

eman ta zabal zazu



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea

Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física
Kirurgia eta Erradiologia eta Medikuntza Fisikoa Saila

TESIS DOCTORAL

Modulación farmacológica del síndrome de isquemia-reperfusión retiniana en la rata

Juan San Cristóbal Epalza

Servicio de Oftalmología
Hospital Universitario Basurto

Mayo 2017

Agradecimientos

A todos aquellos que han hecho posible esta tesis:

A mi director de tesis, profesor y amigo Nacho García – Alonso, a quien debo gran parte de mi formación y sin quien esta tesis no hubiera sido posible.

A mi familia, por haberme inculcado el valor del esfuerzo y del trabajo.

A todo el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Eloy, en especial a Carla Valenti, quienes hicieron la ardua labor de procesar todas las muestras retinianas.

Indice

Introducción.....	1
Anatomía de la retina	3
Vascularización de la retina	8
Isquemia – Reperfusión	9
Isquemia en la retina.....	10
Neovascularización en la retina	11
Mecanismos neurológicos durante la isquemia retiniana	12
Neurotransmisores liberados durante la isquemia	13
Potenciales estrategias terapéuticas	19
Obstrucción de arteria central de la retina.....	25
Tipos de obstrucción de arteria central de la retina.....	26
Tratamiento de la obstrucción de la arteria central de la retina....	27
Fármacos en isquemia – reperfusión.....	29
Acido Fólico	29
Nitroindazol.....	31
Calmidazolio	31
Alopurinol.....	33
Trifluoperazina	34
Pravastatina	35
Hipótesis y objetivos	39
Hipótesis.....	41
Objetivo del estudio.....	41
Material y métodos.....	43

Animales de experimentación.....	45
Técnicas quirúrgicas	46
Anestesia	46
Inducción de isquemia.....	46
Eutanasia	48
Enucleación.....	48
Técnicas anatomopatológicas	49
Obtención de las retinas.....	49
Fijación en formol e inclusión en parafina	49
Tinción con hematoxilina – eosina	50
Valoración del daño retiniano	52
Existencia de “Daño Histológico”	52
Edema citoplásmico.....	52
Edema dendrítico	53
Tratamientos utilizados.....	53
Administración de los fármacos	53
Ácido Fólico	54
Nitroindazol	54
Calmidazolio	55
Alopurinol	55
Trifluoperazina.....	56
Pravastatina.....	56
Grupos experimentales	56
Experimentos preliminares.....	57
Series del estudio.....	58
Análisis estadístico.....	59

Resultados.....	61
1. Definición del modelo experimental.....	63
1.1. Determinación de la presión de oclusión de la arteria central de la retina	63
1.2. Ajuste de la técnica de infusión intraocular.....	64
1.3. Ajuste de la técnica de valoración del daño retiniano.....	65
2. Efecto de la isquemia-reperfusión sobre la retina.....	66
3. Comportamiento de la retina con los tratamientos	68
3.1. Tratamiento con ácido fólico	68
3.2. Tratamiento con alopurinol	69
3.3. Tratamiento con pravastatina.....	71
3.5. Tratamiento con trifluoperazina	72
3.6. Tratamiento con calmidazolio.....	73
3.7. Tratamiento con nitroindazol	75
4. Efecto de los fármacos sobre la retina.....	77
5. Efecto de los fármacos sobre el daño por reperfundión.....	79
Discusión	83
Situación inicial	85
Análisis de nuestro modelo experimental	85
Animal de experimentación	85
Análisis del modelo utilizado	86
Casos y controles	87
Sesgos.....	88
Evaluación del daño	88
Momento de la inoculación del fármaco	89

Análisis de los resultados y comparación con los obtenidos en otros estudios	89
Consideraciones en la práctica clínica	93
Conclusiones.....	95
Bibliografía.....	99

Indice de tablas

Tabla 1. Se detalla el proceso de inclusión en parafina	50
Tabla 2. Tinción con hematoxilina-eosina.....	51
Tabla 3. Parámetros histológicos estudiados.	53
Tabla 4. Detalle de la composición de los grupos experimentales	59
Tabla 5. Rango de tensión arterial sistólica en animales control.....	64
Tabla 6. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales control	67
Tabla 7. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con ácido fólico	69
Tabla 8. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con alopurinol	70
Tabla 9. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con pravastatina.....	72
Tabla 10. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con trifluoperazina	73
Tabla 11. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con calmidazolio.....	75
Tabla 12. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con nitroindazol	77
Tabla 13. Grado de daño (edema citoplásmico) en cada uno de los tratamientos.....	81

Indice de figuras

Figura 1. Histología de la retina.	5
Figura 2. Esquema anatómico de la retina.	7
Figura 3. Vascularización de la retina.	9
Figura 4. Fórmula del ácido pteroilglutámico (ácido Fólico).....	29
Figura 5. Fórmula del nitroindazol.	31
Figura 6. Fórmula del calmidazolio.	33
Figura 7. Fórmula del Alpurinol.....	34
Figura 8. Fórmula de la trifluoperazina.....	34
Figura 9. Fórmula de la pravastatina.	36
Figura 10. Catéter de linfografía introducido en la cámara anterior del ojo	47
Figura 11. Conjunto de equipamiento para la producción de la isquemia retiniana.	47
Figura 12. Sección histológica de una retina.....	50
Figura 13. Infusión de suero en la cámara anterior hasta alcanzar 150 mm Hg.....	65
Figura 14. Retina sometida a 60' de isquemia (izq) y retina normal (dcha).....	66
Figura 15. Edema citoplásmico en animales tratados con ácido fólico.....	68
Figura 16. Edema citoplásmico en retinas de animales tratados con alopurinol	70
Figura 17. Edema citoplásmico en retinas de animales tratados con pravastatina.....	71

Figura 18. Edema citoplásmico en animales tratados con trifluoperazina	72
Figura 19. Edema citoplásmico en animales tratados con calmidazolio.....	74
Figura 20. Edema citoplásmico en animales tratados con nitroindazol.....	76
Figura 21. Retinas no sometidas a isquemia y tratadas con Trifluoperazina (izquierda) o Fólico (derecha).	78
Figura 22. Efecto de los fármacos sobre la retina no sometida a isquemia.	79
Figura 23. Efecto de los fármacos sobre la retina sometida a isquemia.	80
Figura 24. Representación del grado de edema citoplásmico observado en las retinas isquémicas tratadas.	81
Figura 25. Efecto protector de la trifluoperazina sobre la retina de dos animales sometidos a isquemia y reperusión.	82

Introducción

Anatomía de la retina

La retina es un tejido nervioso que se encuentra en la parte interna de la pared posterior del globo ocular. Es el tejido encargado de recoger los estímulos luminosos procedentes del exterior y transmitir al cerebro la información que posteriormente este integrará formando una imagen¹.

Durante el desarrollo embriológico de los vertebrados, la retina y el nervio óptico aparecen como esbozos del encéfalo, por lo que la retina se considera una parte del sistema nervioso central, y es la única parte del mismo que se puede visualizar directamente¹.

La retina contiene diferentes tipos de células: epitelio pigmentario, células nerviosas y células de sostén.

El epitelio pigmentario es la capa más externa de la retina. Se encuentra adherida a la parte interna de la coroides a través de la membrana de Bruch, y está en íntimo contacto con la capa de fotorreceptores y se encarga del metabolismo de estos¹.

Dentro de las células nerviosas de la retina están los fotorreceptores, que son las células que se estimulan con la luz e inician la señal nerviosa que llegará al cerebro; las células bipolares, que transmiten dicha señal

nerviosa a través de la retina; las células ganglionares, desde donde se inicia la conducción por el nervio óptico; y las células amacrinas y horizontales, que son interneuronas moduladoras.

Por último, con funciones de soporte del tejido están los astrocitos y las células de Müller, que sintetizan glucógeno y ceden glucosa a las células nerviosas adyacentes¹.

Histológicamente, la retina se divide en 10 capas (figura 1):

- I. Epitelio pigmentario.
- II. Capa de segmentos externos e internos de células fotorreceptoras (conos y bastones).
- III. Capa limitante externa.
- IV. Capa nuclear o granular externa. Formada por los núcleos de los fotorreceptores.
- V. Capa plexiforme externa. Consiste fundamentalmente en los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares con las que sinaptan.
- VI. Capa nuclear o granular interna. Contiene los núcleos de las células bipolares, y también células horizontales, células amacrinas, núcleos de las fibras de Müller y capilares.
- VII. Capa plexiforme interna. Son las sinapsis de los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares. También consta de procesos distales de las células amacrinas, fibras de Müller y ramas de los vasos retinianos.
- VIII. Capa de células ganglionares. Contiene principalmente los núcleos de las células ganglionares, además de fibras de Müller, neuroglía y ramas de los vasos retinianos.
- IX. Capa de fibras del nervio óptico. Formada por los axones desmielinizados de las células ganglionares, acompañadas de fibras de Müller, neuroglía y vasos retinianos. Dichos axones se agrupan en haces que discurren paralelos a la superficie de la retina y se dirigen hacia la lámina cribosa para atravesarla y formar el nervio óptico.

- X. Capa limitante interna. Se trata de una membrana hialoidea que conforma el límite de la retina y la separa del vítreo.

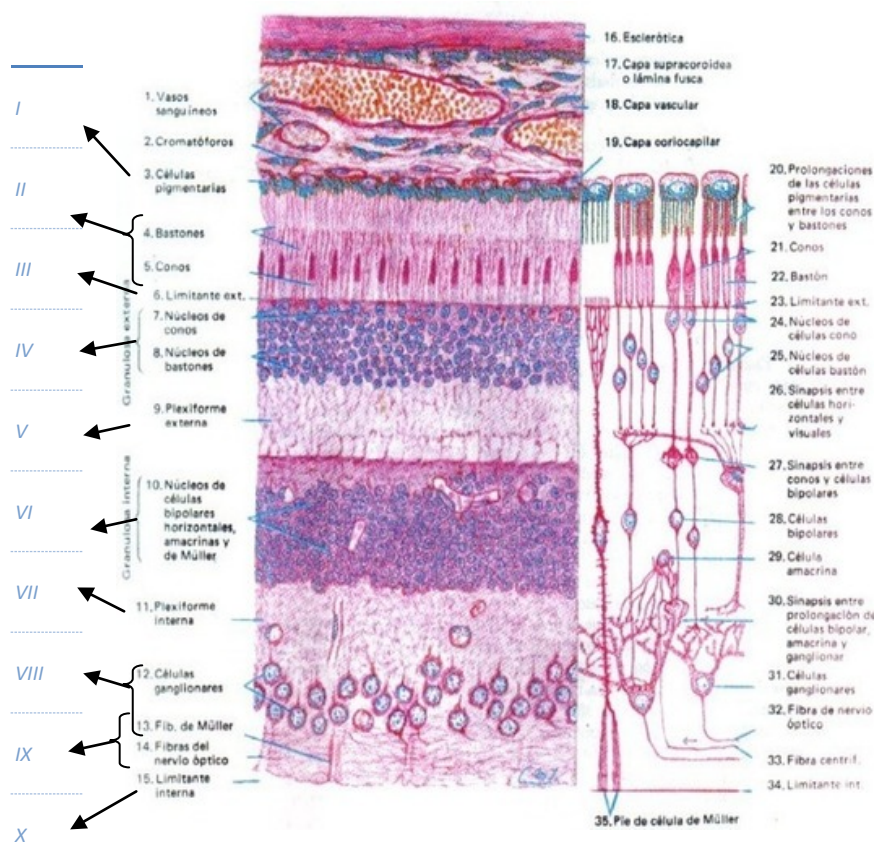


Figura 1. Histología de la retina (Tomado de <http://www.scoop.it/t/anatomia-ocular-y-del-sistema-visual2/p/4033349112/2014/12/10/capas-de-la-retina>).

Desde un punto de vista clínico, la retina se divide a grandes rasgos en 2 capas: el epitelio pigmentario y la retina neurosensorial.

El epitelio pigmentario de la retina tiene una gran cantidad de melanina, que sirve para evitar la dispersión de la luz. Asimismo, tiene la función de soporte de los fotorreceptores, aportándoles nutrientes, y eliminando los productos de desecho que producen. Esta capa, además,

forma junto a la membrana de Bruch la denominada barrera hematorretiniana externa, esencial para la integridad de la retina.

El resto de las capas de la retina conforman el conjunto de la retina neurosensorial, que actúa como una unidad funcional que transforma la luz que ha llegado al interior del ojo en el estímulo nervioso que sale a través del nervio óptico con dirección a la corteza occipital cerebral. El proceso se inicia en las células fotosensibles (los fotorreceptores) que son estimuladas con la llegada de la luz. A partir de ese primer impulso, se producen diferentes interacciones con las diferentes neuronas intermedias para modular la respuesta nerviosa. Finalmente, las células ganglionares conducen el estímulo nervioso resultante mediante el nervio óptico a las siguientes estructuras cerebrales que van a continuar el proceso de formación de la imagen¹.

En la figura 2 se recoge una representación de la retina y las diferentes capas que la componen:

Sección A. Imagen del polo posterior que muestra:

- La papila (D)
- Las arterias y venas retinianas de la arcada perifoveal (E)
- La fovea (F)
- La circulación coroidea visible (G) por debajo de la retina normal

Sección B. Sección oblicua de (A) que muestra la retina sobre la coroides

Sección C. Imagen ampliada de una parte de (B) que muestra la relación directa entre la imagen oftalmoscópica (A) y la histología correspondiente:

- Capas de la retina (H):
 - o Células ganglionares (I)
 - o Neuronas intermedias (J)
 - o Fotorreceptores (K)
 - o Membrana limitante interna (L)
 - o Capa de fibras nerviosas (M)
 - o Capa de células ganglionares (N)
 - o Capa plexiforme interna (O)
 - o Capa granulosa interna (P)
 - o Capa plexiforme externa (Q)
 - o Capa nuclear de fotorreceptores (R)

- Membrana limitante externa (S)
- Bastones y Conos (T)
- Arterias y venas retinianas (U) (V)
- Epitelio pigmentario de la retina (X)
- Capas de la coroides (W):
 - Membrana de Bruch (BR)
 - Coriocapilar (Y)
 - Vasos coroideos mayores (Z)

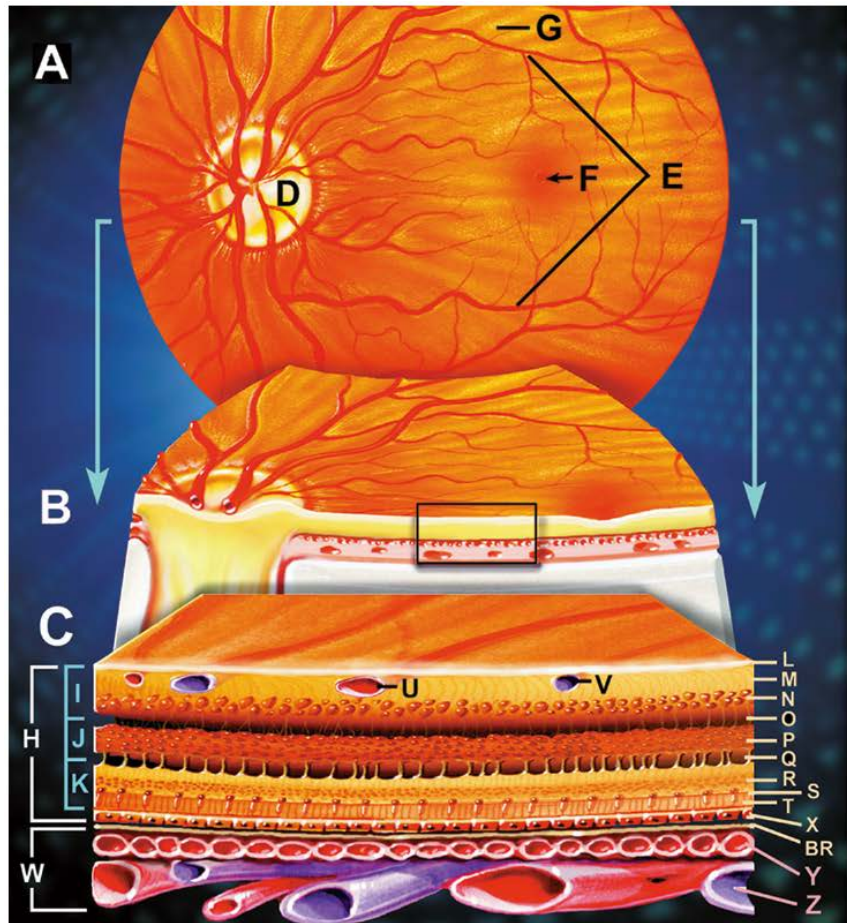


Figura 2. Esquema anatómico de la retina (Tomado de Jaypee – Highlights Medical Publishers).

Vascularización de la retina

La retina recibe su aporte sanguíneo a partir de la arteria oftálmica, que es la primera rama de la arteria carótida interna. A partir de dicha arteria oftálmica, se forma un sistema de dos circulaciones: la coriocapilar y la arteria central de la retina. La primera va a irrigar el tercio externo de la retina, incluyendo los fotorreceptores, el epitelio pigmentario de la retina y la fovea avascular; mientras que la segunda nutre los dos tercios internos de la retina².

La arteria central de la retina (ACR) se dirige hacia el globo ocular acompañando al nervio óptico formando un paquete vasculonervioso. En primer lugar aporta irrigación a la papila del nervio óptico. Después se divide en dos ramas: superior e inferior, cada una de las cuales se divide en otras dos ramas: nasal y temporal, con lo que se suministra el aporte sanguíneo de los cuatro cuadrantes de la retina interna.

La retina externa está irrigada por la coriocapilar, que recibe el aporte sanguíneo de las arterias ciliares posteriores cortas y largas, que son también ramas de la arteria oftálmica.

Una variante anatómica presente hasta en el 49% de los pacientes según las series, es la existencia de una arteria ciliarretiniana, procedente de la arteria ciliar, que puede dar irrigación independiente al haz papilomacular y al área macular, con lo que el pronóstico visual en las obstrucciones de arteria central de la retina puede ser mejor en estos pacientes³.

Se adjunta en la figura 3 un esquema de la vascularización de la retina.

