

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

IDIOMA ORIGINAL: INGLÉS

IDIOMA DE LA TRADUCCIÓN: CASTELLANO

Título original: Biophysical properties of aqueous humour in ocular pathologies.

Título traducido: Propiedades biofísicas del humor acuoso en diferentes patologías oculares.

Autor: Javier Cabrerizo^{1,2,4}

Directores: Elena Vecino^{3,4}, Aritz Urcola^{1,2,4}

1 Department of Ophthalmology, University Hospital of Alava, Spain

2 Green Eye Project, Research, Spain

3 Department of Cell Biology and Histology, University of the Basque Country, UPV/EHU, Spain

**4 Experimental Ophthalmo-Biology Group, (GOBE), University of the Basque Country, (UPV/EHU),
Spain**

LISTA DE ABREVIATURAS

Humor acuoso	AH
Distrofia endotelial de Fuchs	DEF
Esclerotoma profunda no perforante	EPNP
Glaucoma de ángulo abierto	GAA
Tensión superficial	TS
Queratolpastia endotelial de membrana de Descemet	DMEK

1. INTRODUCCIÓN

El limbo corneoescleral contiene estructuras diseñadas para evacuar el humor acuoso desde la cámara anterior del ojo hacia la circulación general. Estos elementos se encuentran entre el espolón escleral y la línea de Schwalbe que finalmente se continua con la membrana de Descemet del endotelio corneal. Su composición consta de tejido corneal, escleral, iridiano y del cuerpo ciliar; constituyendo elementos estructurales claves en el drenaje del humor acuoso como son: el canal de Schlemm, los canales colectores y la malla trabecular, y en ella sus tres regiones: uveal, corneoescleral y yuxtacanalicular.

El canal Schlemm es un canal venoso circular de 36 μm de circunferencia y 350-500 μm de diámetro en su luz interna. La superficie de la luz está tapizada por células endoteliales que están unidas entre sí por uniones zonula occludens. En la pared interna del canal, a lo largo de su trayecto sinuoso, encontramos vesículas citoplasmáticas o vacuolas de grandes dimensiones de origen pinocítico que pueden llegar a medir 14 μm con aperturas puntuales hacia la luz del canal de 0.3 – 2.0 μm postulándose que pueda ser un drenaje directo desde los espacios trabeculares hacia el canal de Schlemm.

Existe controversia con respecto al hallazgo de poros inter y transcelulares en la pared interna del canal de Schlemm; puesto que algunos autores que analizan mediante microscopía electrónica de barrido la monocapa endotelial sostienen que su número aumenta con la elevación de la presión; otros, concluyen que su número se reduce en los ojos glaucomatosos.

Donde sí parecen estar de acuerdo las últimas publicaciones es en destacar el dinamismo de este sistema de drenaje, y postulan que los cambios encontrados en su ultraestructura pudieran hablarnos a favor de un sistema sensible y cambiante con los cambios de presión intraocular.

En física se denomina tensión superficial de un líquido a la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área. Las fuerzas intermoleculares en los líquidos, junto con las fuerzas existentes entre distintas superficies dan lugar a esta resistencia y condicionan la capacidad de capilaridad del líquido al contactar con una superficie sólida. Las fuerzas que afectan a cada molécula son diferentes en el interior del líquido y en la superficie. Así en el seno de un líquido cada molécula está sometida a fuerzas de

atracción que en promedio se anulan, permitiendo tener una energía bastante baja pero en la superficie existe una fuerza neta hacia el interior.

Los agentes surfactantes al colocarse en la interfase entre dos sistemas actúan disminuyendo la tensión superficial y facilitando así la continuidad entre los mismos. Las moléculas más conocidas en este campo son los fosfolípidos y actúan como agentes anfipáticos al constar de una parte hidrófila y otra hidrófoba. Su acción es clave en la superficie alveolar evitando la atelectasia alveolar en la fase final de la espiración, y por el contrario su deficiencia precipita en Síndrome de Distress respiratorio del lactante.

