

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

ESTADO OXIDATIVO-METABÓLICO Y AFECTACIÓN
RETINIANA EN DIABETES MELLITUS E HIPERTENSIÓN
ARTERIAL. SEGUIMIENTO A CINCO AÑOS

JOSÉ JAVIER GARCÍA MEDINA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 de
Desembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Santiago Grisolí García
- D. Manuel Vidal Sanz
- D^a. Elena Vecino Cordero
- D. José García Arumi
- D. Vicente Vila Bou

Va ser dirigida per:

D^a. María Dolores Pinazo Durán

©Copyright: Servei de Publicacions
José Javier García Medina

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6471-6

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA



**ESTADO OXIDATIVO-
METABÓLICO Y AFECTACIÓN
RETINIANA EN
DIABETES MELLITUS E
HIPERTENSIÓN ARTERIAL.
SEGUIMIENTO A CINCO AÑOS.**

Trabajo de investigación que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía

D. José Javier García Medina

para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Dirección de la tesis: **Dra. Dña. María Dolores Pinazo Durán**

Fotografía de portada:

Retinopatía hipertensiva al principio (leve) y al final del seguimiento (severa) en un individuo no sometido a suplementación micronutricional en el presente estudio.

**A mis padres,
Fali y Lola, por
dármelo todo en esta
vida.**

**A mi hermano Mano,
por su constante e
infatigable estímulo.**

Agradecimientos

A la Dra. María Dolores Pinazo Durán que ha sido el alma de este proyecto. Sin su estímulo incondicional y su criterio no hubiese sido posible. Gracias por haberme introducido en la investigación biomédica y enseñado la importancia del espíritu crítico en todo momento. Gracias también por hacer que las largas y arduas horas de trabajo se convirtieran en gratos momentos.

Al Prof. Dr. Vicente Vila Bou por haber sido mi maestro no sólo en Oftalmología sino en tantas otras cosas. Sus acertadas consideraciones sobre el presente trabajo han sido muy fructíferas.

Al Prof. Dr. José González Tomás por habernos enseñado a todos sus discípulos una forma resolutiva y elegante de abordar los problemas clínicos y quirúrgicos.

Una forma que crea escuela.

A los Doctores Miguel Martín, M^a Ángeles Moreno Nadal, Amadeo Monleón Arizmendiarieta, Eduardo Martínez Nadal, Pilar Marco Ventura, Pedro Sanz Solana y José González Vidal, todos ellos médicos adjuntos del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia, lugar donde me he formado científica, pero sobre todo, humanamente. Gracias por su infinita paciencia.

A la Prof. Dra. Antonia Fons Moreno, tutora de la Universidad de Valencia, por la revisión del texto y sus amables consejos.

A la Dra. Maite Arbona Nadal y demás residentes con los que he convivido durante esta etapa que ahora termina, por su inquebrantable compañerismo.

A Vicente Zanón Moreno por haberme introducido en el complicado y apasionante mundo de las técnicas de laboratorio.

Al Dr. Santiago Juan Agüera por sus consejos certeros acerca de la investigación científica y acerca de otras muchas cuestiones.

Al Dr. Antonio Lleó por su ayuda en el tratamiento estadístico de la enorme cantidad de datos de este trabajo.

A Naciba Zetchi y Antonio Martín, Brand Managers de Novartis Ophthalmics, por su decidido apoyo al proyecto. Igualmente, agradecerle a Enric Canelles, Director General de Novartis Ophthalmics España, haber iniciado todo.

A los doctores Cristina Verdejo, Pilar Marco, Josefina Calvet-Henry, Adela Zaragoza, Rosabel Bosch, Eduardo Andreu, Ana Castelló, Catalina Navarro, María Ángeles Bort, Mercedes Pérez-Ramos, Catalina Palop, Maria Ángeles Galotto, Ignacio Vinuesa, Lucía Martínez Costa, Roberto Gallego-Pinazo, Antonio Lleó Perez, Vicente Zanón, Sheila Pons y Prof. José González Tomás, miembros del Grupo Multicéntrico para el Estudio de las Retinopatías Vasculares, por su inestimable colaboración.