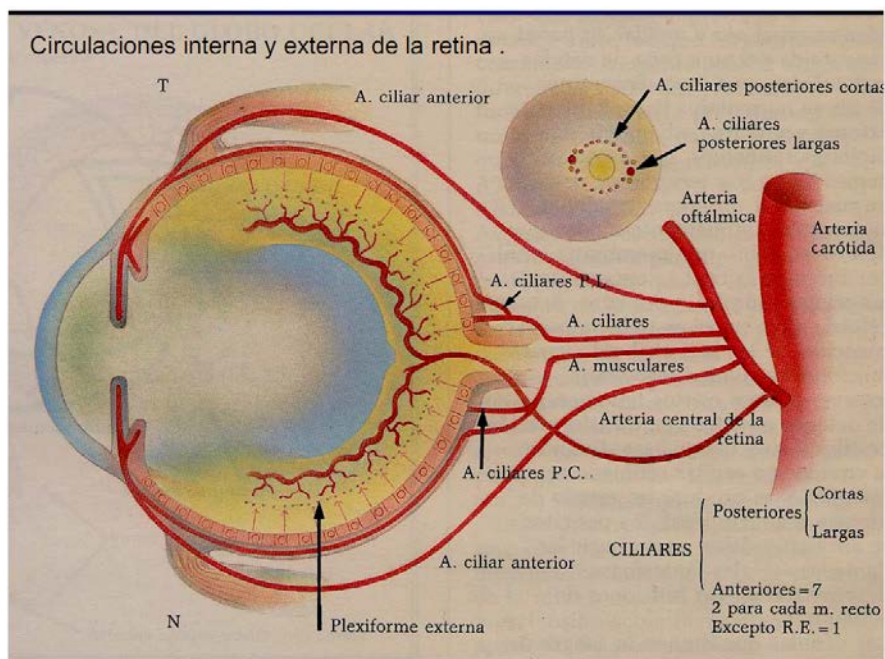


Figura 3. Vascularización de la retina. (Tomado de Tapia M Anatomía del Sistema Ocular. <http://slideplayer.es/slide/1633643/>)

Isquemia – Reperfusión

El denominado síndrome de isquemia–reperfusión ha sido ampliamente estudiado, y sus efectos en los tejidos son bien conocidos.

El daño celular que aparece en los tejidos sometidos a isquemia se debe a la falta de oxígeno. En condiciones anaerobias, las células no pueden llevar a cabo sus funciones vitales, por lo que comienzan a sufrir cambios estructurales y funcionales. Si se mantiene la situación de isquemia, las células finalmente mueren.

En las ocasiones en las que se consigue restaurar el flujo sanguíneo, podríamos pensar que al volver a recibir oxígeno el tejido afectado, las células podrían volver a realizar sus funciones vitales y volverían a la normalidad. Sin embargo, se ha comprobado que al restaurarse el aporte de oxígeno, se inicia un proceso de formación de radicales libres y moléculas perjudiciales que producen un mayor daño que el que había producido la isquemia per se.

Para prevenir este daño por isquemia – reperusión se han probado diferentes fármacos en un gran número de experimentos llevados a cabo en distintos tejidos con el fin de saber cómo se puede modular esa respuesta y que el tejido sufra un menor daño.

En nuestro estudio valoraremos el efecto sobre la retina de algunos de los fármacos que han demostrado un efecto protector del daño por isquemia – reperusión en otros tejidos, para saber si pueden tener utilidad terapéutica en este campo.

Isquemia en la retina

Durante la oclusión de la arteria central de la retina, son las capas más externas de la retina interna las que comienzan a sufrir los efectos de la isquemia, especialmente las capas plexiforme externa y nuclear externa, en las que se describen los cambios más precoces, que consisten en edema dendrítico y citoplásmico con vacuolización de los núcleos.

La susceptibilidad neuronal de la retina a la isquemia depende de distintos factores. Durante el proceso de isquemia se produce un aumento de los niveles de transmisores extracelulares, tanto el glutamato como el GABA; y dependiendo de la cantidad de receptores que cada célula exprese para dichas moléculas, la susceptibilidad será mayor o menor. Otros factores que también influyen son su habilidad

para tamponar el Ca^{2+} intracelular, el pH extracelular y la habilidad para inactivar los radicales libres generados (por ejemplo, son más resistentes las neuronas que expresan calbindina, que actúa como proteína de unión al Ca^{2+})⁴.

Neovascularización en la retina

El proceso de formación de neovasos en el tejido retiniano es de suma importancia clínica y ha sido ampliamente investigado, permitiendo grandes avances terapéuticos de la patología retiniana. Aunque en nuestro estudio actual no tiene especial relevancia al producirse en un plazo de tiempo más largo que el que es objeto de análisis, merece mencionarse brevemente.

Al producirse el fenómeno de isquemia, hay un aumento en la liberación de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)⁵, que desencadena un proceso que consiste en la vasodilatación de los vasos existentes en la retina, aumenta la permeabilidad vascular, y comienza la degradación de la matriz extracelular que rodea a los vasos. Por lo tanto, las células endoteliales pueden migrar y formar nuevas formaciones vasculares que reciben el nombre de neovasos.

Para que se produzca dicha degradación de la matriz extracelular, se produce una activación de factores pro-proteinasas, en detrimento de los inhibidores de proteasas. Entre los factores que tienen una función proteolítica se encuentran el Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), la metaloproteinasa de la matriz extracelular (MMP) y la cisteín-proteinasa (cuya expresión a su vez está controlada por citoquinas y factores proangiogénicos como el bFGF y VEGF). Por otro lado, disminuye la función de los inhibidores de proteasas (Inhibidor del Activador de Plasminógeno, PAIs; Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas, TIMPs; cistatinas).

Aunque el factor más importante en este proceso es el VEGF, y es el que se utiliza en la actualidad como principal diana terapéutica para múltiples patologías, también hay otras moléculas que intervienen en el

proceso como el Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (PDGF), que estimula el reclutamiento de pericitos y de fibras de músculo liso, que formarán parte de los neovasos. Asimismo, también se ha descubierto la expresión de Factor Inducido por Hipoxia (HIF-1), que a su vez estimula la liberación de VEGF, eritropoyetina y bFGF⁶.

En estudios llevados a cabo en pacientes con retinopatía diabética se ha descrito también el aumento en la expresión de Factor de Crecimiento Insulina-like, Factor de Crecimiento Placentario, PDGF-BB y FGF 2, con un papel coadyuvante en el proceso de formación de los vasos⁴.

En otro estudio realizado, se ha descrito que la adenosina actúa como neuromodulador en todo el proceso de formación de neovasos, regulando todos los procesos descritos en este apartado⁷.

Mecanismos neurológicos durante la isquemia retiniana

Durante la isquemia se desencadenan ciertos mecanismos en el interior de las células, generando una cascada de cambios a nivel molecular, lo cual puede conducir a la muerte de dichas células. Además hay que tener en cuenta que la reperfusión no revierte el proceso, sino que puede a su vez desencadenar la muerte de células que habían sobrevivido a la isquemia.

Una de las primeras consecuencias celulares de la falta de aporte sanguíneo es la depleción de los depósitos de ATP, con lo cual las células de la retina se quedan sin energía para poder llevar a cabo sus funciones metabólicas.

Anteriormente se pensaba que eran principalmente las células de Müller las que metabolizaban la glucosa y proporcionaban lactato o piruvato a los fotorreceptores para realizar sus funciones. Pero, según un estudio realizado con 2-desoxiglucosa marcada, todas las células de la retina son capaces de metabolizar glucosa y de obtener por sí mismas los metabolitos necesarios para sobrevivir. Dicha función de las células de

Müller quedaría relegada a situaciones de máxima exigencia metabólica de los fotorreceptores⁸.

Si se mantiene esta situación de falta de ATP, se produce una disminución en la función del transportador Na^+/K^+ y ello conlleva la inhibición de la repolarización. Al mismo tiempo hay un aumento del glutamato extracelular. En este contexto, aumenta la función de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) por disminución del bloqueo voltaje-dependiente del Mg^{2+} y se activan también los receptores de glutamato del tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA)/kainato. Finalmente el proceso desencadena un influjo de Ca^{2+} , Na^+ y Cl^- al interior de la célula, provocando la lisis celular y el edema tisular consecuente.

La apertura de canales de Ca^{2+} a su vez disminuye el metabolismo oxidativo mitocondrial, con lo cual sostiene y aumenta el círculo vicioso, contribuyendo a la muerte de las células afectadas⁹.

Neurotransmisores liberados durante la isquemia

Por un lado aumenta en gran medida el glutamato extracelular, que es uno de los mayores responsables del daño celular.

Por otro lado, también se produce un aumento de GABA, glicina, dopamina, acetilcolina y adenosina. Estas moléculas también intervienen en los procesos que conllevan finalmente a la muerte celular por isquemia.

La capacidad de las células para resistir la isquemia dependerá de los diferentes receptores que exprese cada célula. Por lo tanto, algunas células serán más susceptibles que otras ya que responderán en mayor o menor medida a esos neurotransmisores que se han liberado en el espacio extracelular.

Analizando en mayor profundidad el glutamato, se ha observado que aumenta más durante la reperusión que en la isquemia propiamente dicha. El mecanismo de aumento del glutamato consiste en que la

depleción de ATP disminuye la función de la bomba Na^+/K^+ , por lo que se pierde el gradiente de Na^+ y baja la absorción de glutamato. Además, también se produce una disminución de la metabolización de glutamato a glutamina, lo cual es otro factor que contribuye al aumento del mismo¹⁰. Otra posible fuente descrita son los astrocitos, a través de un mecanismo mediado por prostaglandinas¹¹.

El papel que tiene el glutamato en la isquemia se ha demostrado en experimentos in vitro mediante la adición de NMDA, que es un agonista ionotrópico de receptores de glutamato, en cultivos celulares, y que produce cambios histológicos similares a la isquemia¹².

A su vez, en estudios in vivo en retina isquémica, antagonistas del NMDA han demostrado un efecto protector en modelos experimentales de aumento de la presión intraocular¹³.

Mecanismos de la excitotoxicidad por glutamato

El aumento de la concentración de Ca^{2+} y los receptores AMPA/Kainato, y la disminución de la extensión de la activación del receptor NMDA, provocan en conjunto la entrada de Na^+ en la célula, por lo que hay una apertura de canales de Ca^{2+} por despolarización de la membrana plasmática.

Este hecho favorece la entrada de Na^+ , por lo que hay también una entrada de Cl^- debido al gradiente de voltaje generado, produciendo un aumento de la osmolaridad intracelular, entrada de agua, choque osmótico y finalmente la lisis celular¹⁴.

La afectación de células gliales contribuye también al daño ya que dejan de realizar su función de soporte de las células nerviosas¹⁵.

El papel de los receptores metabotrópicos de glutamato en la retina isquémica (mGluRs)

Hay pocos estudios sobre estos receptores, pero también se sabe que tienen un papel en el proceso de isquemia, y la utilización de agonistas del grupo II de estos receptores protege de la isquemia retiniana¹⁶.

Extensión de la despolarización

Se observan ondas de despolarización desde el núcleo de la isquemia hacia las zonas adyacentes o de penumbra isquémica. Estas zonas se afectan fundamentalmente porque se produce un aumento metabólico para intentar compensar los fallos que se van produciendo en el tejido isquémico. Las células de estas zonas colindantes no pueden asumir toda la necesidad de energía que requieren en dicha situación, por lo que también comienzan a sufrir daños al no poder realizar sus funciones celulares¹⁷.

Efectos del Ca^{2+} en la retina isquémica

Durante el proceso de isquemia – reperusión, hay una disminución del Ca^{2+} en el espacio extracelular, y aumenta en el intracelular.

Parece que hay evidencia a favor de que el Ca^{2+} juega un papel importante en la isquemia, y que no es simplemente un epifenómeno, ya que se piensa que activa varias cascadas destructivas, como la producción de radicales libres, la síntesis de óxido nítrico, la fosfolipasa A2, proteasas y estimula la rotura del ADN¹⁸.

Rol del Zn^{2+} en la retina isquémica

En los diferentes estudios que se han llevado a cabo tanto in vitro como in vivo se ha observado por una parte un efecto protector de las neuronas isquémicas cuando está presente a bajas concentraciones; sin embargo, cuando aparece en cantidades elevadas contribuye a la muerte celular.

Algunos estudios sugieren que el Zn^{2+} puede atenuar el daño neuronal inducido por el NMDA, bloqueando los receptores GABA, aunque en otros estudios no se ha encontrado una relación directa entre estos fenómenos, por lo que todavía permanece desconocido el papel del Zn^{2+} en la isquemia retiniana¹⁹.

Formación de radicales libres

Tanto el glutamato como la deprivación de glucosa y oxígeno desembocan en la formación de radicales libres durante la isquemia, que

son unos mediadores muy importantes del daño originado en la isquemia retiniana, como es bien conocido.

También favorecen la formación de estos compuestos las concentraciones altas de (NMDA) o kainato.

En todos los procesos de isquemia tisular se ha documentado la producción de radicales libres, principalmente mediante reacciones metabólicas mediadas por oxidasas y oxigenasas. En condiciones normales, los sistemas protectores de los tejidos harán que no se produzca ningún daño. Sin embargo, durante la isquemia se producen grandes cantidades de estos radicales libres y actúan como metabolitos citotóxicos. Los más perjudiciales son el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo²⁰.

Además, durante la reperfusión, la formación de estos radicales libres se multiplica cuando los compuestos que se han ido acumulando durante la isquemia se reoxidan. Este aumento de radicales libres durante la reperfusión temprana, supera la capacidad antioxidante del organismo produciendo un gran estrés oxidativo y el daño tisular.

A nivel celular, el mecanismo se inicia con la degradación del ATP mitocondrial por la isquemia. Esto conlleva la formación de hipoxantina, lo cual incrementa el Ca^{2+} intracelular, que a su vez activa a la proteasa calpaína. Este enzima convierte la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa y esta última transforma la hipoxantina en ácido úrico dando como resultado la liberación de radicales superóxido.

El aumento masivo de radicales superóxido supera la capacidad de la superóxido dismutasa para proteger el tejido, por lo que el daño de la retina isquémica se ve aumentado en gran medida.

Los radicales libres producen la peroxidación lipídica de las membranas y la degradación de los fosfolípidos mediante la activación de la fosfolipasa A2, produciendo la pérdida de la fluidez de la membrana, edema celular y producción de más radicales libres. Todo ello conlleva la

destrucción de aminoácidos y cadenas polipeptídicas, y la fragmentación de las moléculas de ADN. Asimismo, activa citoquinas y NF-κB, que son fundamentales en la regulación de iNOS y COX-2, produciendo la liberación de glutamato y alteraciones en la homeostasis del Ca²⁺ ²⁰.

Los daños celulares ocasionados pueden resultar tanto en la necrosis celular directa, como en la activación de la apoptosis de dichas células afectadas.

Por esta razón, se han utilizado con éxito multitud de antioxidantes para evitar el daño por reperfusión en los tejidos, mediante la inactivación de los radicales libres formados.

Rol de los mediadores inflamatorios

Hay una evidencia creciente de que las respuestas inflamatorias agudas contribuyen al daño celular, especialmente tras la reperfusión ^{21,22}. Entre las moléculas que se han estudiado se encuentran el óxido nítrico (NO), el ácido araquidónico, la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

El NO tiene un papel muy complejo en todo el proceso de isquemia – reperfusión, ya que en algunas circunstancias se ha visto que juega un papel perjudicial en los tejidos sometidos a isquemia y la utilización de fármacos inhibidores de la Óxido Nítrico Sintetasa (NOS) han demostrado un efecto protector sobre dichos tejidos. Sin embargo, en otros casos se ha descrito cierto papel beneficioso del NO, por lo que hará falta conocer mejor su participación en todo el proceso para saber cómo actuar sobre él como diana terapéutica ^{9,23}.

Otras moléculas involucradas en los procesos inflamatorios como el ácido araquidónico y las citoquinas como la interleucina (IL – 1) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), parecen estar implicados en los procesos destructivos de los tejidos isquémicos ¹⁸.

Acidosis en la isquemia retiniana

La disminución del pH en el tejido isquémico se produce por acumulación de ácido láctico causada por el cambio de la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaerobia en condiciones de falta de oxígeno.

La acidosis se exagera debido al aumento de la concentración de Na^+ intracelular, ya que reduce la salida de H^+ mediante el transportador Na^+/H^+ , disminuyendo aún más el pH intracelular.

Se han descrito diferentes mecanismos por los que la acidosis contribuye al daño celular. Uno de ellos es que el aumento de concentración de H^+ intracelular está asociado a una peroxidación lipídica acelerada y formación de radicales libres. Otro mecanismo es el secuestro de Ca^{2+} intracelular, lo que magnifica el aumento de su concentración intracelular durante la isquemia²⁴. También se ha reportado aumento de la degeneración glial, daño microvascular, inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, oxidación láctica y extrusión de H^+ . Se ha observado edema e hinchazón celular en cultivos celulares sometidos a bajo pH²⁵.

Se ha comprobado en determinados estudios en tejido nervioso cerebral, que la hiperglucemia contribuye al daño del tejido isquémico, ya que se produce más ácido láctico cuanto más sustrato de glucosa haya previamente, por lo que contribuye a una disminución más acusada del pH⁹. Sin embargo, en diferentes estudios en retina, se aprecia el efecto contrario, un efecto protector de la retina en condiciones de hiperglucemia. La explicación más probable de este fenómeno es que las altas concentraciones de glucosa en el vítreo permiten preservar los niveles de ATP mediante glucólisis anaerobia durante el periodo de isquemia.

Tolerancia a la isquemia

Este fenómeno es un proceso adaptativo de los tejidos que han sufrido isquemia, que les permite ser más resistentes a futuros procesos de isquemia. Esta tolerancia fue descrita en primera instancia en tejido

cardiaco, y después ha ganado importancia en estudios en tejido cerebral y retiniano²⁶.

El mecanismo subyacente parece estar en cambios que conciernen a los canales de K⁺ sensibles a ATP y a adenosina, y en la sobreexpresión de bFGF²⁷.

Aspectos moleculares y celulares de la muerte celular

Aunque existe cierta disparidad de criterios en torno a este punto, la mayoría de autores consideran que el daño isquémico (a partir de cierta intensidad) activa las rutas apoptóticas en las neuronas de la retina. Así, diversos estudios relacionan la elevación de la concentración de ciertas moléculas con este estado pro-apoptótico. Quizás las más relevantes sean las caspasas 1, 2 y 3^{28,29}, el “proliferating cell nuclear antigen” (PCNA)³⁰, la “Jun N – terminal Kinase” fosforilizada (p-JNK)³¹, y la IL-1³².

Potenciales estrategias terapéuticas

Fisiopatología y cascada isquémica

Cuando hay una afectación del flujo sanguíneo, se alteran los mecanismos homeostáticos que relacionan las demandas metabólicas con la hemodinámica. La depleción de los depósitos de energía celular más allá de un umbral crítico acciona todos los mecanismos moleculares de la cascada isquémica, independientemente de la razón inicial del compromiso vascular.

Uno de las primeras dianas de tratamiento podría ser restablecer el aporte de nutrientes, aunque esto implica una demora durante la cual la retina continúa sufriendo los efectos de la isquemia. Por ello, se necesitan desarrollar estrategias farmacológicas específicas para detener esas cascadas formadas durante la isquemia.

Contrarrestando directamente las consecuencias inmediatas de la isquemia retiniana

El tratamiento de la OACR se centra en restaurar el flujo sanguíneo lo más rápidamente posible. Las estrategias que puedan añadirse deberían

ampliar la ventana terapéutica o atenuar el daño retiniano diferido. Los enfoques actuales en la restauración del flujo sanguíneo en isquemia retiniana causada por oclusión vascular incluyen el uso de agentes fibrinolíticos para disolver el trombo, masaje ocular y reducción de la presión intraocular³³.