La malla trabecular y el tejido conectivo yuxtacanalicular contiene matriz extracelular y es conocido que la composición de glucosaminoglicanos y ácido hialurónico en esta estructura está alterada en el glaucoma. La disminución del contenido en ácido hialurónico tanto en la malla trabecular como en tejido yuxtacanalicular puede dificultar la capacidad de drenaje del humor acuoso al elevarse su tensión superficial, incrementándose así las uniones intercelulares en la capa endotelial y finalmente colapsar los espacios trabeculares existentes en condiciones normales. Esto conlleva irremediablemente a la elevación de la presión intraocular; pero paradójicamente, puede elevarse también de forma mecánica tal y como se observa típicamente en la cirugía de la catarata tras la introducción de sustancias viscoelásticas compuestas de ácido hialurónico en cámara anterior que bloquean los espacios trabeculares. El desequilibrio en la proporción de glucosaminoglicanos mediante la inyección exógena de sustancias viscoelásticas o de condroitin sulfato en cámara anterior puede elevar significativamente la presión intraocular y permite desarrollar así un modelo de glaucoma experimental. El análisis proteómico de humor acuoso de pacientes con glaucoma mediante electroforésis ha demostrado diferencias cualitativas en su composición respecto a controles jugando un papel relevante en el glaucoma pseudoexfoliativo.

En el único estudio hasta la fecha que analizan la tensión superficial del humor acuoso se ha observado una disminución de la misma en los ojos afectados de glaucoma primario de ángulo abierto respecto a los ojos seleccionados como controles, siendo estos últimos los pacientes sometidos a cirugía de catarata. En este estudio la tensión superficial se analizó mediante la observación del tamaño y ángulo de contacto de una gota en suspensión siguiendo la técnica de Bashford-Adams. Desafortunadamente, al seleccionar un grupo de pacientes afectados de glaucoma excesivamente heterogéneo (tipos distintos de glaucoma y sometidos

previamente a diversos fármacos antiglaucomatosos) y errores en la metodología en el diseño del estudio (recogida de material, condiciones biofísicas durante la conservación y posterior análisis) los resultados son contradictorios y no concluyentes. De todos modos, se postula que el humor acuoso de los ojos afectados de glaucoma al tener una menor tensión superficial, esto pueda interferir negativamente en la formación de vacuolas en su vía de drenaje hacia el canal de Schlemm. Estos mismos autores animan a proseguir futuros trabajos en esta misma línea de investigación y enfocarse a su vez en el análisis y la composición lipídica del humor acuoso en el glaucoma, al ser otro de los puntos clave para la formación de vesículas pinocíticas y su posterior drenaje.

3. HIPÓTESIS

Cataratas, glaucoma y distrofia endotelial de Fuchs representan patologías muy comunes del segmento anterior del ojo. La necesidad potencial de un procedimiento quirúrgico las convierte en patologías adecuadas para la toma de muestras de humor acuoso sin comorbilidad añadida. La extracción intraoperatoria de 150 microlitros de humor acuoso a través de una paracentesis corneal durante el primer paso de una cirugía del segmento anterior representa un método reproducible, técnicamente factible y relativamente seguro para obtener muestras de humor acuoso en humanos.

Debido a la estrecha relación anatómica y fisiológica entre el humor acuoso y las estructuras de la cámara anterior, se espera encontrar diferencias en el perfil metabólico del humor acuoso. Las características metabólicas de estos cambios deben correlacionarse con la fisiopatología de las patologías subyacentes.

Variaciones cuantitativas y cualitativas en los metabolitos del humor acuoso pueden desencadenar cambios en las propiedades biofísicas, tales como la tensión superficial, con potencial relevancia clínica.

La hipótesis de esta Tesis Doctoral es la presencia de cambios en el perfil lipídico del humor acuoso que se correlacionan con cambios en la tensión superficial del fluido.

4. OBJETIVOS

Determinar las diferencias en la tensión superficial del humor acuoso relacionadas con diferentes patologías del segmento anterior .

Determinar las posibles diferencias en el perfil lipídico del humor acuoso relacionadas con diferentes patologías del segmento anterior .

Ofrecer una idea de la posible relación entre los cambios en la composición del humor acuoso y sus propiedades biofísicas y los procesos fisiopatológicos implicados en esas enfermedades .

5. MATERIAL Y MÉTODOS

202 muestras de HA fueron analizadas en el estudio. Pacientes con antecedentes de cirugía ocular u otra patología aguda del segmento anterior fueron excluidos del estudio. Cualquier medicación ocular tópica en los últimos seis meses anteriores al estudio fue monitorizada. Las muestras fueron tomadas en el primer gesto quirúrgico durante lensectomía electiva o implante de lente fáquica, cirugía de cataratas por facoemulsificación, EPNP y DMEK en controles (n=22), cataratas (n=56), glaucoma (n=81) y DEF (n=43), respectivamente. 150 microlitros fueron aspirados por una paracentesis al comienzo de cada acto quirúrgico. Las muestras fueron almacenadas en un banco de tejidos a -80 grados.

