the brain and retina. Preface. *World Rev Nutr Diet*. 2009;99:VII-XII.

Bibliografía

- Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56, 365-379.
- Simopoulos, AP., Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*, 1991. 54(3): p. 438-63.
- Sinha M, Bhowmick P, Banerjee A, Chakrabarti S. Antioxidant role of amyloid β protein in cell-free and biological systems: implication for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2012 Oct 3.
- Smith W, Mitchell P, Leeder SR. Dietary fat and fish intake and age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(3):401-4
- Spaide RF; Miller-Rivero NE. Anatomy. En Spaide DF, ed. *Diseases of the retina and vitreous.* Philadelphia: Saunders; 1999.
- Spalton DJ et al, *Atlas of Clinical Ophthalmology.* 3rd Edition. 2005 Ed. Elsevier.

- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257:1220-4.
- Strandvik B. The omega-6/omega-3 ratio is of importance! *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2011 Dec;85(6):405-6.
- Sultana R, Perluigi M, Allan Butterfield D. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med*. 2012 Oct 5.
- Sutter EE, Tran D. The field topography of ERG components in man. The photopic luminance response. *Vis Res* 1992; 32: 433-446.
- Thornton P, McColl BW, Cooper L, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 drives cerebrovascular inflammation via MAP kinase-independent pathways. *Curr Neurovasc Res* 2010;7:330e40).
- Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadl A, et al. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n 3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia* 2006;49:2109e19) (

Bibliografía

- Tran B, Oliver S, Rosa J, Galassetti P. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:683680.
- Universidad de Zaragoza. Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal. Evaluación del dolor en el conejo, 2007.
- Verbey NL, van Haeringen NJ.. The influence of fish oil dietary supplement on immunogenic keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31(8):1526-32
- Vinson JA. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006; 13:151-62.
- Viridis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens.* 2011;2011:916310.
- Wang JY, Saito M. Dietary supplementation of n-3 fatty acids and hydroperoxide levels in rat retinas. *Free Radic Res* 2001;35(4):367-75

- Weise C, Heunemann C, Loddenkemper C, Herz U, van Tol EA, Worm M. Dietary docosahexaenoic acid in combination with arachidonic acid ameliorates allergen-induced dermatitis in mice. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011 Aug;22(5):497-504.
- Willbold E, Reinicke M, Lance-Jones C, Lagenaur C, Lemmon V, Layer PG. Müller Glia Stabilizes Cell Columns During Retinal Development: Lateral Cell Migration but not Neuropil Growth is Inhibited in Mixed Chick-Quail Retinospheroids *Eur J Neurosci* 1996; 7:2277-2284.
- Williams RW, Borodkin M, Rakic P. Growth Cone Distribution Patterns in the Optic Nerve of Fetal Monkeys: Implications for Mechanisms of Axon Guidance. *J Neurosci* 1991; 11:1081–1094.
- Winyard PG, Ryan B, Eggleton P, Nissim A, Taylor E, Lo Faro ML, Burkholz T, Szabó-Taylor KE, Fox B, Viner N, Haigh RC, Benjamin N, Jones AM, Whiteman M. Measurement and meaning of markers of reactive species of oxygen, nitrogen and sulfur in healthy human subjects and patients with inflammatory joint disease. *Biochem Soc Trans*. 2011 Oct;39(5):1226-32.

Bibliografía

- Yongmanitchai W, Ward OP. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1991. 57(2): 419-25.
- Zaghoul NA, Yan B, Moody SA. Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis. *Biol Cell* 2005; 97:321–337.
- Zanon-Moreno V, Melo P, Mendes-Pinto MM, Alves CJ, Garcia-Medina JJ, Vinuesa-Silva I, Moreno-Nadal MA, Pinazo-Duran MD. Serotonin levels in aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma. *Mol Vis*. 2008;14:2143-7.
- Zayit-Soudry S, Zemel E, Loewenstein A, Perlman I. Safety evaluation of repeated intravitreal injections of bevacizumab and ranibizumab in rabbit eyes. *Retina*. 2010 Apr;30(4):671-81.
- Ziche M, Donnini S, Morbidelli L: Development of new drugs in angiogenesis. *Curr Drug Targets* 2004;5:485–493.
- Zygar CA, Cook TL, Grainger RM Jr. Gene activation during early stages of lens induction in *Xenopus*. *Development*. 1998 Sep;125(17):3509-19.

ANEXO I.

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

D. Enrique Font Bisier, Profesor Titular de Zoología y Secretario del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universitat de València el día 13 de febrero de 2012, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal A1328549720767 titulado “Evaluación de la Seguridad retiniana preclínica sobre la administración intravítrea de ácido docosahexaenoico (DHA). Evaluación en modelo experimental en conejo”, cuya investigadora principal es Dña. Maria Dolores Pinazo Durán.

En Valencia, a 5 de marzo de 2012.



A handwritten signature in blue ink that reads 'Enrique Font Bisier'.