Otros tratamientos que tienen como objetivo atenuar el daño retiniano isquémico asumen que la perfusión retiniana está comprometida pero no totalmente abolida. No parece razonable esperar que un tratamiento pueda sostener la viabilidad retiniana indefinidamente en ausencia completa de perfusión. Como la depleción de energía es el detonante para la cascada isquémica, aumentar el aporte de oxígeno y carbohidratos a la retina isquémica debería prevenir o disminuir el daño. La oxigenación hiperbárica puede ser útil para el tratamiento de la retina isquémica, pero este procedimiento podría provocar también una toxicidad retiniana inducida por el oxígeno³⁴. El aporte de oxígeno puede ser aumentado mediante perfusión de H_2O_2 , que es convertido por la catalasa intracelular en H_2O y oxígeno. Sin embargo, se producen radicales libres y esto podría ser perjudicial.

Los perfluorocarbonos líquidos son herramientas útiles en el manejo quirúrgico del desprendimiento de retina, y pueden ser potencialmente útiles en tratar la isquemia. Tienen solubilidades muy altas de oxígeno y CO_2 , por lo que facilitan el aporte de oxígeno y la extracción del CO_2 . Han demostrado incrementar la tolerancia retiniana a la isquemia. Sin embargo, también pueden incrementar la producción de radicales libres³⁵.

En la retina isquémica de gato se ha visto que la vitreoperfusión directa de oxígeno gaseoso produce recuperación de la onda b del ERG³⁶. La vitreoperfusión con soluciones que contienen nutrientes pueden limitar el daño retiniano incluso después de 210 minutos de isquemia, aunque ya haya un daño sustancial de la retina. Los pacientes necesitarían una vitrectomía inmediata usando fluido oxigenado, pero habría que continuar la vitreoperfusión hasta que haya recuperación circulatoria.

Sería necesario desarrollar más este tipo de técnica antes de poder utilizarla en la práctica clínica³⁷.

Neuroprotección farmacológica

En numerosos estudios, los compuestos potencialmente neuroprotectores se administran previamente a la instauración de la isquemia retiniana, lo cual es altamente improbable en la clínica para el manejo de una oclusión vascular. En otras patologías que cursen con una isquemia crónica de la retina, ya sea asociada a diabetes, o incluso glaucoma, dichas sustancias neuroprotectoras podrían ser de utilidad.

Sin embargo, para las isquemias de instauración brusca como la oclusión de arteria central de la retina, necesitamos encontrar fármacos con eficacia neuroprotectora cuando son administrados durante la isquemia o posteriormente a la misma.

Atenuar la excitotoxicidad mediada por glutamato.

Tal y como hemos visto, la toxicidad por glutamato es una de las vías más importantes que conducen al daño neuronal en la isquemia retiniana, por lo que las estrategias terapéuticas se pueden encaminar a disminuir este efecto.

La primera posibilidad podría ser impedir su liberación actuando sobre la liberación Ca^{2+} -dependiente que ocurre durante la isquemia precoz y la reperfusión.

Otra posibilidad es favorecer la recaptación de glutamato después del periodo de isquemia. Se ha observado que determinados fármacos como los agonistas α_2 -adrenérgicos reducen la acumulación de glutamato y aspartato en el humor vítreo tras la isquemia, explicando la disminución del daño en los modelos animales de isquemia retiniana³⁸.

Los antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato también tienen un efecto protector de la retina isquémica in vivo, pero no parecen ser apropiados para la práctica clínica por su largo plazo de acción³⁹. En cambio, han cobrado especial importancia recientemente

los antagonistas del NMDA no competitivos, tales como el MK-801 o el dextrometorfano, que han demostrado atenuar el daño retiniano tanto in vitro como in vivo, pero es necesario realizar nuevos estudios para determinar la dosis adecuada en la práctica clínica, ya que sólo se han utilizado en dosis elevadas, y muchos pacientes sufren efectos secundarios como mareos, náuseas y coordinación disminuida a dichas dosis⁴⁰.

Reducir los efectos perjudiciales de los radicales libres.

Cualquier producto capaz de potenciar los mecanismos antioxidantes del organismo puede servir para proteger la retina frente al daño isquémico. Se han utilizado numerosas moléculas como la dimetiltiourea⁴¹, vitamina E⁴², ácido α -lipoico^{42,43}, superóxido dismutasa⁴⁴, catalasa⁴⁴, extracto de Gingko Biloba (EGB-761)⁴⁵, un derivado de la vitamina C CV-3611⁴⁶, desferroxiamina⁴⁷, manitol⁴⁸ y alopurinol⁴⁹.

También se han demostrado acciones antioxidantes en los mecanismos de acción de dobesilato de calcio⁵⁰, flupirtina⁵¹ y trimetacina⁵² en isquemia retiniana.

Reducir los efectos perjudiciales de la homeostasis alterada del calcio.

El grado de daño neuronal en la isquemia – reperfusión parece estar directamente relacionado con los cambios en la concentración del Ca^{2+} intracelular.

Se puede conseguir un efecto protector en la retina mediante sustancias que disminuyen la entrada de Ca^{2+} en el interior de la célula o las que reducen la salida del Ca^{2+} mitocondrial y del retículo endoplásmico. Un ejemplo es la flurancina, un antagonista de los canales de Ca^{2+} de amplio espectro, que ha demostrado el mencionado efecto protector en la retina⁵³. Otros fármacos que han mostrado efectos similares son el nifedipino y otros bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L⁵⁴.

Además, algunos β -bloqueantes utilizados en el tratamiento del glaucoma también han demostrado ciertos efectos beneficiosos en la

isquemia retiniana, que parecen ser debidos a su actividad bloqueante del Ca^{2+} ⁵⁵.

Reducir el influjo perjudicial del sodio.

Otro modo de disminuir el daño retiniano se puede centrar en la disminución de las necesidades energéticas de las neuronas. Esto se puede conseguir provocando una hiperpolarización de la membrana celular (mediante la apertura de los canales de K^+) o disminuyendo la probabilidad de despolarización (mediante la inhibición de los canales de Na^+).

Una gran parte de la energía que se consume en la retina es a expensas del mantenimiento del potencial de membrana mediante los canales de Na^+ y K^+ .

La contribución de los canales de Na^+ ha sido muy bien caracterizada, y su bloqueo anteriormente al periodo de anoxia ha demostrado mejorar la recuperación del potencial de acción compuesto al restablecer el flujo.

Un ejemplo de fármaco utilizado in vivo es el riluzol. Este producto aumenta la supervivencia en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica. Su mecanismo de protección neuronal es múltiple, siendo uno de sus efectos la inhibición de los canales de Na^+ ⁵⁶.

Este mismo mecanismo de acción se ha demostrado en el topiramato, una droga antiepiléptica⁵⁷.

Además, como se comenta en la sección anterior, los beta-bloqueantes también parecen tener un efecto protector en la isquemia retiniana, y la inhibición de los canales de Na^+ se postula como otro de los mecanismos mediante los que consigue la reducción del daño neuronal, además de su actuación sobre el Ca^{2+} previamente descrita⁵⁵.

Contrarrestar el fallo mitocondrial en la isquemia.

Se han descrito numerosos procesos que ocurren en las mitocondrias durante la isquemia, y que tienen una relación directa con la muerte

celular neuronal. Entre esos procesos se incluyen la liberación de activadores de la caspasa (como el citocromo C), cambios en el transporte de electrones, pérdida del potencial transmembrana mitocondrial, oxidación-reducción celular alterada y la participación de la familia de proteínas Bcl-2 pro y antiapoptóticas⁵⁸.

Una posible estrategia terapéutica sobre esta diana podría ser mejorar el metabolismo mitocondrial, por ejemplo mediante el uso de trimetadina, que mejora el metabolismo energético y la síntesis de ATP en diferentes modelos de isquemia⁵². Otro compuesto que ha demostrado reducir el daño por isquemia en la retina es la L-Carnitina, que preserva la actividad de la piruvato deshidrogenasa mitocondrial⁵⁹.

Otra posible diana sería la inhibición de formación de radicales libres en la mitocondria.

Ya Morin et al sugirieron que la “transición de permeabilidad mitocondrial” es un paso fundamental en la muerte celular neuronal. Este fenómeno consiste en un rápido incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial que provoca la liberación de moléculas de la matriz, fosforilación oxidativa y edematización⁵⁸. Esa permeabilidad se puede inhibir mediante algunos fármacos como la ciclosporina A. También se ha visto que los agonistas α_2 -adrenérgicos producen una regulación positiva de las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, que producen a su vez una inhibición de dicho fenómeno de permeabilidad mitocondrial⁶⁰.

Potenciar los mecanismos protectores endógenos.

Entre otros, los mecanismos de defensa de los tejidos ante la isquemia, son la síntesis de “Heat Shock Proteins” (HSP), citosinas antiinflamatorias, enzimas antioxidantes, neurotrofinas, la apertura de los canales de K ATP dependientes, liberación de neurotransmisores inhibidores como GABA y Adenosina, y la sobreexpresión de los transportadores de glucosa⁶¹. Centrándonos en la retina, se ha demostrado la sobreexpresión de HSP-70 y HSP-27⁶². Además, se ha

observado que un antagonista de los receptores de la interleucina-1 puede disminuir el daño por isquemia – reperusión cuando se inyecta en el vítreo previamente al establecimiento de la isquemia⁶³.

También se ha descrito el aumento de algunos factores de crecimiento tras la isquemia retiniana, como el bFGF y el CNTF. De acuerdo con estos hallazgos, la inyección intravítrea de estos factores de crecimiento y otros como por ejemplo el BDNF, han dado como resultado la disminución del daño producido por la isquemia. Sin embargo, por razones aún desconocidas, el efecto de los factores de crecimiento parecer ser temporal, por lo que no parece probable que puedan ser de utilidad clínica⁴³.

Por otro lado, se ha observado que determinados agonistas α -adrenérgicos⁶⁰ y algunos antagonistas β -adrenérgicos⁶⁴ pueden aumentar la expresión de los factores bFGF, BDNF y/o CNTF, lo cual puede jugar un papel en sus efectos neuroprotectores descritos en la literatura.

La administración sistémica de eritropoyetina ha demostrado también un efecto protector sobre la retina, tanto administrado previamente como posteriormente a la isquemia⁶⁵. Asimismo, agonistas de los receptores de adenosina A1 han demostrado mejoría en el daño retiniano al ser administrados justo antes de la isquemia⁶⁶.

Obstrucción de arteria central de la retina

La obstrucción de la arteria central de la retina (OACR) es una patología tromboembólica que cursa con disminución de agudeza visual de forma repentina.

Esta entidad fue descrita por primera vez en 1859 por Von Graefe. La incidencia se estima en aproximadamente 1 caso por 100.000 habitantes. En los estudios prospectivos realizados se habla de en torno a un 80% de pacientes con agudeza visual menor de 0,05.

El lugar más frecuente de OACR es el punto donde la arteria atraviesa la duramadre. La interrupción del flujo sanguíneo de la retina provoca una isquemia de la retina interna, con la consecuente alteración de las capas más internas de la retina. Cualquier factor de riesgo cardiovascular es una causa potencial de OACR, pudiéndose producir una trombosis en la arteria mencionada, o una embolización desde otro origen (frecuentemente desde la arteria carótida interna)⁶⁷.

Tipos de obstrucción de arteria central de la retina

Esta patología se puede dividir en cuatro grandes grupos según las implicaciones etiopatogénicas, clínicas y de manejo, que condicionan un mejor o peor pronóstico visual.

OACR no arterítica permanente

En más de dos tercios de los casos se debe a aterosclerosis carotídea.

Los factores de riesgo son los mismos que para otras patologías cardiovasculares: hipertensión arterial, diabetes mellitus, enfermedad de la arteria carótida, enfermedad de la arteria coronaria, antecedentes de accidentes isquémicos transitorios o accidentes cerebrovasculares, el tabaquismo o la enfermedad renal. También se considera un factor de riesgo los antecedentes familiares de enfermedades vasculares⁶⁸.

Si el paciente tiene menos de 50 años, debe realizarse estudio para descartar estados proaterogénicos, como la hiperhomocisteinemia⁶⁹, factor V de Leyden, proteína C y S, déficit de antitrombina, anticuerpos antifosfolípido, mutación genética de protrombina, células falciformes, migraña por vasoespasmo y síndromes paraneoplásicos⁶⁷.

Otros factores de riesgo locales serían la presión intraocular elevada, las drusas del nervio óptico y los bucles arteriales prerretinianos, que

implican un flujo sanguíneo levemente más reducido y un mayor riesgo de tromboembolismo a ese nivel⁶⁷.

OACR no arterítica pasajera

Aproximadamente en un 15-17% de las OACR, el flujo sanguíneo se restablece en unos pocos minutos, por lo que la pérdida visual brusca se recupera rápidamente (*amaurosis fugax*). En estos casos el pronóstico visual es netamente superior a las OACR permanentes.

En estos casos, el manejo debe ir orientado al diagnóstico de esos posibles factores de riesgo que se han detallado anteriormente, para poder diagnosticar las causas y tratarlas, con el fin de evitar que se produzca una OACR permanente.

OACR no arterítica, con variante ciliarretiniana

La existencia de una rama ciliarretiniana, que está descrita hasta en un 20% de la población general, implica un mejor pronóstico visual. Este dependerá de la extensión del área retiniana que reciba aporte sanguíneo de dicha rama.

OACR arterítica

En este subgrupo, la causa de la OACR es una arteritis de la temporal. En estos pacientes cobra especial importancia el diagnóstico causal, ya que sin el tratamiento adecuado de dicha entidad está descrita la bilateralización hasta en un 95% de los casos.

Tratamiento de la obstrucción de la arteria central de la retina

El manejo terapéutico agudo de esta entidad se ha centrado fundamentalmente en restituir el flujo sanguíneo mediante diferentes técnicas más o menos invasivas, para acortar en la medida de lo posible el tiempo de isquemia, que se estima que debe ser inferior a las 6 horas para que haya una mejoría visual posteriormente⁷⁰.

Sin embargo, en el tratamiento actual no se tiene en cuenta la protección de la retina frente a la reperfusión que se produce si se consigue restablecer el flujo sanguíneo. De aquí la importancia de buscar

algunos fármacos que puedan minimizar el daño por reperfusión para mejorar la viabilidad de la retina y por lo tanto la agudeza visual final del paciente.

Dentro de este apartado, podríamos mencionar también el manejo de las posibles secuelas que pueden aparecer de forma más diferida en esta patología. Entre un 5 – 15% de las OACR pueden desarrollar una neovascularización meses después del cuadro agudo.

Por ello, es conveniente el seguimiento de estos pacientes durante los meses posteriores, para reconocer los signos incipientes de neovascularización y, en caso de aparecer, tratar dicha complicación antes de que llegue a producir alteraciones importantes en el ojo afecto.

En estos casos, el manejo consistiría en la fotocoagulación del área de retina isquémica, lo que produciría una reducción en la liberación de VEGF por parte de las células isquémicas y una posible regresión de los vasos formados.

Si no se consigue la regresión de los neovasos, se pueden producir hemorragias vítreas si dichos vasos neoformados se encuentran en la retina. Si los vasos se han formado a nivel del iris, se puede llegar a desarrollar un glaucoma neovascular, que consiste en un aumento de la presión intraocular secundario a la obstrucción del ángulo iridocorneal, que es la principal vía de drenaje del humor acuoso desde la cámara anterior del ojo. Aunque el pronóstico visual ya sea malo de por sí aunque no aparezcan estas complicaciones, el manejo de las mismas suele ser complicado y puede requerir intervenciones quirúrgicas complejas y a menudo produce molestias importantes en estos pacientes.

Fármacos en isquemia – reperfusión

En este apartado vamos a analizar las razones por las que se han escogido estos fármacos para la realización de este experimento.

Acido Fólico

El ácido fólico, que es una vitamina esencial para los mamíferos, se corresponde con el ácido pteroil-L-glutámico. Se trata de una vitamina hidrosoluble, del complejo de vitaminas B, que ha demostrado en estudios de isquemia–reperfusión en otros tejidos su utilidad como modulador del daño histológico producido.

La fórmula estructural del ácido pteroil-L-glutámico se recoge en la figura 4. A pesar de ser una de las formas farmacológicas más empleadas, en realidad no es el principal compuesto dentro del grupo de los folatos ni el coenzima activo en el metabolismo celular.

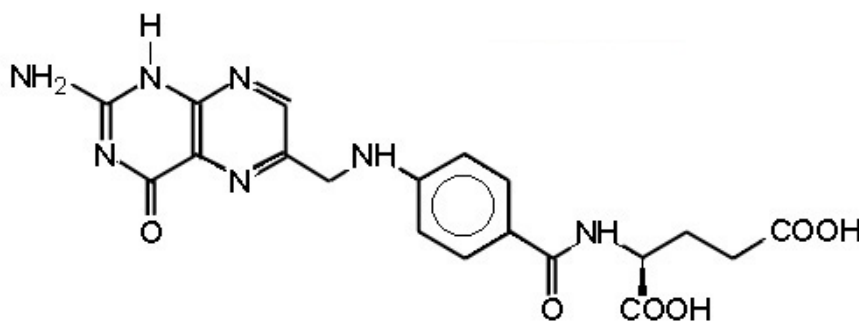


Figura 4. Fórmula del ácido pteroilglutámico (ácido Fólico)

El ácido folínico se incluye en el grupo farmacoterapéutico de los agentes desintoxicantes para el tratamiento antineoplásico; código ATC: V03AF03. El folinato cálcico es la sal de calcio del ácido 5-formil tetrahidrofólico. Es un metabolito activo del ácido folínico y una coenzima esencial de la síntesis de ácido nucleico en la terapia citotóxica. Además, tiene una potente actividad antioxidante.

Los folatos presentes en la dieta lo están en su mayoría en forma de poliglutamatos reducidos y la absorción requiere de la pteroil-gamma-glutamil carboxipeptidasa, la cual se encuentra asociada a las membranas de las células mucosas. Tras la absorción, el ácido fólico es rápidamente reducido a su forma de tetrahidrofolato, el cual a su vez actúa como aceptor temporal de restos monocarbonados para dar lugar a los diferentes derivados folínicos⁷¹.

Cada uno de estos compuestos desarrolla diferentes funciones en el metabolismo celular, que pueden resumirse como sigue:

- Conversión de homocisteína a metionina.
- Conversión de serina a glicina.
- Síntesis de timidilato (etapa limitante en la síntesis del DNA).
- Metabolismo de la histidina.
- Síntesis de purinas (el ácido fólico es requerido en dos etapas durante la síntesis de nucleótidos purínicos).
- Utilización o generación de folato (actuando como coenzima de una reacción reversible).
- Inhibición competitiva de la xantino – oxidasa (XO), debido a su analogía estructural con los sustratos purínicos sobre los que actúa este enzima⁷². Este se une al sitio activo del enzima impidiendo que consuma oxígeno molecular⁷³.

El ácido fólico es reconocido como un inhibidor de la xantino – oxidasa y su efecto ha sido probado en situaciones de isquemia. Así, Granger et al⁷⁴, en 1986, probaron que la administración de ácido fólico atenúa el incremento de la permeabilidad vascular tras isquemia intestinal en gatos. Con anterioridad, Lewis et al demostraron el efecto inhibidor de los folatos sobre la XO en mamíferos⁷⁵. Portugal et al observaron mejorías significativas de la respuesta regenerativa del hígado isquémico de la rata, tras hepatectomía parcial del 70%, con la administración de ácido fólico, al igual que con la superóxido dismutasa antes comentada⁷⁶. Del mismo modo, estudios posteriores de este grupo

demonstraron el carácter hepatotrófico de esta sustancia, tanto en hígados sometidos a isquemia como en aquellos a los que no se realizaba ésta ⁷⁷.