En 44 casos se realizó una gradación de la madurez de la catarata utilizando diferentes parámetros durante la facoemulsificación: tiempo total de faco, tiempo de faco longitudinal, tiempo de faco torsional y energía acumulada. Diferentes tipos de glaucoma fueron categorizados: ángulo abierto (n=55), ángulo estrecho (n=7), pseudoexfoliativo (n=8), pigmentario (n=2), neovascular (n=1), corticoideo (n=1), uveítico (n=6) y miópico (n=1).

El diagnóstico de la DEF se realizó mediante exploración en lámpara de hendidura, análisis por microscopía endotelial y paquimetría corneal. El grado de afectación fue determinado por la confluencia y área de las gutas y la presencia de edema total o estromal posterior.

El análisis de tensión superficial se realizó con un tensiómetro óptico mediante la técnica de gota oscilante. Una cámara de alta resolución realiza una foto de una gota de HA en el momento de equilibrio energético. Aplicando un análisis matemático sobre el contorno de la gota el sistema es capaz de inferir la TS del fluido.

Complementariamente, se realizó un análisis del perfil lipídico de 30 muestras, 10 controles, 10 GAA y 10 DEF. Tras la extracción de los metabolitos, se utilizó espectrometría de masas para la caracterización y cuantificación de cada metabolito.

6. RESULTADOS

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la tensión superficial entre cataratas y controles y entre glaucomas y controles. La madurez de la catarata, medida por parámetros de facoemulsificación intraquirúrgicos, no demostró correlación con la tensión superficial. Se observó una tendencia entre ciertos tipos de glaucoma y variaciones de la TS.

Se encontró una disminución de la TS en DEF respecto a los controles. Estas diferencias demostraron significación estadística. No se encontraron cambios en relación a la edad y el género de la TS.

De manera complementaria, el estudio lipídico reveló diferencias de concentración estadísticamente significativas en 37 y 32 especies de lípidos en GAA y DEF respectivamente. Estas diferencias se encuentran en determinadas especies, ceramidas, fosfatidilcolinas y ésteres de colesterol.

7. DISCUSIÓN

Los cambios en el perfil lipídico del humor acuoso reflejan alteraciones metabólicas relacionadas con la relación fisiopatológica con determinadas enfermedades del segmento anterior del ojo. Determinar, cuantificar y establecer hipótesis de los mecanismos que desempeñan estos cambios, constituye el propósito de este trabajo.

Mínimos cambios en concentración de moléculas con poder surfactante, mayormente proteínas y compuestos lipídicos, pueden provocar cambios significativos en la TS. Esto establece la alta sensibilidad de

la TS como marcador de cambios de concentración de un fluido orgánico.

Asimismo, los cambios en el perfil lipídico observados en GAA y DEF corresponden con alteraciones derivadas del desbalance redox intracelular. El aumento de ceramidas y de la concentración de diferentes tipos de fosfolípidos y de ésteres de colesterol puede evidenciar un aumento del plegamiento durante la síntesis proteica, como respuesta a cambios oxidativos.

El estrés oxidativo parece estar implicado en la patogénesis de ambas patologías y además parece contribuir a su continuación una vez los cambios fisiopatológicos han sido instaurados. La implicación del estrés oxidativo en patologías de segmento anterior consta cada vez con mayor evidencia científica como respaldo.

En un contexto ideal, el análisis metabólico del HA podría dar información respecto a la susceptibilidad de sufrir determinadas patologías oculares, permitiendo cambios conductuales para modular su aparición.

8. CONCLUSIONES

1. La extracción intraoperatoria de 150 microlitros de humor acuoso a través de una paracentesis corneal es un aforma técnicamente factible y relativamente segura de obtener muestras de humor acuoso en humanos. El procedimiento requiere un marco logístico correcto, incluida la manipulación de muestras, transporte y almacenamiento, y siempre debe ir precedido de un consentimiento informado y de la aprobación de un comité de ética.

2. La concentración de 32 y 37 de los 110 lípidos cambia significativamente en la distrofia endotelial de Fuchs y en el glaucoma de ángulo abierto, respectivamente, en comparación con los controles. Estas diferencias se derivan principalmente de un aumento en esfingomielinas y ésteres de colesterol.

3. Las esfingomielinas y ésteres de colesterol están involucrados en la regulación metabólica de las respuestas de estrés oxidativo, y los cambios en su concentración pueden representar un marcador indirecto para el aumento de los niveles de estrés oxidativo relacionados con la patogénesis de estas

enfermedades.

4. Como resultado de los cambios en el perfil metabólico, la tensión superficial del humor acuoso en la distrofia endotelial de Fuchs es más bajo que en los controles.