Nitroindazol

Es un inhibidor selectivo de la “neuronal nitric oxide synthase (nNOS)”. En la figura 5 se muestra la representación molecular de este principio activo.

En estudios realizados en isquemia cerebral se ha comprobado que el 7-Nitroindazol inhibe la síntesis de óxido nítrico. La concentración de óxido nítrico se reduce de forma significativa únicamente durante las etapas precoces de la reperfusión, sin alteración de la misma durante el periodo de isquemia o durante la reperfusión tardía ⁷⁸.

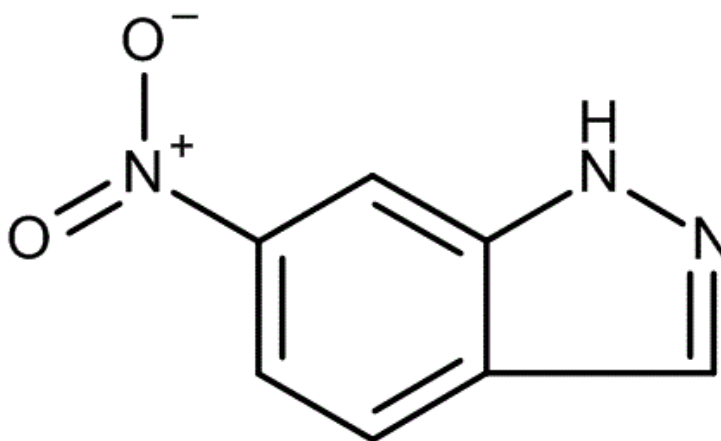


Figura 5. Fórmula del nitroindazol.

Calmidazolio

Es un potente inhibidor de la calmodulina. La fórmula está representada en la figura 6.

La calmodulina funciona en una gran cantidad de procesos como un regulador dependiente del Ca^{2+} . Entre ellos se incluyen el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, el transporte de iones, las cascadas de fosforilación/desfosforilación de proteínas, función del citoesqueleto, proliferación celular y señalización mediada por proteína G. La unión del Ca^{2+} a la calmodulina lleva a la activación de múltiples enzimas dependientes del Ca^{2+} , como por ejemplo la quinasa de la cadena ligera de la miosina, y la calcineurina⁷⁹.

El mecanismo de acción del calmidazolio consiste en la unión directa a la calmodulina, gracias a su solubilidad lipídica, su estructura geométrica, y a la interacción iónica con la calmodulina. Además, también tiene otros efectos inespecíficos como el bloqueo de canales de Calcio tipo L, canales de K^+ , canales de Na^+ y canales de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico⁸⁰.

En estudios en células miocárdicas aisladas, se ha evidenciado que este fármaco acorta la duración del potencial de acción, incrementando la tasa de repolarización en la fase 2. En los canales de Calcio tipo L provoca una inhibición que se mantiene tiempo después del lavado del calmidazolio. También tiene efecto sobre las corrientes de Na^+ , K^+ y Cl^- a través de las membranas.

Pero lo que más importancia tiene para nuestro estudio es el efecto que tiene sobre la producción de óxido nítrico, a través de las sintetasas de óxido nítrico dependientes de calmodulina⁸¹.

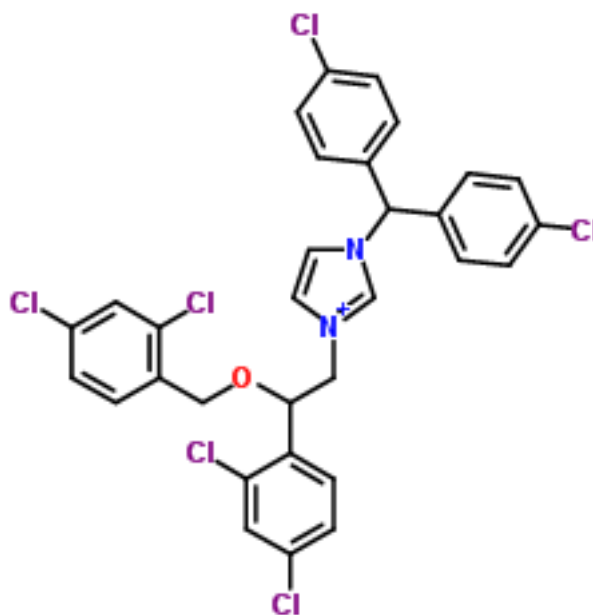


Figura 6. Fórmula del calmidazolium.

Alopurinol

Actúa como inhibidor de la xantina – oxidasa. McCord fue el primero en postular la capacidad de la xantina – oxidasa para generar radicales libres de oxígeno. Este enzima se deriva de la xantina deshidrogenasa en condiciones de bajo aporte de oxígeno.

La administración de enzimas antioxidantes como el alopurinol ha conseguido limitar la lesión por isquemia – reperfusión en modelos experimentales de isquemia intestinal⁸².

En la figura 7. aparece la representación molecular de este fármaco.

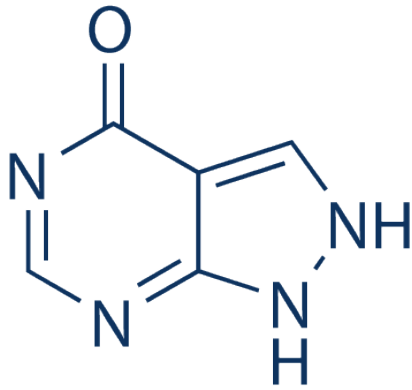


Figura 7. Fórmula del Alpurinol.

Trifluoperazina

Es un fármaco que pertenece a la familia de las fenotiacinas, y su uso clínico más extendido es como fármaco antipsicótico. Se representa en la figura 8. Su principal indicación es la esquizofrenia, aunque también se utiliza en pacientes con agitación severa o crisis muy intensas de ansiedad. Su principal efecto se sitúa a nivel central como antiadrenérgico y antidopaminérgico.

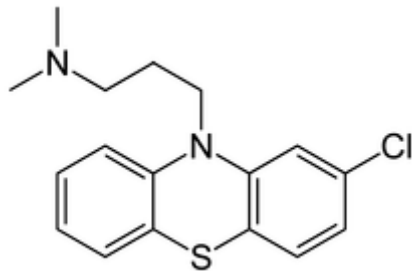


Figura 8. Fórmula de la trifluoperazina

Sin embargo, aunque esto es menos conocido, es inhibidor de la Calmodulina impidiendo la entrada de Calcio en la célula, por lo que se ha utilizado en trasplantes de órganos⁸³.

También interfiere otros procesos del metabolismo celular, a nivel de rutas de señalización, lo que ha llevado a utilizarlo con éxito como agente antitumoral⁸⁴.

Además, se ha descrito su capacidad de frenar la producción de fosfolipasa A₂ así como de prostaglandina E₂ reduciendo de esta manera los daños producidos por ciertos tóxicos y situaciones de estrés⁸⁵.

Pero es su capacidad de inhibir ciertos canales de potasio en el músculo liso de vasos sanguíneos lo que ha llevado a algunos investigadores a proponer su uso en los procesos de isquemia-reperfusión⁸⁶.

Por último, existen algunas referencias sobre la capacidad de este fármaco de reducir los daños originados en las células por el peróxido de hidrógeno (que se produce en abundancia durante la reperfusión)⁸⁷.

Pravastatina

Fármaco de la familia de las estatinas, cuya función es la inhibición de la hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa.

Su fórmula está representada a continuación en la figura 9.

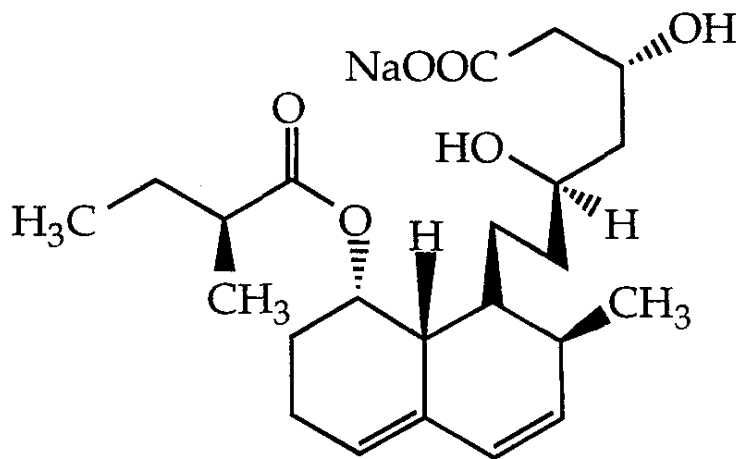


Figura 9. Fórmula de la pravastatina.

Habitualmente se utiliza en las hiperlipidemias con el fin de reducir el desarrollo de aterosclerosis y prevenir las enfermedades cardiovasculares. Las estatinas inhiben de forma reversible y competitiva la HMG-CoA reductasa, bloqueando la transformación de HMG-CoA en mevalonato y consiguiendo por tanto una reducción de la síntesis hepática de colesterol. Este hecho conduce a la estimulación de la síntesis y expresión de receptores de LDL y consecuentemente una reducción del colesterol sanguíneo, la apolipoproteína B100 y las lipoproteínas ricas en triglicéridos⁷¹.

Otro papel importante de las estatinas es la protección de la función endotelial, a través de diferentes mecanismos⁷¹:

- Estimulación directa de la síntesis del NO endotelial, con un incremento en la actividad de la eNOS, así como un aumento de su vida media.
- Reducción de la inhibición de la eNOS asociada a la hipoxemia y a otros estímulos, como el TNF, la IL-1 o las LDL oxidasas.

- Modulación de la actividad de la iNOS que ha demostrado ser deletérea a través de la síntesis de NO en el contexto del proceso inflamatorio y su oxidación a radicales peroxinitrito.
- Disminución de la actividad del Factor transcripcional kappa B (“Nuclear factor kappa B”, NFκB), de la quimiotaxis de los neutrófilos y monocitos humanos y de la adhesividad leucocitaria por la reducción de la expresión de CD11b monocítico y de ICAM-1 endotelial.

El efecto resultante consiste en una mayor disponibilidad del NO producido por la eNOS en el lecho vascular, que explicaría las propiedades antiinflamatorias que efectivamente se ha demostrado que poseen estos fármacos, así como una disminución del NO producido por la iNOS en las situaciones en las que un aumento de NO en presencia de radicales libres puede ser claramente deletéreo. Clínicamente el vínculo entre las propiedades anti-inflamatorias de las estatinas y su beneficio clínico es tal que comienza a haber evidencias de que los pacientes con mayores beneficios son aquellos que consiguen reducir, además de la LDL a cifras cada vez más bajas, sus concentraciones de proteína C reactiva (PCR) por debajo de 2 mg/l. Estos hallazgos pueden justificar que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa se hayan demostrado eficaces también en la reducción de la morbimortalidad cardiovascular en pacientes con niveles normales de colesterol⁷¹.

En diferentes trabajos se ha ido observando que el beneficio del tratamiento con estatinas se puede obtener tratando a los pacientes antes del infarto isquémico durante periodos de duración muy variable, entre 3-7 días y un mes. Por fin, varios trabajos experimentales han demostrado que una dosis única intravenosa del fármaco capaz de alcanzar una concentración sérica similar a la que se consigue con dosis clínicas terapéuticas es capaz de proporcionar múltiples efectos beneficiosos⁸⁸.

Juan San Cristóbal Epalza

Por todo ello, la administración de estatinas en dosis única inmediatamente antes del insulto isquémico podría resultar beneficiosa para disminuir los efectos del daño por isquemia – reperfusión.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Los fármacos que han demostrado utilidad en el control del daño por isquemia–reperusión en otros órganos, deberían ser útiles para reducir dicho daño en la retina.

Un modelo de isquemia–reperusión agudo en animales pequeños debería ser un modelo útil en el que probar la eficacia de dichos tratamientos.

Objetivo del estudio

Con este estudio queremos identificar fármacos que sean capaces de reducir el daño por isquemia – reperusión en la retina.

En la actualidad, no hay ningún tratamiento efectivo para las situaciones en las que la retina sufre un proceso isquémico agudo, como por ejemplo en la obstrucción de la arteria central de la retina. Por esa razón, en nuestro experimento queremos saber si algunos fármacos que han demostrado eficacia frente al daño por isquemia – reperusión en

otros tejidos, pueden ser también de utilidad en la retina, ya que podría también repercutir en el enfoque terapéutico de dichas situaciones de isquemia de la retina.

Para el manejo de la isquemia retiniana los tratamientos siempre han ido enfocados a restablecer el flujo sanguíneo lo más rápidamente posible para conseguir una reperfusión. Los resultados visuales suelen ser bastante pobres a pesar de conseguir dicha reperfusión en un plazo de tiempo corto, ya que, como hemos explicado, este fenómeno origina una cascada de reacciones que hacen que el daño tisular sea mayor y la viabilidad de las células retinianas mucho menor.

En este contexto, fármacos que protejan la retina frente al daño producido por la propia reperfusión, podrían mejorar los resultados visuales. De esta manera, al añadir estos medicamentos de forma simultánea a la restitución del flujo sanguíneo, podríamos esperar una mayor supervivencia de las células retinianas.

El síndrome de isquemia–reperfusión ha sido ampliamente estudiado en otros tejidos diferentes de la retina, por lo que tratamos de averiguar si medicaciones que han conseguido frenar el daño tisular en esos otros tejidos, pueden conseguir algún efecto protector en la retina y mejorar el tratamiento de estas entidades clínicas que cursan con isquemia de la retina.

Material y métodos

Animales de experimentación

Todo el trabajo se ha llevado a cabo con ratas singénicas WAG-RijHsd, obtenidas de Harlan®. La cepa ha sido posteriormente mantenida en el Servicio de Estabulario de la UPV/EHU (Unidad de Cirugía Experimental). Se han utilizado ratas macho de 12 semanas, con un peso aproximado de 300 g.

Los animales se han mantenido con alimentación (Safe A-04, Panlab SLU) y bebida “ad libitum”, con un ciclo de 12 h de luz – oscuridad, y temperatura constante de 24 °C.

Todos los procedimientos han sido realizados conforme a la legislación vigente y cuentan con la aprobación del CEEP de la UPV/EHU. Código M20/2016/218.

Técnicas quirúrgicas

Anestesia

Durante la realización del experimento las ratas han sido sometidas a un proceso de anestesia para poder llevar a cabo las maniobras necesarias. Para ello, inyectamos vía intraperitoneal una dosis de 15 mg/kg de Valium y 10 minutos después 80 mg/kg de Ketamina. Con estas dosis conseguimos una anestesia suficiente durante aproximadamente 90 minutos, lo que nos permite completar todo el proceso. Además, mantiene una sedación estable durante al menos otros 60 minutos.

Inducción de isquemia

Nuestro modelo de isquemia experimental retiniana implica una serie de procedimientos que describimos a continuación.

Dilatación pupilar

Instilamos colirio de Tropicamida en el ojo a estudio, para facilitar posteriormente la manipulación de la cámara anterior para la inducción de isquemia, y con el objetivo de poder observar directamente el fondo de ojo para comprobar el establecimiento de la isquemia y la posterior reperfusión.

Isquemia retiniana

Introducimos en la cámara anterior un catéter de linfografía de 26G (fig. 10). Conectamos el catéter a un sistema de presión hidrostática y aumentamos la presión hasta 150 mmHg (fig. 11), constatándose mediante oftalmoscopia directa el blanqueamiento de los vasos retinianos.



Figura 10. Catéter de linfografía introducido en la cámara anterior del ojo



Figura 11. Conjunto de equipamiento para la producción de la isquemia retiniana.

Tras 60 minutos de isquemia, disminuimos la presión y retiramos el catéter. Nuevamente, la oftalmoscopia directa confirma la recuperación del flujo sanguíneo retiniano.

Reperusión

Una vez restablecido el flujo sanguíneo retiniano, se mantiene al animal en reposo mediante sedación durante 60 minutos. Según la literatura consultada, este periodo de tiempo es suficiente para que se produzcan daños evidenciables mediante los diferentes sistemas de análisis⁸⁹.

Eutanasia

Cinco minutos antes de completar la reperusión, se administra una nueva dosis de ketamina intraperitoneal. Completados los 60 minutos de reperusión, se procede a la eutanasia mediante sección medular alta.

Enucleación

Una vez sacrificado el animal, se lleva a cabo la enucleación de ambos ojos, tanto del ojo sometido a isquemia – reperusión, como del ojo contralateral. El ojo no sometido a isquemia se utiliza como control pareado.

Para llevar a cabo la enucleación, se realiza en primer lugar una cantotomía lateral que nos permite tener más espacio para acceder al globo ocular. A continuación se lleva a cabo una peritomía conjuntival para exponer los músculos extraoculares. Estos se seccionan para liberar el globo ocular, y finalmente se secciona el paquete vasculonervioso óptico en la parte posterior de la órbita. La extracción se realiza traccionando del nervio óptico con una pinza de relojero, para evitar dañar las estructuras oculares.

Los globos oculares extraídos se colocan en una placa de Petri con suero fisiológico.

Técnicas anatomopatológicas

Obtención de las retinas

A partir del ojo enucleado, realizamos la disección de la retina mediante el protocolo descrito por Miltenyi Biotec⁹⁰. El proceso consiste en realizar una pequeña incisión con una aguja hipodérmica en pars plana, a través de la cual se introducen unas tijeras que nos permiten separar la córnea y el cristalino, y quedarnos solamente con la parte posterior del globo ocular.

A continuación sujetamos el nervio óptico con una pinza y con otra pinza exprimimos el globo ocular desde el nervio óptico hacia delante, produciéndose la separación de la retina neurosensorial del resto, con lo que ya tenemos la retina disecada.

Fijación en formol e inclusión en parafina

Una vez extraída la retina procedemos a su inmediata fijación en formol al 10%. Posteriormente (transcurrido un periodo mínimo de 24 horas) se procede a una deshidratación progresiva mediante inmersión en soluciones alcohólicas de concentración creciente, seguida de inmersión en xilol a temperatura ambiente. Por último, la retina se incluye en parafina, mediante inmersión en un baño a 60 °C.

Tabla 1. Se detalla el proceso de inclusión en parafina.

Etapas	Producto	Tiempo de inmersión
1	Formaldehido 10%	≥ 24h
2	Alcohol 50º	90'
3	Alcohol 70º	90'
4	Alcohol 90º	120'
5	Alcohol 100º	180'
6	Xilol	60'
7	Xilol (60º C)	60'
8	Parafina (60º C)	120'

Tinción con hematoxilina - eosina

Una vez la muestra es incluida en parafina, se obtienen secciones histológicas seriadas de 5 micras de espesor para su análisis. Dichas secciones son posteriormente teñidas con Hematoxilina-Eosina empleando un teñidor automático (Shandon Linistain GLX), según el protocolo que se detalla en la tabla 2.

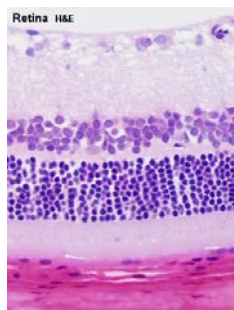


Figura 12. Sección histológica de una retina

Tabla 2. Tinción con hematoxilina-eosina.

Orden	Producto o procedimiento	Tiempo
1	Preparación en zona calefactada	5'
2	Xileno	2'
3	Alcohol 100º	1'
4	Alcohol 95º	1'
5	Agua corriente	30''
6	Hematoxilina	4'
7	Agua corriente	30''
8	Alcohol 70º + HCl al 1%	30''
9	Agua corriente	30''
10	Reactante azulante Shandon	1'
11	Agua corriente	30''
12	Alcohol 95º	30''
13	Eosina	30''
14	Alcohol 95º	1'30''
15	Alcohol 100º	1'
16	Xilol	1'

Valoración del daño retiniano

Para evaluar el daño producido a nivel histológico, hemos tenido en cuenta las alteraciones retinianas que aparecen de forma más precoz durante los procesos de isquemia. Estos cambios tisulares se han recogido agrupados en 3 grupos diferentes.

Existencia de “Daño Histológico”

Hace referencia al aspecto general de la retina. Las retinas no sometidas a isquemia poseen una estructura homogénea, mientras que las isquémicas están más desestructuradas.

En el análisis de los cortes histológicos se ha registrado la existencia o ausencia de daño histológico o si no lo había, registrándose como una variable cualitativa. Esta valoración “grosera” ha tenido como finalidad asegurar la calidad del procesamiento de las muestras, ya que al tratarse en todos los casos de piezas cuya identificación estaba “cegada”, la calificación como “dañada” de una retina de ojo no isquémico implicaría fallo de la técnica y exclusión del caso.

En la capa plexiforme y nuclear externas es donde se han descrito los cambios identificables más precoces en estos procesos de isquemia retiniana.

Edema citoplásmico

Al iniciarse el daño por la falta de aporte sanguíneo, los citoplasmas de las células que conforman la capa nuclear externa se llenan de agua como consecuencia de las alteraciones producidas, por lo que los núcleos aparecen más separados y con unos halos alrededor de los mismos.

En cada corte histológico se ha cuantificado el número de células afectadas por campo (utilizando un objetivo 40 X), por lo que se trata de una variable cuantitativa.

Edema dendrítico

Las dendritas de las células en la capa plexiforme externa también se van llenando de líquido, dando a la capa granular externa un aspecto más esponjiforme.

Esta variable también se ha recogido de manera cualitativa, como existencia o no de edema dendrítico.

En la tabla 3 se recogen las variables analizadas en el análisis de los cortes histológicos. Esta escala de daño está basada en la descrita por Izumi y cols⁹¹.

Tabla 3. Parámetros histológicos estudiados.

Variable	Valoración	Tipo
Daño histológico	SI / NO	<i>Cualitativa</i>
Daño citoplasmático	nº células/campo	<i>Cuantitativa</i>
Daño dendrítico	SI / NO	<i>Cualitativa</i>

Tratamientos utilizados

Administración de los fármacos

Todos los tratamientos se han administrado en una dosis única, por vía intraperitoneal, cinco minutos antes de comenzar la reperfusión, con el fin de que el fármaco se encontrara en el plasma al inicio de la misma.

La asignación del tratamiento a cada animal se ha realizado de forma ciega y aleatorizada, mediante la preparación de unas jeringas precargadas numeradas, de manera que el investigador no sabe el tratamiento que está administrando a cada rata.

Ácido Fólico

El tratamiento con ácido fólico se ha llevado a cabo utilizando ácido folínico, que es la forma activa del ácido fólico y no requiere la conversión enzimática de éste; además, tiene la ventaja de poder administrarse por vía intravenosa en forma de folinato cálcico. Concretamente se ha utilizado la presentación Folidan® 50, de Almirall Prodesfarma, en viales de polvo anhidro con 50 mg de ácido folínico en forma de folinato cálcico.

Cada vial se ha reconstituido en 5 ml de suero salino, conservándose esta dilución en nevera y oscuridad. Para su administración, la solución stock se ha diluido de nuevo en suero fisiológico hasta obtener 0,6 ml con ácido folínico suficiente para que el animal reciba 2,5 mg/kg; se ha administrado por vía intraperitoneal.

Nitroindazol

Es un inhibidor NOS, cuya composición molecular es un anillo indazol nitrado en la posición 7. El nitroindazol actúa como un inhibidor selectivo de la óxido nítrico sintetasa, que convierte la arginina en citrulina y óxido nítrico. El óxido nítrico es capaz de difundir a través de las membranas plásmáticas y afectar a las células contiguas permitiendo la señalización celular, por lo que el nitroindazol inhibe de forma indirecta esta vía de señalización celular.

La forma comercial que hemos utilizado es el 7-Nitroindazole (Sigma-Aldrich, ref. N7778). La presentación es un vial de 5 g de polvo anhidro. El fármaco se disuelve en etanol absoluto, y posteriormente este preparado se diluye en ClinOleic®, en una proporción 1/7. La dosis administrada ha sido de 10 mg/kg, vehiculizados en 0,6 ml de disolvente

(para que la aportación de volumen líquido exógeno sea la misma en todos los tratamientos).

El ClinOleic® (Baxter) es una emulsión lipídica al 20%, para mezclas de nutrición parenteral, compuesta por aceite de oliva (80%) y aceite de soja (20%); tiene un alto contenido en ácido oleico (ácido graso ω -9 mono-insaturado) así como en alfa-tocoferol (isómero activo de la vitamina E, que es un potente antioxidante natural).

Calmidazolio

Este fármaco actúa como inhibidor de la calmodulina e inhibidor NOS.

En el estudio hemos utilizado el producto Calmidazolium Chloride (Sigma-Aldrich, ref. C3930), suministrado en viales de 10 mg. El polvo anhidro se ha diluido en DMSO (Sigma-Aldrich, ref. D5879) a una concentración 5mM. A continuación, se ha diluido en suero fisiológico hasta obtener una preparación de 0,6 ml de fármaco para administración intraperitoneal. La dosis administrada ha sido de 2,4 mg/kg.

Alopurinol

El Alopurinol es un antioxidante. En nuestro trabajo hemos utilizado la forma comercial suministrada por Sigma-Aldrich en forma de polvo anhidro (Sigma-Aldrich, ref. A8003).

La preparación del fármaco se ha realizado en dos etapas. Primero se han diluido 125 mg de alopurinol en 2 ml de NaOH 1 N (2 g de NaOH en 50 ml de agua destilada) para obtener una solución stock, que puede conservarse en frío y oscuridad (4°C).

La preparación final que se ha administrado a los animales, se ha obtenido diluyendo en suero fisiológico la cantidad necesaria de solución stock para disponer de la dosis de 50 mg/kg en un volumen de 0,6 ml, que se administró por vía intraperitoneal.

Trifluoperazina

La trifluoperazina es un fármaco antipsicótico, que también actúa como inhibidor de la calmodulina. Ha sido suministrado en viales de 5 g. de polvo anhidro (Sigma-Aldrich, ref. T8516-5G), y requiere almacenamiento a una temperatura de -20°C.

La dosis utilizada ha sido de 10 mg/Kg. Para ello se ha disuelto el fármaco en 0,6 ml de suero fisiológico, administrándose a la rata por vía intraperitoneal.

Pravastatina

La pravastatina se ha obtenido como pravastatina sódica en viales de 25 mg de sal hidratada (Sigma-Aldrich, ref. P4498), que requiere conservación en frío (2-8 °C).

A partir de dicha preparación comercial, se han diluido directamente 1,2 mg en 0,6 ml de PBS. Con ello hemos obtenido una dosis de 4 mg/kg en las ratas tratadas en nuestro estudio.

Grupos experimentales

En este apartado se detallan las diferentes series de animales que se precisaron para llevar a cabo el estudio. En primer lugar, se llevaron a cabo unos experimentos preliminares que sirvieron para la puesta a punto del método experimental que se iba a emplear en el grueso del estudio. Estas primeras series sirvieron para ajustar y mejorar tanto la técnica quirúrgica como el ensayo de las técnicas de evaluación. Completada esta fase preliminar, se procedió con el estudio propiamente dicho.

Experimentos preliminares

Un primer estudio en un conjunto de 6 ratas, se realizó con el objetivo de determinar un valor de presión que sirviera para superar la tensión arterial de la arteria central de la retina y que permitiera la interrupción del flujo sanguíneo a la retina, simulando una obstrucción de arteria central de la retina.

Con este fin, el registro de la tensión arterial se llevó a cabo de manera invasiva, mediante un catéter introducido en la arteria femoral y registrado mediante un PowerLab®. Se obtuvieron unos valores de tensión arterial sistólica que oscilaban entre 110 y 130 mmHg.

Otra serie de animales se utilizó para asegurar la fiabilidad en el método de obtención de la isquemia retiniana. Para producir la isquemia, se desarrolló un sistema de presión hidrostática conectado a un esfingomanómetro. Este sistema se conectaba a la cámara anterior del ojo de la rata mediante un catéter flexible de polivinilo de 1 mm de diámetro interno y 2 mm de diámetro externo, embutido en una aguja de 27 G. En los primeros intentos, la presión que se obtenía no era constante, y se corría el riesgo de que si no se mantenía la presión, se permitiese de nuevo la irrigación de la retina. Finalmente se consiguió mantener presiones estables, que se decidió que fueran de 150 mmHg, algo superiores a los valores estrictamente necesarios para conseguir la isquemia retiniana, pero que permitían que pequeñas pérdidas de presión no afectaran a la isquemia retiniana durante todo el proceso.

La dilatación de la pupila con Tropicamida permite la visualización del fondo de ojo mediante un oftalmoscopio directo, de manera que se puede constatar que la retina está isquémica y que dicha situación se mantiene durante toda la fase de isquemia. Asimismo, permite también observar la reperfusión de la retina en la segunda fase del experimento.

En la última serie preliminar, compuesta por 6 animales, se llevó a cabo todo el proceso de isquemia y reperfusión de la retina en uno de los dos ojos, y se llevó a cabo la enucleación de los dos globos oculares de la

rata. Este grupo permitió la mejora de la técnica de extracción del globo ocular y la obtención de la retina. Las preparaciones histológicas a partir de estas retinas sirvieron para comprobar la fiabilidad en el análisis histológico, ya que se constató que era posible diferenciar las retinas que habían sufrido isquemia de las que no.

Series del estudio

El estudio se ha llevado a cabo con grupos de 8 animales para cada uno de los tratamientos ensayados, incluyendo un grupo que recibió exclusivamente 0,6 ml de suero fisiológico por vía intraperitoneal (en el que el número se redujo a 4).

El investigador recibió para cada sesión de trabajo una jeringuilla precargada con un fármaco e identificada con un código numérico que se conservó a lo largo de todas las fases del estudio. Una vez concluidas todas las determinaciones se procedió a “desenmascarar” los códigos, reagrupando los datos en función del tratamiento.

Debido al enmascaramiento de los datos, hasta completar el estudio no se supo a qué grupo pertenecían los animales que hubo que excluir por fracaso en la inducción/mantenimiento de la isquemia (que se recogen en la tabla 4).

Tabla 4. Detalle de la composición de los grupos experimentales

	Nº animales	Excluidos
Control	4	0
Fólico	8	2
Alopurinol	8	0
Pravastatina	8	1
Trifluoperazina	8	1
Calmidazolio	8	0
Nitroindazol	8	1

Análisis estadístico

Los resultados del estudio se han presentado como valores medios con su desviación estándar, ya que en todos los casos la distribución de valores se ajustó a una normal. Estos cálculos se realizaron utilizando el programa informático GraphPad de Prism®.

Las comparaciones de un tratamiento frente a las retinas no tratadas (controles) se realizaron mediante T de Student para muestras pareadas, aceptando como significativas aquellas diferencias con una $p < 0,05$.

Para las comparaciones entre los diferentes grupos de tratamientos se ha utilizado el análisis de la Varianza (ANOVA), y, en aquellos casos en los que este test confirmó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) se recurrió al "Newman-Keuls Multiple

Juan San Cristóbal Epalza

Comparison Test” para realizar una posterior comparación entre grupos.
Las diferencias con una $p < 0,05$ se aceptaron como significativas.

Resultados

En este apartado procedemos a detallar los resultados obtenidos en nuestras series experimentales, comenzando con el proceso de ajuste del modelo experimental. A continuación expondremos los efectos producidos por nuestro modelo de isquemia – reperusión sobre las retinas de los animales, para posteriormente detallar las modificaciones observadas tras aplicar los diferentes tratamientos. Por último, se incluye un apartado en el que se comparan en conjunto los tratamientos utilizados en nuestro trabajo.

1. Definición del modelo experimental

Los primeros ensayos con animales estuvieron destinados a ajustar el modelo experimental, hasta obtener una técnica fiable y repetible, que redujera al mínimo las variaciones debidas a factores ajenos al proceso fisiopatológico y/o los tratamientos ensayados.

1.1. Determinación de la presión de oclusión de la arteria central de la retina

Con el fin de definir una presión de infusión intraocular de suero que garantice la anulación del flujo sanguíneo en la retina, se procedió a realizar una monitorización invasiva de la tensión arterial (PowerLab®, Oxford) en un grupo de seis animales.

Se aplicó la misma anestesia que se utilizaría durante el procedimiento, y se registró en continuo la tensión arterial durante un periodo de

sesenta minutos. En la tabla 3.1 se recoge el rango de valores de tensión arterial máxima registrada en cada animal.

Esta experiencia nos permitió definir como presión intraocular eficaz para inducir isquemia retiniana un valor de 150 mm Hg. Este hecho es posible debido a que tal y como se deduce de la fórmula detallada a continuación, la elevación de la presión intraocular por encima del valor de presión arterial central de la retina da como resultado una presión de perfusión negativa, por lo que se detiene el aporte sanguíneo a la retina.

$$\text{Presión de perfusión} = \text{Presión arterial central de la retina} - \text{Presión intraocular}$$

Tabla 5. Rango de tensión arterial sistólica en animales control

	peso	TAS mínima	TAS máxima
Animal 1	323	118	125
Animal 2	289	110	118
Animal 3	305	119	130
Animal 4	293	115	125
Animal 5	302	122	131
Animal 6	298	119	127

1.2. Ajuste de la técnica de infusión intraocular

Los primeros intentos de inducir isquemia retiniana fracasaron por dos motivos fundamentales: fallos al mantener la presión intraocular, dificultad de constatar la ausencia de riego en la retina.

Los primeros manguitos de tensión utilizados para mantener la bolsa de suero fisiológico a la presión requerida no resistieron el largo tiempo requerido. Una vez obtenidos manguitos con mayor resistencia de la bolsa de goma elástica, se constató la necesidad de una observación

directa para reajustar repetidas veces la presión a lo largo de los sesenta minutos de isquemia.

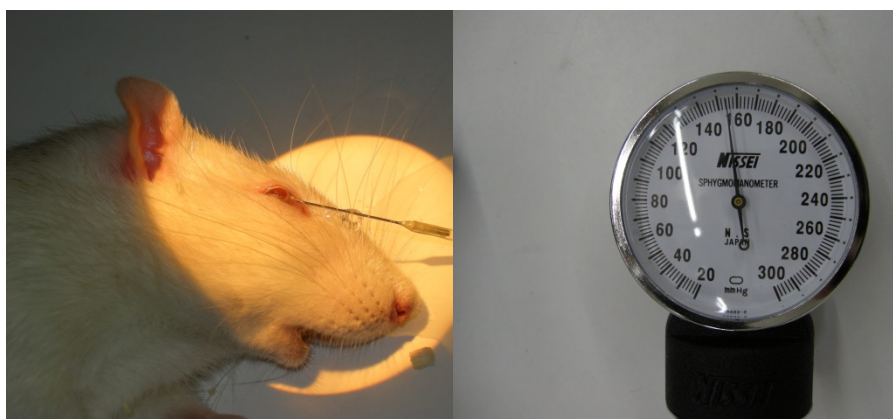


Figura 13. Infusión de suero en la cámara anterior hasta alcanzar 150 mm Hg.

Tras diversos intentos fallidos, la aplicación de Tropicamida previa al inicio de la infusión permitió la observación directa del fondo de ojo con un oftalmoscopio directo; de esa forma se pudo comprobar que – mientras se mantenga los 150 mm Hg de presión intraocular– la retina de nuestros animales permanece blanquecina en observación directa (isquémica).

Una vez ajustado este diseño, se aplicó la isquemia en 6 animales con el fin de asegurar la repetitividad de la técnica, a la vez que se utilizaron para ajustar los aspectos de valoración histopatológica de la lesión.

1.3. Ajuste de la técnica de valoración del daño retiniano

En seis animales sanos, bajo anestesia, se procedió a la enucleación de los dos globos oculares y la separación de la retina. Tras varios ensayos, se afinó la técnica definitiva que se utilizó para esta tesis doctoral, y que está descrita en el apartado de material y métodos.

Las retinas obtenidas del grupo de animales en los que se comprobó la fiabilidad de la técnica de isquemia se procesaron mediante inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina. Estas muestras, convenientemente cegadas, se utilizaron para entrenar al observador y conseguir una valoración fiable y repetible.

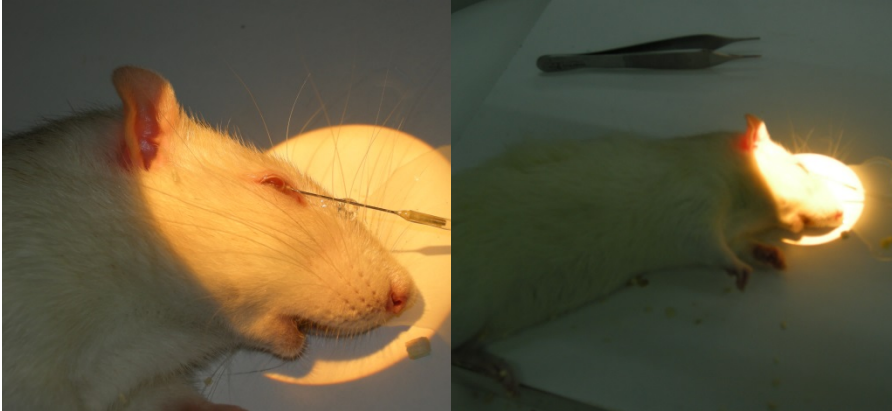


Figura 14. Retina sometida a 60' de isquemia (izq) y retina normal (dcha)

Las valoraciones de daño histológico, edema dendrítico y edema citoplásmico se repitieron en siete ocasiones. En las tres últimas, los valores obtenidos fueron homogéneos y comparables, por lo que se aceptó la calidad de medida del observador.

2. Efecto de la isquemia-reperfusión sobre la retina

Tal y como detallamos en el apartado de Material y Métodos, las retinas han sido examinadas valorando tres aspectos: la existencia o no de daño

en su estructura, la presencia o no de edema dendrítico, y el grado de edema citoplásmico en la capa nuclear externa.

Ninguna de las retinas de los ojos no sometidos a isquemia mostró daño apreciable; lo contrario de lo que se pudo apreciar en las retinas de los ojos sometidos a una hora de isquemia y extraídos tras una hora de reperusión.

De manera similar, mientras que todas las retinas de ojos sometidos a isquemia y reperusión mostraron la existencia de edema dendrítico, ninguna de las retinas contralaterales (que no experimentaron la isquemia) mostró dicho edema.

Si nos centramos en el parámetro más sensible de nuestro estudio, el edema citoplásmico, la media de los valores registrados en las retinas no sometidas a isquemia se situó en $1,5 (\pm 1,7)$. En cambio, en las retinas sometidas a isquemia y reperusión, éste índice alcanzó un valor medio de $102,5 (\pm 35)$; siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). Los valores obtenidos se recogen con detalle en la tabla 6.

Tabla 6. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales control

	Retina normal	Retina isquémica
Animal 1	3	50
Animal 2	3	120
Animal 3	0	120
Animal 4	0	120

3. Comportamiento de la retina con los tratamientos

En este apartado describiremos el comportamiento de las retinas (tanto las controles como las sometidas a isquemia) de los animales sometidos a los diferentes tratamientos.

3.1. Tratamiento con ácido fólico

Al igual que se ha observado en el grupo control, el daño histológico sólo se observó en las retinas de los ojos sometidos a isquemia y reperfusión, mientras que las retinas contralaterales no mostraron daño. Lo mismo ocurre si analizamos la existencia de edema dendrítico: la totalidad de las retinas sometidas a isquemia lo presentaron, sin que se observara en las retinas no isquémicas.

Como se aprecia con claridad en la figura 15, las retinas sometidas a isquemia –a pesar del tratamiento con ácido fólico– presentaron un grado de edema citoplásmico elevado; lo que no ocurrió con las retinas no sometidas a isquemia ($31,7 \pm 14,7$ vs $4 \pm 5,6$).

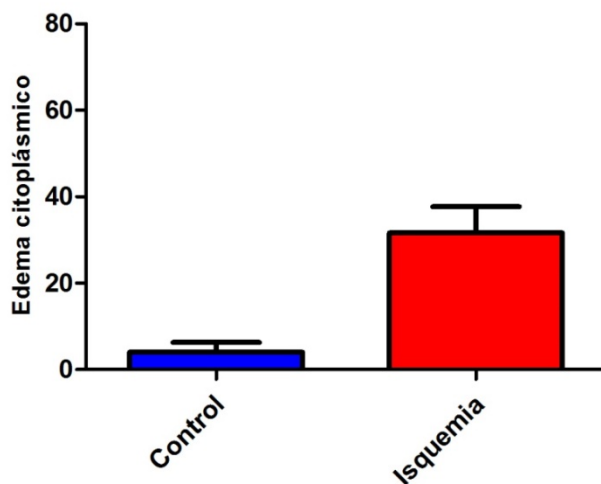


Figura 15. Edema citoplásmico en animales tratados con ácido fólico

Como se deduce de observar la desviación estándar, los resultados obtenidos presentan una amplia variabilidad (tabla 7), lo que no ha impedido que la diferencia encontrada alcance un alto grado de significación estadística ($p=0,005$).

Tabla 7. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con ácido fólico

	Retina normal	Retina isquémica
Animal 1	0	15
Animal 2	15	25
Animal 3	3	25
Animal 4	0	50
Animal 5	3	50
Animal 6	3	25

3.2. Tratamiento con alopurinol

Si nos fijamos en el daño histológico que se produce en el grupo de animales tratado con alopurinol, podemos observar un comportamiento similar, en el que no hay afectación en las retinas no sometidas al proceso de isquemia, mientras que las retinas que han sufrido isquemia presentan daño tanto estructural, como en los parámetros de edema citoplásmico y dendrítico.

En la figura 16 se puede observar como el edema citoplásmico está elevado en las retinas isquémicas y bajo en las retinas no isquémicas ($48,9 \pm 23,3$ vs $1,1 \pm 1,5$).

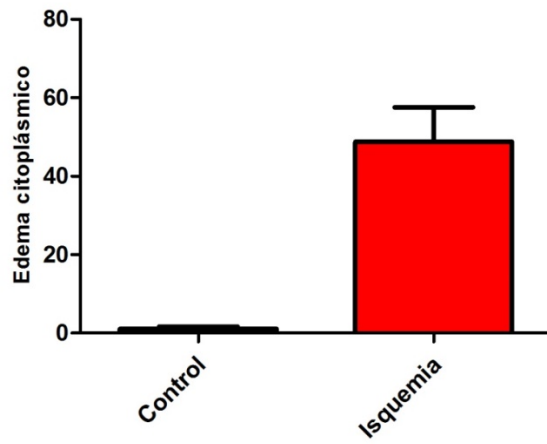


Figura 16. Edema citoplásmico en retinas de animales tratados con alopurinol

La diferencia entre los dos grupos alcanza significación estadística ($p=0.0005$), y los datos se exponen en la tabla 8.

Tabla 8. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con alopurinol

	Retina normal	Retina isquémica
Animal 1	0	15
Animal 2	0	50
Animal 3	3	50
Animal 4	0	25
Animal 5	0	50
Animal 6	0	100
Animal 7	3	50
Animal 8	3	50

3.3. Tratamiento con pravastatina

En cuanto al tratamiento con pravastatina, de nuevo objetivamos un patrón similar a los anteriores, con la aparición de daño histológico en todos los parámetros estudiados en las retinas sometidas a isquemia, que no se aprecia en las retinas que no han pasado por dicho proceso.

El edema citoplásmico es más acusado en las retinas que han sufrido isquemia ($56,1 \pm 46,5$ vs $0,9 \pm 1,4$) como se desprende de la figura 3.5, cuyos datos se recogen en la tabla 9.

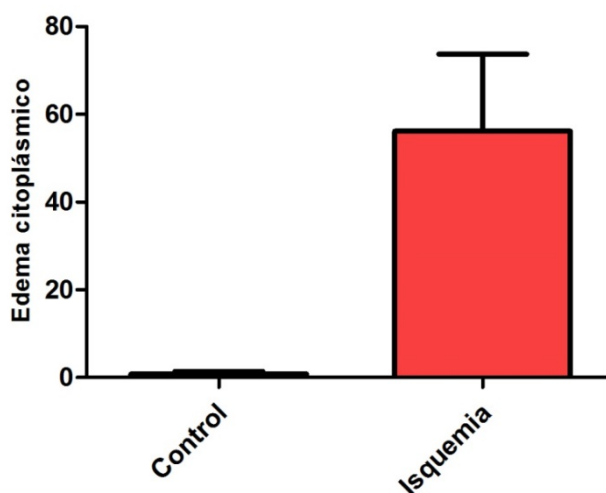


Figura 17. Edema citoplásmico en retinas de animales tratados con pravastatina

La diferencia también es estadísticamente significativa ($p=0.01$) en este grupo.

Tabla 9. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con pravastatina

	Retina normal	Retina isquémica
Animal 1	0	3
Animal 2	0	120
Animal 3	0	25
Animal 4	0	120
Animal 5	0	50
Animal 6	3	25
Animal 7	3	50

3.5. Tratamiento con trifluoperazina

En el grupo tratado con trifluoperazina, el daño histológico en las retinas sometidas a isquemia es muy superior al registrado en retinas sanas.

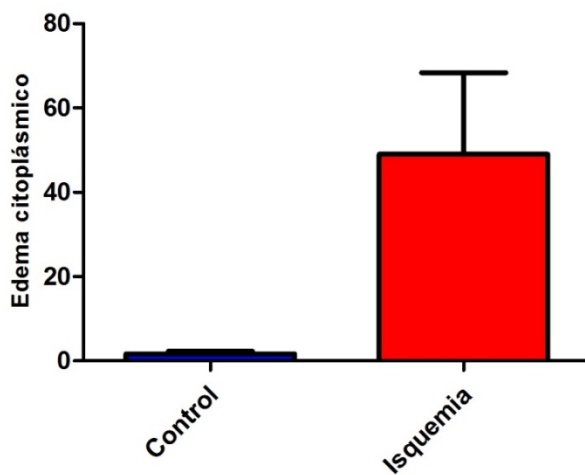


Figura 18. Edema citoplásmico en animales tratados con trifluoperazina

Podemos apreciar en la gráfica de la figura 18 cómo el edema citoplásmico en las retinas isquémicas es superior que en las no isquémicas ($49,1 \pm 47,4$ vs $1,7$ vs $1,6$) con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.02$).

Los resultados detallados de este grupo experimental se han recogido en la tabla 10.

Tabla 10. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con trifluoperazina

	Retina normal	Retina isquémica
Animal 1	0	0
Animal 2	3	120
Animal 3	0	25
Animal 4	3	25
Animal 5	0	3
Animal 6	3	50
Animal 7	3	120

3.6. Tratamiento con calmidazolio

Lo mismo ocurre con el grupo tratado con calmidazolio, en el cual las retinas isquémicas presentan mayor daño histológico.

En la gráfica de la figura 3.7 se ve reflejado el edema citoplásmico en el subgrupo de retinas sometidas a isquemia frente al que se produce en

las retinas no sometidas a isquemia ($40,6 \pm 29,7$ vs $1,5 \pm 1,6$) y también en este caso las diferencias alcanzan significación estadística ($p=0.003$).

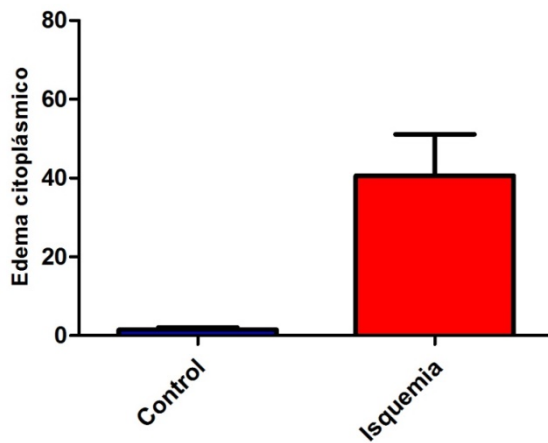


Figura 19. Edema citoplásmico en animales tratados con calmidazolio

Los valores de edema citoplásmico que obtuvimos al utilizar este fármaco están expuestos en la tabla 11.

Tabla 11. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con calmidazolio

	Retina normal	Retina isquémica
Animal 1	3	0
Animal 2	0	50
Animal 3	0	25
Animal 4	0	50
Animal 5	3	100
Animal 6	3	25
Animal 7	3	50
Animal 8	0	25

3.7. Tratamiento con nitroindazol

En este último caso, se sigue apreciando que el daño histológico es mayor en el grupo isquémico, aunque la diferencia es menor, lo que podría sugerir un efecto protector del nitroindazol en el proceso lesivo de la isquemia y reperfusión de la retina.

Al observar la gráfica de la figura 3.8, se puede apreciar que el edema citoplásmico muestra valores más altos en las retinas sometidas a isquemia que en las del subgrupo de no isquémicas ($19,9 \pm 16,3$ vs $4 \pm 9,3$); y la diferencia también alcanza significación estadística ($p=0.02$).

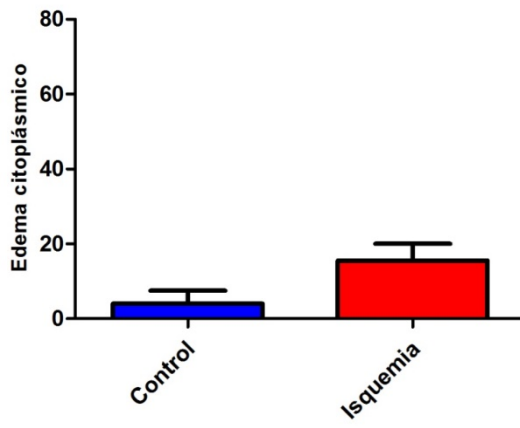


Figura 20. Edema citoplásmico en animales tratados con nitroindazol

Esta gráfica se ha obtenido de los datos presentados en la tabla 12.

Tabla 12. Índice de edema citoplásmico en las retinas de los animales tratados con nitroindazol

	Retina normal	Retina isquémica
Animal 1	0	25
Animal 2	25	25
Animal 3	0	25
Animal 4	0	3
Animal 5	0	25
Animal 6	3	3
Animal 7	0	3

4. Efecto de los fármacos sobre la retina

En este apartado analizamos el posible efecto de los fármacos utilizados en nuestro estudio sobre la retina no sometida a daño alguno. Para ello, hemos realizado un análisis ANOVA de los resultados obtenidos en las retinas contralaterales (no sometidas a isquemia) en los diferentes grupos experimentales. Con este estudio se busca responder a la pregunta de si alguno de los tratamientos ensayados resulta tóxico para la retina del animal.

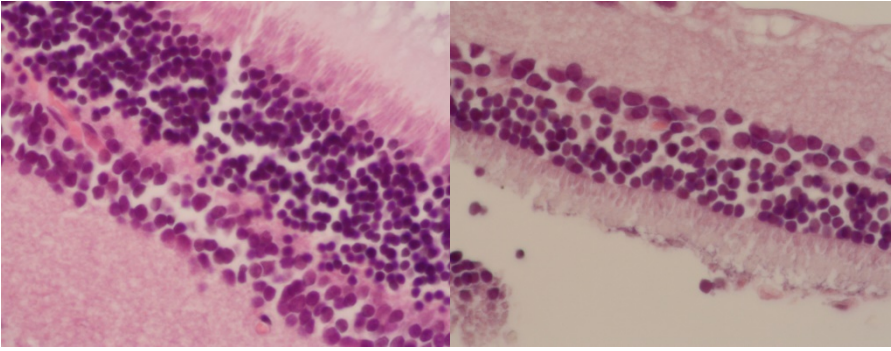


Figura 21. Retinas no sometidas a isquemia y tratadas con Trifluoperazina (izquierda) o Fólico (derecha).

Como puede verse en la figura 22, el daño que se aprecia en cualquiera de los grupos de retinas no isquémicas comparados entre sí no presenta ninguna diferencia estadísticamente significativa con la retina isquémica control. Si bien hay dos grupos cuyo grado de daño parece levemente mayor que el control (el grupo del fólico y el del nitroindazol), las diferencias no alcanzan en ningún caso significación estadística. En cambio, al compararlas con el daño que aparece en las retinas isquémicas control, se observa que el daño es mucho más elevado en estas últimas, con una diferencia claramente significativa.

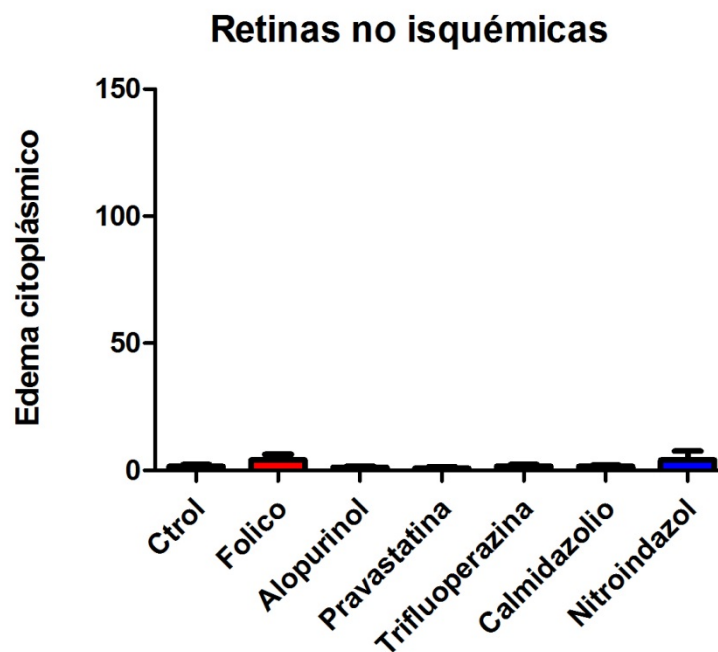


Figura 22. Efecto de los fármacos sobre la retina no sometida a isquemia.

Por lo tanto, podemos asumir que los fármacos no inducen por sí mismos una afectación de la retina.

5. Efecto de los fármacos sobre el daño por reperusión

En este apartado analizaremos el efecto producido por los diferentes fármacos sobre el daño asociado al síndrome de isquemia-reperusión utilizado en nuestro modelo experimental. Para ello, compararemos los índices de edema dendrítico en los diferentes grupos frente a los obtenidos en el grupo control.

Al analizar mediante un ANOVA los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales, se pone de manifiesto que ha existido un efecto reductor del daño, y que dicho efecto ha alcanzado significación estadística ($p < 0,05$; figura 23).

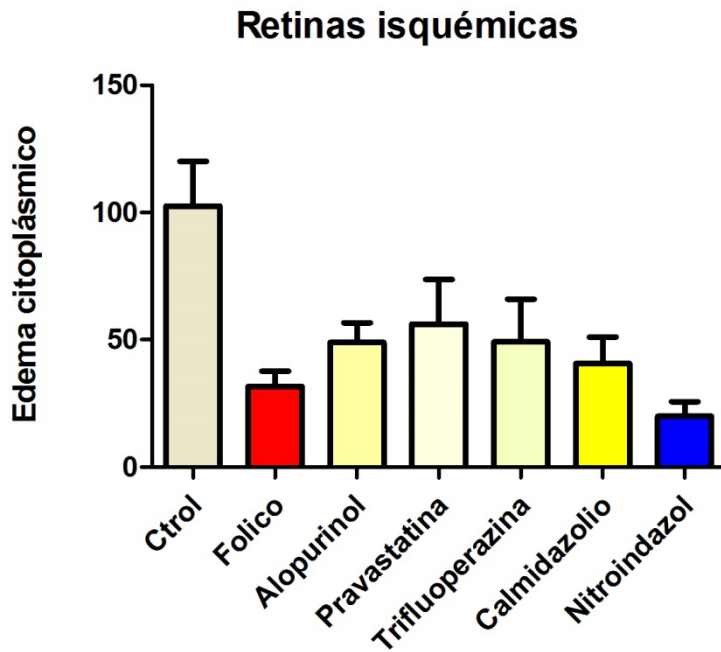


Figura 23. Efecto de los fármacos sobre la retina sometida a isquemia.

El análisis realizado a continuación mediante el Test de Comparación Múltiple de Newman-Keuls para valorar individualmente cada uno de los tratamientos, ha puesto de manifiesto que todos y cada uno de ellos han reducido significativamente el daño encontrado en las retinas sometidas a isquemia-reperfusión (tabla 13).

Tabla 13. Grado de daño (edema citoplásmico) en cada uno de los tratamientos.

<i>Edema citoplásmico</i>	Control	Fólico	Alopurinol	Pravas- tatina	Trifluoper- azina	Calmida- zolio	Nitroin- dazol
Media	102,50	31,67	48,89	56,14	49,13	40,63	19,88
<i>Desv. Est.r</i>	35,00	14,72	23,29	46,54	47,44	29,69	16,33

Vemos, sin embargo, que en dos de los tratamientos, la reducción es más intensa, de tal manera que el daño registrado no alcanza el 30% de lo observado en el grupo control: ácido fólico y nitroindazol (figura 24). De hecho, si comparamos este último con los demás tratamientos, vemos que la diferencia frente a la pravastatina y frente al alopurinol alcanza significación estadística ($p < 0,05$).

**Figura 24. Representación del grado de edema citoplásmico observado en las retinas isquémicas tratadas.**

Con todo, el daño, si bien se atenúa en cierta medida, no se evita completamente, y se siguen observando halos alrededor de los núcleos y signos de edema (figura 25). Dado el carácter agudo del experimento,

no hay evidencia de que el tratamiento haya prevenido un cierto grado de daño no reparable.

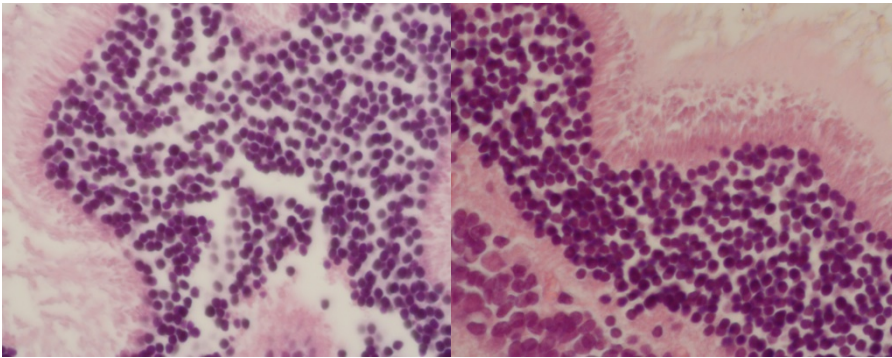


Figura 25. Efecto protector de la trifluoperazina sobre la retina de dos animales sometidos a isquemia y reperfusión.

Discusión

Situación inicial

Durante los últimos años ha habido un creciente interés en el estudio de la isquemia – reperfusión retiniana. Previamente al inicio de esta tesis, el número de publicaciones en este campo era muy pequeño. En los últimos años se han incrementado en gran medida los estudios sobre este tema.

El avance en el manejo de la isquemia – reperfusión en otros tejidos ha suscitado el interés por conseguir un mejor enfoque terapéutico de esta entidad en la retina, ya que los resultados funcionales han sido muy pobres históricamente, y la recuperación visual suele ser mala.

Análisis de nuestro modelo experimental

Animal de experimentación

En nuestro estudio, hemos elegido la rata como sujeto experimental por tener una distribución holoangiótica de la vascularización retiniana, que es la misma que está presente en los primates. Esto implica que los vasos recorren completamente la retina, desde su salida en el nervio

óptico hasta la periferia retiniana mediante sus múltiples ramificaciones. Además, es un animal de fácil disponibilidad y manejabilidad⁹².

Análisis del modelo utilizado

El modelo ideal para el estudio de una obstrucción de arteria central de la retina sería uno en el que consiguiésemos bloquear de forma reversible dicha arteria, y que nos permitiese conseguir una isquemia de la retina durante el tiempo deseado, y posteriormente la reperfusión del tejido⁹².

Una posible forma de interrumpir el flujo de la arteria central de la retina es la colocación de un clip vascular. Para ello, habría que acceder a la arteria central de la retina de la rata, conseguir disecarla y aislarla de las demás estructuras sin dañarlas, y colocar el clip. Este procedimiento es muy complicado de realizar y se producen muchas alteraciones de los tejidos adyacentes que no aparecen en la forma clínica de la obstrucción de la arteria central de la retina, por lo que nos podría dar una alteración en los resultados obtenidos y la extrapolación a la situación clínica real sería complicada.

Otra manera que se ha utilizado en estudios de isquemia – reperfusión es la embolización reversible de determinadas arterias mediante esferas, que pueden tratarse de trombos autólogos o estar compuestas de materiales sintéticos como el GelFoam, los cuales se pueden disolver en un momento determinado. Dichos compuestos se colocan mediante cateterismo de forma selectiva en la arteria que se quiere obstruir, y después se disuelven para dar paso a la reperfusión del tejido tributario de dicha arteria^{93,94}. Este tampoco es un procedimiento viable en la rata, ya que llegar a cateterizar la arteria central de la retina en animales de este tamaño es técnicamente imposible.

Se han descrito otros métodos de obtención de isquemia de la retina que tampoco son muy extrapolables a la situación clínica real. Por ejemplo, la oclusión selectiva de la arteria oftálmica o de las ramas arteriales previas a esta⁹⁵, que produce una isquemia de todas las capas

del globo ocular e incluye la interrupción del flujo sanguíneo en la rama ciliar; además, asocia un componente inflamatorio ocular que también distorsiona los resultados obtenidos. Otro ejemplo es la utilización de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina – 1, que se ha descrito inyectada tanto de forma intravítrea como subconjuntival⁹⁶, cuyo mecanismo de acción consisten en la vasoconstricción masiva de la arteria central de la retina y sus ramas; sin embargo, ocasiona isquemias de tiempo variable que no permiten crear un modelo reproducible en cuanto a tiempo de isquemia⁹². También se han realizado experimentos mediante la ligadura del nervio óptico, que puede causar daños indirectos debido a la interrupción del transporte neuronal y la posible ligadura de suministros sanguíneos colaterales⁹⁷.

La alternativa utilizada en este estudio es uno de los métodos más utilizados para este tipo de experimentos. El aumento de la presión intraocular por encima de la presión arterial produce el cese de la perfusión retiniana, de forma que podemos controlar el tiempo de isquemia y posteriormente podemos conseguir una reperfusión rápida de la retina en el momento en que lo decidamos.

El aspecto negativo de la utilización de este modelo es que la presión intraocular elevada también produce por sí misma unas alteraciones mecánicas sobre las células retinianas, que no estarían presentes en la situación clínica real de una obstrucción de arteria central de la retina. Sin embargo, al centrar el análisis en el daño agudo producido por la isquemia en las capas retinianas específicas que se alteran más precozmente, se minimizan los efectos derivados del daño mecánico; por lo que los resultados obtenidos se pueden extrapolar a las situaciones de isquemia retiniana que aparecen en la clínica.

Casos y controles

En nuestro estudio se han obtenido las retinas de los dos ojos, tanto la isquémica como la sana, para cada animal del experimento. De esta manera, se han obtenido muestras pareadas, con una retina control por cada retina sometida a isquemia.

Esto aumenta la potencia de los tests estadísticos, dando mayor fiabilidad a los resultados obtenidos. Además, ha permitido estudiar también la posible toxicidad que pudieran tener los fármacos utilizados en las retinas sanas obtenidas.

Sesgos

En el estudio se han tomado una serie de medidas con el fin de evitar posibles sesgos.

Como primera medida, las muestras estaban cegadas, de manera que el observador no sabía si la retina a analizar era la isquémica o la sana, ni el tratamiento que había recibido dicha retina. Los tratamientos que se han utilizado en el experimento estaban precargados en jeringas, que a su vez habían sido introducidas al azar en sobres con un número. Este número se registraba en cada experimento, y sólo después de haber hecho el análisis de las retinas se comprobó a qué tratamiento correspondía cada caso.

Todas las muestras han sido valoradas por un único observador, para evitar la variabilidad interindividual en el análisis de las retinas.

Evaluación del daño

En cuanto al método utilizado para la valoración del daño, se han utilizado cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina, ya que es una técnica de tinción ampliamente conocida y utilizada para el análisis de los tejidos.

Para la cuantificación del grado de afectación, se ha usado como referencia la escala de daño neuronal utilizada por Izumi y cols⁹¹ en la que se tenían en cuenta 3 parámetros: el daño general de la retina, el edema dendrítico de la capa plexiforme interna, y el número de células de la capa nuclear interna que mostraban signos de edema citoplásmico severo, que se traduce en la aparición de un halo de edema alrededor de los núcleos de las células afectadas.

En este punto hay que tener en cuenta que la propia técnica de extracción de la retina puede producir también una serie de daños en la retina, por lo que todo el proceso debe ser realizado con sumo cuidado para evitar en la medida de lo posible los artefactos que pudiera ocasionar la manipulación mecánica de la retina a analizar⁹¹. De nuevo, la extracción casi simultánea de la retina contralateral contribuye a minimizar los posibles errores derivados de un daño de extracción.

Momento de la inoculación del fármaco

La administración del fármaco se ha realizado cinco minutos antes del inicio de la reperfusión.

En algunos estudios⁹⁸⁻¹⁰⁰, los fármacos se administraron previamente al inicio de la isquemia, lo cual es altamente improbable que pueda suceder en la clínica, ya que no podemos prever cuándo va a ocurrir la OACR.

En este experimento, para poder extrapolar los resultados a la práctica clínica, se ha inoculado el medicamento justo antes de la restauración del flujo sanguíneo. Consideramos que este enfoque es el más adecuado si queremos valorar posibles usos terapéuticos.

Análisis de los resultados y comparación con los obtenidos en otros estudios

En nuestro estudio observamos que todos los fármacos utilizados han tenido un cierto efecto protector sobre la retina isquémica, aunque podemos apreciar dos grupos de respuestas a los fármacos. Un primer grupo, formado por Pravastatina, Calmidazolio y Alopurinol, consigue reducir el daño por isquemia – reperfusión en la retina de forma menos

notable que un segundo grupo, compuesto por el Ácido Fólico y el Nitroindazol, que frena en mayor medida el daño producido.

Los buenos resultados obtenidos con el ácido fólico son coherentes con lo publicado previamente en diferentes modelos de isquemia –reperusión en otros órganos, en los que ha demostrado su efecto protector frente al daño sobre los tejidos sometidos a isquemia –reperusión.

En cuanto al Nitroindazol, pensamos que la propia preparación del mismo puede potenciar su efecto beneficioso en los tejidos afectados por la isquemia, ya que al utilizar como vehículo un compuesto que es a su vez antioxidante los efectos de ambos se suman. Por lo tanto no es posible extraer de este estudio si el nitroindazol por sí mismo tiene ese efecto protector sobre la retina isquémica o si es el vehículo utilizado el que aporta el beneficio observado.

Durante los últimos años se han publicado una gran cantidad de estudios sobre la isquemia –reperusión retiniana en los que han apreciado efectos protectores de la retina mediante la utilización de otros productos como Selenio⁹⁸, Resveratrol⁹⁹, Quercetina¹⁰¹, Argón inhalado¹⁰², Hesperetina y Naringenina^{103,104}, Polisacáridos Lycium Barbarum^{105,106}, Minociclina¹⁰⁷, Bortezomib¹⁰⁸, Diosmina¹⁰⁹, α -MSH (alpha-Melanocyte-stimulating hormone)¹¹⁰, C-Phycocyanin¹¹¹, Curcumina^{112,113}, Inhibidor de Calpaína¹¹⁴, ATP¹⁰⁰, O₂ intravítreo¹¹⁵, Luteína¹¹⁶, Compuesto 49b¹¹⁷, Sildenafil¹¹⁸, Exendina – 4¹¹⁹, Monometil fumarato¹²⁰, Prothymosin-alpha¹²¹, Factor nuclear Box – 1^{122,123} y el derivado de imidazopiridina X22¹²⁴.

En muchos de estos estudios, la administración del fármaco se ha realizado anteriormente a la instauración de la isquemia. En la situación clínica de una obstrucción de arteria central de la retina, que supone una instauración brusca de isquemia aguda, no es posible ese planteamiento

como opción terapéutica. Sin embargo, todos esos compuestos nombrados han demostrado su efecto protector y pueden ser de utilidad en otros contextos clínicos que produzcan isquemias de tipo crónico como por ejemplo la retinopatía diabética o las obstrucciones venosas de la retina.

En nuestro experimento nos hemos centrado en la forma aguda de la isquemia de la retina, por lo que se han valorado los tratamientos que pudieran extrapolarse posteriormente al tratamiento en dichas situaciones.

En esos estudios que hemos mencionado, además, el análisis del daño que se ha producido en la retina isquémica se centra en alteraciones que se producen más a largo plazo.

Las alteraciones histológicas reconocibles más precoces están descritas en las capas plexiforme interna y nuclear interna^{91,125}. Histológicamente, en la primera se describe como un edema espongiiforme, consistente en la aparición de vacuolas a lo largo de los axones de las células que componen dicha capa. En cuanto a la capa nuclear interna, se aprecian los signos de un edema citoplásmico severo, que provoca que los núcleos aparezcan con un halo de edema alrededor, descritos como “en diana” o “en ojo de buey”⁹¹. Este daño inicial también se ha estudiado mediante otros métodos como por ejemplo la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral¹²⁵, demostrando que el engrosamiento que se produce en el grosor retiniano total en las retinas sometidas a isquemia – reperusión se produce fundamentalmente a expensas del engrosamiento de las capas plexiforme interna y nuclear interna, mientras que el engrosamiento de la capa plexiforme externa es mucho menor. Los hallazgos electrorretinográficos también confirman que el daño se produce inicialmente en las capas plexiforme y nuclear internas, ya que se aprecia una afectación más precoz de la onda b (de cuya aparición es responsable el estímulo eléctrico de dichas capas), mientras que la onda a (formada por el estímulo eléctrico de la capa de fotorreceptores) se altera de forma más tardía¹²⁵.

La afectación de otras capas de la retina, que se estudian en muchos de estos trabajos, son alteraciones que aparecen en tiempos más tardíos. Tras el edema de las capas plexiforme y nuclear internas, que dura entre 3 y 7 días tras la restauración del flujo sanguíneo, se describen otros cambios histológicos: por un lado el adelgazamiento y la atrofia de las capas internas de la retina, y por otro lado la pérdida de células ganglionares de la retina¹²⁵, que es la que es objeto de estudio habitualmente en los estudios recientes¹²⁶. En última instancia se produce una desorganización de las células en la capa plexiforme externa y finalmente la alteración de la densidad vascular capilar de la retina, evidente a partir de los 14 días desde el insulto isquémico¹²⁶.

Nosotros hemos preferido analizar el daño que se produce a corto plazo, los daños más precoces observables en la retina isquémica, y en la posibilidad de revertir esa afectación inicial con la esperanza de que se traduzca en una mejor conservación del tejido posteriormente, con menor aparición de alteración diferida de la retina y un mejor resultado funcional visual.

De todos los fármacos que se han estudiado en el campo de la isquemia – reperfusión retiniana, los más conocidos son el Selenio y el Resveratrol. Estos fármacos han adquirido una importancia creciente en la actualidad por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y apoptóticas, y se han empleado en diferentes especialidades médicas para el tratamiento de distintas patologías tanto isquémicas como inflamatorias.

El Selenio es un oligoelemento presente en la dieta, con altas propiedades antioxidantes, y al que se atribuye gran capacidad neuroprotectora. Su actividad se basa en un efecto análogo a la glutatión peroxidasa, y en la reducción de las hidroperoxidasas y las lipoperoxidasas. En el estudio de Yazici y cols⁹⁸, el Selenio administrado de forma intraperitoneal disminuyó el daño retiniano producido por la isquemia – reperfusión de la retina tanto en el grupo en el que se administró previamente al insulto isquémico, como en el que se

administró después de instaurarse la isquemia. De los dos grupos, los mejores resultados se obtuvieron cuando el Selenio se había administrado previamente, con diferencias significativas con el otro grupo en todos los parámetros de daño estudiados. A su vez, este segundo grupo también mostró diferencias significativas con el grupo control en los parámetros estudiados. En el análisis histológico de la retina, se centraron fundamentalmente en el análisis de la capa de células ganglionares. Las retinas fueron extraídas después de 24 horas de reperfusión.

En cuanto al Resveratrol, es también un potente antioxidante, presente en altas concentraciones en la uva. En el estudio de Liu y cols⁹⁹ determinaron que las vías mediante las cuales esta molécula conseguía un efecto protector en la isquemia – reperfusión de la retina consistían en la reducción de la acción de la Metaloproteinasa de matriz MMP – 9, de la Óxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS), y del incremento en la acción de la Hemooxigenasa – 1 (HO – 1). La forma de administración fue intravítrea, en un grupo 15 minutos antes de la isquemia y en el otro 15 minutos después de la instauración de la misma. Los datos analizados fueron obtenidos tras 24 horas de reperfusión. Finalmente concluyen que tanto las retinas tratadas previamente a la isquemia como las que fueron tratadas tras la instauración de la misma mostraban diferencias significativas frente al grupo control. En este caso, no encuentran diferencias significativas entre los diferentes grupos según el momento de la inoculación.

Consideraciones en la práctica clínica

Ante los resultados obtenidos en este estudio, y ante la evidencia científica creciente en este campo, podría ser recomendable considerar

el tratamiento con este tipo de fármacos en las entidades isquémicas agudas de la retina, asociado al restablecimiento del flujo sanguíneo.

Serían necesarios nuevos estudios que analizaran estos fármacos como tratamiento complementario en las obstrucciones de la arteria, para saber si tienen un efecto beneficioso en la recuperación funcional visual del paciente.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. El modelo utilizado es sencillo, fiable y reproducible para el análisis de la isquemia – reperusión retiniana.
2. El daño producido es potencialmente reversible, por lo que permite realizar ensayos terapéuticos.
3. La escala de medida del daño histológico permite evaluar el daño celular inicial de la retina, y ver las diferencias que aparecen tras la administración de medicamentos que protegen a la retina de la isquemia – reperusión.
4. Todos los fármacos utilizados en nuestro trabajo han demostrado un cierto efecto protector sobre la retina sometida a isquemia – reperusión, sobre todo el ácido fólico y el nitroindazol.
5. Se requieren futuros estudios en situaciones clínicas reales para comprobar si estos tratamientos se traducen en una mejoría funcional visual.

Bibliografía

1. Boyd, S. in *Enfermedades y Cirugía Vitreorretiniana* (Jaypee Highlights Medical Publishers, Inc., 2010).
2. Campochiaro, P. A. Molecular Pathogenesis of Retinal and Choroidal Vascular Diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* **49**, 67–81 (2015).
3. Delmas, A & Rouvière, H. *Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional. I*, (Masson, 2005).
4. Osborne, N. N. *et al.* Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye Res.* **23**, 91–147 (2004).
5. Hofman, P., van Blijswijk, B. C., Gaillard, P. J., Vrensen, G. F. & Schlingemann, R. O. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **119**, 861–866 (2001).
6. Vincent, K. A., Feron, O. & Kelly, R. A. Harnessing the response to tissue hypoxia: HIF-1 alpha and therapeutic angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 362–367 (2002).
7. Luty, G. A. & McLeod, D. S. Retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy: a role for adenosine. *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 95–111 (2003).
8. Winkler, B. S., Pourcho, R. G., Starnes, C., Slocum, J. & Slocum, N. Metabolic mapping in mammalian retina: a biochemical and 3H-2-deoxyglucose autoradiographic study. *Exp. Eye Res.* **77**, 327–337 (2003).
9. Lipton, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* **79**, 1431–1568 (1999).
10. Schwartz-Bloom, R. D. & Sah, R. gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **77**, 353–371 (2001).
11. Morgan, J. E. Optic nerve head structure in glaucoma: astrocytes as mediators of axonal damage. *Eye* **14 (Pt 3B)**, 437–444 (2000).

12. Zeevalk, G. D. & Nicklas, W. J. Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 1285–1292 (1990).
13. Osborne, N. N. *et al.* Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* **43 Suppl 1**, S102-128 (1999).
14. Mori, H. & Mishina, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* **34**, 1219–1237 (1995).
15. Frago, G. & López-Colomé, A. M. Excitatory amino acid-induced inositol phosphate formation in cultured retinal pigment epithelium. *Vis. Neurosci.* **16**, 263–269 (1999).
16. Orlando, L. R., Alsdorf, S. A., Penney, J. B. & Young, A. B. The role of group I and group II metabotropic glutamate receptors in modulation of striatal NMDA and quinolinic acid toxicity. *Exp. Neurol.* **167**, 196–204 (2001).
17. Ruppin, E. & Reggia, J. A. Cortical spreading depression and the pathogenesis of brain disorders: a computational and neural network-based investigation. *Neurol. Res.* **23**, 447–456 (2001).
18. Sattler, R. & Tymianski, M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* **24**, 107–129 (2001).
19. Nakamichi, N., Chidlow, G. & Osborne, N. N. Effects of intraocular injection of a low concentration of zinc on the rat retina. *Neuropharmacology* **45**, 637–648 (2003).
20. Bonne, C., Muller, A. & Villain, M. Free radicals in retinal ischemia. *Gen. Pharmacol.* **30**, 275–280 (1998).
21. Danton, G. H. & Dietrich, W. D. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 127–136 (2003).
22. Stoll, G., Jander, S. & Schroeter, M. Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* **513**, 87–113 (2002).

23. Poljakovic, M., Nygren, J. M. & Persson, K. Signalling pathways regulating inducible nitric oxide synthase expression in human kidney epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **469**, 21–28 (2003).
24. Siesjö, B. K., Katsura, K. & Kristián, T. Acidosis-related damage. *Adv. Neurol.* **71**, 209-233; discussion 234-236 (1996).
25. Staub, F., Mackert, B., Kempfski, O., Peters, J. & Baethmann, A. Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J. Neurol. Sci.* **119**, 79–84 (1993).
26. Sakamoto, K., Kuwagata, M., Nakahara, T. & Ishii, K. Late preconditioning in rat retina: involvement of adenosine and ATP-sensitive K(+) channel. *Eur. J. Pharmacol.* **418**, 89–93 (2001).
27. Casson, R. J., Wood, J. P. M., Melena, J., Chidlow, G. & Osborne, N. N. The effect of ischemic preconditioning on light-induced photoreceptor injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1348–1354 (2003).
28. Katai, N. & Yoshimura, N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 2697–2705 (1999).
29. Kurokawa, T. *et al.* BDNF diminishes caspase-2 but not c-Jun immunoreactivity of neurons in retinal ganglion cell layer after transient ischemia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 3006–3011 (1999).
30. Ju, W. K. *et al.* Up-regulated eNOS protects blood-retinal barrier in the L-arginine treated ischemic rat retina. *Neuroreport* **12**, 2405–2409 (2001).
31. Ettaiche, M., Fillacier, K., Widmann, C., Heurteaux, C. & Lazdunski, M. Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 729–736 (1999).
32. Zhou, Y., Lindner, L. E., Chiou, G. C., Morgan, K. P. & Li, Z. Transient retinal ischemia-reperfusion in rats. *Chin. Med. J. (Engl.)* **113**, 461–465 (2000).
33. Paques, M. *et al.* Superselective ophthalmic artery fibrinolytic therapy for the treatment of central retinal vein occlusion. *Br. J. Ophthalmol.* **84**, 1387–1391 (2000).

34. Beiran, I. *et al.* Early hyperbaric oxygen therapy for retinal artery occlusion. *Eur. J. Ophthalmol.* **11**, 345–350 (2001).
35. Wilson, C. A., Berkowitz, B. A. & Srebro, R. Perfluorinated organic liquid as an intraocular oxygen reservoir for the ischemic retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 131–141 (1995).
36. Ben-Nun, J., Alder, V. A., Cringle, S. J. & Constable, I. J. A new method for oxygen supply to acute ischemic retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **29**, 298–304 (1988).
37. Blair, N. P. *et al.* Limitation of retinal injury by vitreoperfusion initiated after onset of ischemia. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **109**, 113–118 (1991).
38. Bull, N. D. & Barnett, N. L. Antagonists of protein kinase C inhibit rat retinal glutamate transport activity in situ. *J. Neurochem.* **81**, 472–480 (2002).
39. Seo, S. Y. *et al.* Complestatin is a noncompetitive peptide antagonist of N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainate receptors: secure blockade of ischemic neuronal death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 377–384 (2001).
40. Cao, W. *et al.* Effects of dextromethorphan on ischemia induced electroretinogram changes in rabbit. *Curr. Eye Res.* **13**, 97–102 (1994).
41. Muller, A. *et al.* Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp. Eye Res.* **64**, 637–643 (1997).
42. Block, F. & Schwarz, M. Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction. *Exp. Eye Res.* **64**, 559–564 (1997).
43. Chidlow, G., Schmidt, K.-G., Wood, J. P. M., Melena, J. & Osborne, N. N. Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology* **43**, 1015–1025 (2002).
44. Yamamoto, F., Hiroi, K. & Honda, Y. Effects of intravenous superoxide dismutase and catalase on electroretinogram in the cat postischemic retina. *Ophthalmic Res.* **26**, 163–168 (1994).

45. Kim, S. Y., Kwak, J. S., Shin, J. P. & Lee, S. H. The protection of the retina from ischemic injury by the free radical scavenger EGb 761 and zinc in the cat retina. *Ophthalmol. J. Int. Ophthalmol. Int. J. Ophthalmol. Z. Augenheilkd.* **212**, 268–274 (1998).
46. Kuriyama, H., Waki, M., Nakagawa, M. & Tsuda, M. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage. *Ophthalmic Res.* **33**, 196–202 (2001).
47. Banin, E., Berenshtein, E., Kitrossky, N., Pe'er, J. & Chevion, M. Gallium-desferrioxamine protects the cat retina against injury after ischemia and reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 315–323 (2000).
48. Gupta, L. Y. & Marmor, M. F. Mannitol, dextromethorphan, and catalase minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **111**, 384–388 (1993).
49. Peachey, N. S., Green, D. J. & Ripps, H. Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 58–65 (1993).
50. Szabo, M. E. *et al.* Antioxidant properties of calcium dobesilate in ischemic/reperfused diabetic rat retina. *Eur. J. Pharmacol.* **428**, 277–286 (2001).
51. Nash, M. S., Wood, J. P., Melena, J. & Osborne, N. N. Flupirtine ameliorates ischaemic-like death of rat retinal ganglion cells by preventing calcium influx. *Brain Res.* **856**, 236–239 (2000).
52. Mohand-Said, S. *et al.* Protective effect of trimetazidine in a model of ischemia-reperfusion in the rat retina. *Ophthalmic Res.* **34**, 300–305 (2002).
53. Osborne, N. N., Wood, J. P. M., Cupido, A., Melena, J. & Chidlow, G. Topical flunarizine reduces IOP and protects the retina against ischemia-excitotoxicity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1456–1464 (2002).

54. Toriu, N. *et al.* Lomerizine, a Ca²⁺ channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Exp. Eye Res.* **70**, 475–484 (2000).
55. Wood, J. P. M. *et al.* The beta-adrenoceptor antagonists metipranolol and timolol are retinal neuroprotectants: comparison with betaxolol. *Exp. Eye Res.* **76**, 505–516 (2003).
56. Dib, M. Amyotrophic lateral sclerosis: progress and prospects for treatment. *Drugs* **63**, 289–310 (2003).
57. Yoneda, S., Tanaka, E., Goto, W., Ota, T. & Hara, H. Topiramate reduces excitotoxic and ischemic injury in the rat retina. *Brain Res.* **967**, 257–266 (2003).
58. Morin, D., Hauet, T., Spedding, M. & Tillement, J. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 151–174 (2001).
59. Alagoz, G. *et al.* L-carnitine in experimental retinal ischemia-reperfusion injury. *Ophthalmol. J. Int. Ophtalmol. Int. J. Ophthalmol. Z. Augenheilkd.* **216**, 144–150 (2002).
60. Lai, R. K. *et al.* Alpha-2 adrenoceptor agonist protects retinal function after acute retinal ischemic injury in the rat. *Vis. Neurosci.* **19**, 175–185 (2002).
61. Leker, R. R. & Shohami, E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **39**, 55–73 (2002).
62. Li, Y., Roth, S., Laser, M., Ma, J. & Crosson, C. E. Retinal preconditioning and the induction of heat-shock protein 27. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1299–1304 (2003).
63. Yoneda, S. *et al.* Interleukin-1beta mediates ischemic injury in the rat retina. *Exp. Eye Res.* **73**, 661–667 (2001).
64. Wood, J. P. & Osborne, N. N. The influence of zinc on caspase-3 and DNA breakdown in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* **119**, 81–88 (2001).
65. Junk, A. K. *et al.* Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10659–10664 (2002).

66. Li, B. & Roth, S. Retinal ischemic preconditioning in the rat: requirement for adenosine and repetitive induction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1200–1216 (1999).
67. Varma, D. D., Cugati, S., Lee, A. W. & Chen, C. S. A review of central retinal artery occlusion: clinical presentation and management. *Eye* **27**, 688–697 (2013).
68. Callizo, J. *et al.* Cardiovascular Risk Factors in Central Retinal Artery Occlusion: Results of a Prospective and Standardized Medical Examination. *Ophthalmology* **122**, 1881–1888 (2015).
69. Cahill, M. *et al.* Raised plasma homocysteine as a risk factor for retinal vascular occlusive disease. *Br. J. Ophthalmol.* **84**, 154–157 (2000).
70. Lozano López, V *et al.* Tratamiento actualizado de la obstrucción de arteria central de la retina.
71. Laurence L Brunton, Bruce A Chabner & Bjorn C Knollmann. *Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapy.* (McGraw-Hill Education, 2011).
72. Parks, D. A. & Granger, D. N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **548**, 87–99 (1986).
73. Reilly, P. M., Schiller, H. J. & Bulkley, G. B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* **161**, 488–503 (1991).
74. Granger, D. N., McCord, J. M., Parks, D. A. & Hollwarth, M. E. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* **90**, 80–84 (1986).
75. Lewis, A. S., Murphy, L., McCalla, C., Fleary, M. & Purcell, S. Inhibition of mammalian xanthine oxidase by folate compounds and amethopterin. *J. Biol. Chem.* **259**, 12–15 (1984).
76. Portugal, V., García-Alonso, I., Barceló, P. & Méndez, J. Effect of allopurinol, folinic acid, SOD and cyclosporine A on ischemic liver regeneration. *Eur. Surg. Res. Eur. Chir. Forsch. Rech. Chir. Eur.* **27**, 69–76 (1995).

77. Portugal, V., García-Alonso, I. & Méndez, J. Hepatotrophic effect of folinic acid in rats. *J. Surg. Res.* **61**, 527–530 (1996).
78. Jiang, M. H., Kaku, T., Hada, J. & Hayashi, Y. 7-Nitroindazole reduces nitric oxide concentration in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* **380**, 117–121 (1999).
79. Sunagawa, M. *et al.* Direct block of Ca²⁺ channels by calmidazolium in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34**, 488–496 (1999).
80. Menéndez, L., Baamonde, A. & Hidalgo, A. Spinal effects of the calmodulin inhibitor calmidazolium on dorsal horn neurons in the rat. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* **59**, 31–35 (1999).
81. Dimmeler, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601–605 (1999).
82. Riveros, E. *et al.* El pretratamiento con alopurinol disminuye la translocación bacteriana y atenúa los cambios morfológicos de la mucosa intestinal en un modelo de isquemia-reperfusión intestinal en ratas. *Rev. Colomb. Cir.* (2012).
83. Montero, R. *Tratado de Transplantes de Órganos. Volumen 1 y 2.* **1**, (Aran Ediciones, 2006).
84. Yeh, C.-T. *et al.* Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 1180–1188 (2012).
85. Chaudhuri, S. *et al.* Effect of trifluoperazine on toxicity, HIF-1 α induction and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **264**, 192–201 (2012).
86. Hong, D. H. *et al.* The calmodulin inhibitor and antipsychotic drug trifluoperazine inhibits voltage-dependent K⁺ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 321–325 (2014).
87. Liu, S., Han, Y., Zhang, T. & Yang, Z. Protective effect of trifluoperazine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res. Bull.* **84**, 183–188 (2011).

88. Castaño, M. Papel de la pravastatina en el daño miocárdico por isquemia y reperfusión. (Universidad de Salamanca, 2010).
89. Schmeer, C., Gámez, A., Tausch, S., Witte, O. W. & Isenmann, S. Statins modulate heat shock protein expression and enhance retinal ganglion cell survival after transient retinal ischemia/reperfusion in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 4971–4981 (2008).
90. Miltenyi Biotec. Dissection of retinas. (2009).
91. Izumi, Y. *et al.* Comparison of Rat Retinal Fixation Techniques: Chemical Fixation and Microwave Irradiation. *Exp. Eye Res.* **70**, 191–198 (2000).
92. Minhas, G. & Anand, A. in *Brain Injury - Pathogenesis, Monitoring, Recovery and Management* (Amit Agrawal, 2012).
93. Senkichi, J. Agentes de embolización. *Intervencionismo* **16 (1)**, 16–26 (2016).
94. Vaidya, S., Tozer, K. R. & Chen, J. An Overview of Embolic Agents. *Semin. Interv. Radiol.* **25**, 204–215 (2008).
95. Minhas, G., Morishita, R., Shimamura, M., Bansal, R. & Anand, A. Modeling transient retinal ischemia in mouse by ligation of pterygopalatine artery. *Ann. Neurosci.* **22**, 222–225 (2015).
96. Masuzawa, K. *et al.* A model of retinal ischemia-reperfusion injury in rats by subconjunctival injection of endothelin-1. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **231**, 1085–1089 (2006).
97. Niwa, M. *et al.* Retinal Cell Degeneration in Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
98. Yazici, A. *et al.* Comparison of pre-treatment and post-treatment use of selenium in retinal ischemia reperfusion injury. *Int. J. Ophthalmol.* **8**, 263–268 (2015).
99. Liu, X.-Q. *et al.* Resveratrol mitigates rat retinal ischemic injury: the roles of matrix metalloproteinase-9, inducible nitric oxide, and heme oxygenase-1. *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* **29**, 33–40 (2013).
100. Dvorianchikova, G., Barakat, D. J., Hernandez, E., Shestopalov, V. I. & Ivanov, D. Liposome-delivered ATP effectively protects the

retina against ischemia-reperfusion injury. *Mol. Vis.* **16**, 2882–2890 (2010).

101. Arikan, S. *et al.* Quercetin protects the retina by reducing apoptosis due to ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Arq. Bras. Oftalmol.* **78**, 100–104 (2015).
102. Ulbrich, F. *et al.* Argon inhalation attenuates retinal apoptosis after ischemia/reperfusion injury in a time- and dose-dependent manner in rats. *PLoS One* **9**, e115984 (2014).
103. Kara, S. *et al.* Protective effect of hesperetin and naringenin against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced retinal injury in rats. *ScientificWorldJournal* **2014**, 797824 (2014).
104. Shimouchi, A. *et al.* Neuroprotective effect of water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury. *Jpn. J. Ophthalmol.* **60**, 51–61 (2016).
105. He, M. *et al.* Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage. *PLoS One* **9**, e84800 (2014).
106. Li, S.-Y. *et al.* Lycium barbarum polysaccharides reduce neuronal damage, blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* **6**, e16380 (2011).
107. Abcouwer, S. F. *et al.* Minocycline prevents retinal inflammation and vascular permeability following ischemia-reperfusion injury. *J. Neuroinflammation* **10**, 149 (2013).
108. Chen, F.-T., Yang, C.-M. & Yang, C.-H. The protective effects of the proteasome inhibitor bortezomib (velcade) on ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *PLoS One* **8**, e64262 (2013).
109. Tong, N. *et al.* Diosmin alleviates retinal edema by protecting the blood-retinal barrier and reducing retinal vascular permeability during ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* **8**, e61794 (2013).
110. Varga, B. *et al.* Protective effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) on the recovery of ischemia/reperfusion (I/R)-induced retinal damage in a rat model. *J. Mol. Neurosci. MN* **50**, 558–570 (2013).

111. Marín-Prida, J. *et al.* C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca²⁺/phosphate-induced impairment. *Brain Res. Bull.* **89**, 159–167 (2012).
112. Zhang, H.-J. *et al.* Effects of curcumin on interleukin-23 and interleukin-17 expression in rat retina after retinal ischemia-reperfusion injury. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 9223–9231 (2015).
113. Wang, L. *et al.* Curcumin inhibits neuronal and vascular degeneration in retina after ischemia and reperfusion injury. *PLoS One* **6**, e23194 (2011).
114. David, J. *et al.* A novel calpain inhibitor for treatment of transient retinal ischemia in the rat. *Neuroreport* **22**, 633–636 (2011).
115. Abdallah, W. *et al.* Vitreal oxygenation in retinal ischemia reperfusion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 1035–1042 (2011).
116. Fung, F. K. C., Law, B. Y. K. & Lo, A. C. Y. Lutein Attenuates Both Apoptosis and Autophagy upon Cobalt (II) Chloride-Induced Hypoxia in Rat Müller Cells. *PLoS ONE* **11**, e0167828 (2016).
117. Liu, L., Jiang, Y. & Steinle, J. J. Compound 49b Restores Retinal Thickness and Reduces Degenerate Capillaries in the Rat Retina following Ischemia/Reperfusion. *PLoS ONE* **11**, e0159532 (2016).
118. Ezra-Elia, R. *et al.* Functional and Structural Evaluation of Sildenafil in a Rat Model of Acute Retinal Ischemia/Reperfusion Injury. *Curr. Eye Res.* **0**, 1–10 (2016).
119. Gonçalves, A. *et al.* Protective Effect of a GLP-1 Analog on Ischemia-Reperfusion Induced Blood–Retinal Barrier Breakdown and Inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 2584–2592 (2016).
120. Cho, H., Hartsock, M. J., Xu, Z., He, M. & Duh, E. J. Monomethyl fumarate promotes Nrf2-dependent neuroprotection in retinal ischemia-reperfusion. *J. Neuroinflammation* **12**, 239 (2015).
121. Halder, S. K., Matsunaga, H., Ishii, K. J. & Ueda, H. Prothymosin- α preconditioning activates TLR4–TRIF signaling to induce protection of ischemic retina. *J. Neurochem.* **135**, 1161–1177 (2015).

122. Sakamoto, K. *et al.* High-mobility group Box-1 is involved in NMDA-induced retinal injury the in rat retina. *Exp. Eye Res.* **137**, 63–70 (2015).
123. Dvorianchikova, G. *et al.* The high-mobility group box-1 nuclear factor mediates retinal injury after ischemia reperfusion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 7187–7194 (2011).
124. Bian, Y. *et al.* A novel imidazopyridine derivative, X22, prevents the retinal ischemia-reperfusion injury via inhibition of MAPKs. *Exp. Eye Res.* **135**, 26–36 (2015).
125. Kim, B.-J., Braun, T. A., Wordinger, R. J. & Clark, A. F. Progressive morphological changes and impaired retinal function associated with temporal regulation of gene expression after retinal ischemia/reperfusion injury in mice. *Mol. Neurodegener.* **8**, 21 (2013).
126. Nakahara, T. *et al.* Structural and functional changes in retinal vasculature induced by retinal ischemia-reperfusion in rats. *Exp. Eye Res.* **135**, 134–145 (2015).