Este estudio ha sido realizado, en parte, con la ayuda de una beca de investigación biomédica otorgada por Novartis Ophthalmics entre 2000-2004 y por cuatro becas sucesivas de investigación en “Análisis de factores de riesgo para las retinopatías vasculares” concedidas por la Escuela Valenciana de Estudios Sanitarios (EVES) de la Generalitat Valenciana y otorgadas en los años 2001, 2002, 2003 y 2004.

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

Abreviaturas y Fórmulas más utilizadas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGE s	Advanced Glycation End-Products
AGP	Ácidos Grasos Poliinsaturados
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
AMP	Adenosina Monofosfato
AOXT	Antioxidante Total
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVMMC	Agudeza Visual Media Mejor Corregida
CAT	Catalasa
DM	Diabetes Mellitus
ECA	Enzima convertidora de Angiotensina
EPR	Epitelio Pigmentario de la Retina
EROX	Especies Reactivas del Oxígeno
Fe ⁺³	Hierro oxidado
FGF	Fibroblast Growth Factor
GC	Grupo de sujetos sanos (Controles)
GDM	Grupo de pacientes diabéticos
GHT	Grupo de pacientes hipertensos
GPx	Glutation Peroxidasa
GRD	Grupo de pacientes con retinopatía diabética
GRH	Grupo de pacientes con retinopatía hipertensiva
G no RD	Grupo de pacientes sin retinopatía diabética
G no RH	Grupo de pacientes sin retinopatía hipertensiva
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno (Agua Oxigenada)
HbA _{1c}	Hemoglobina Glicosilada
HDL	High Density Lipoprotein
4HNE	4 Hidroxinonenal
HTA	Hipertensión Arterial Esencial
IGF	Insulin Growth Factor
mmHg	Milímetros de Mercurio
nm	Nanómetro
O ₂ ⁻	Anión Superóxido
¹ O ₂	Oxígeno Singlete
OH ⁻	Radical Hidroxilo
LOO [·]	Peróxido Lipídico
LDL	Low Density Lipoprotein
MDA	Malonildialdehido
NADPH	Nicotin Adenin Dinucleotido Fosfato
NO	Oxido Nítrico
NOS	Oxido Nítrico Sintetasa
PL	Peroxidación Lipídica
PEDF	Pigment Epithelial Growth Factor
PKC	Protein Kinasa C
RD	Retinopatía Diabética
REDOX	Oxidación-Reducción
RH	Retinopatía Hipertensiva
RL	Radical Libre

SOD	Superóxido Dismutasa
TAD	Tensión Arterial Diastólica
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Metabolitos Reactivos al Ácido Tiobarbitúrico
S	Suplemento de micronutrientes con propiedades antioxidantes
Sin S	Sin Suplemento de micronutrientes con propiedades antioxidantes
SOD	Superóxido Dismutasa
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumour Necrosis Factor
UV-C	Radiación Ultravioleta C
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN..... 19

Las Especies Reactivas del oxígeno.....	21
I. Definición.....	21
II. Formación.....	22
III. Origen de las EROX.....	24
1. Fuentes exógenas de EROX.....	24
1.1. Oxígeno.....	24
1.2. Ozono.....	24
1.3. Radiaciones.....	24
1.4. Xenobióticos.....	24
2. Fuentes endógenas de EROX.....	25
2.1. Oxidación mitocondrial.....	25
2.2. La fagocitosis.....	26
2.3. Enzimas.....	26
2.4. La síntesis de prostaglandinas.....	26
2.5. Isquemia-reperfusión.....	27
2.6. NOS sintetasa.....	27
IV. Mecanismos de daño celular por las EROX.....	28
1. Daño a lípidos: la Peroxidación lipídica (PL).....	29
1.1. El Malonildialdehído dimetil 1,1,3,3 Tetrametoxipropano (MDA).....	31
1.2. EL 4-Hidroxinonenal (4-HNE).....	32
2. Daño a Proteínas.....	33
3. Daño de los Ácidos Nucleicos.....	33
V. Mecanismos de Defensa ante el Estrés Oxidativo.....	34
1. Sistemas de Defensa Enzimáticos.....	34
1.1. Superóxido Dismutasa (SOD).....	34
1.2. Catalasa (CAT).....	35
1.3. Glutation Peroxidasa (GPx).....	35
1.4. Sistema Aldehídodeshidrogenasa (ALDH).....	36
2. Captadores de EROX.....	37
2.1. Glutation.....	37
2.2. Ácido Ascórbico (Vitamina C).....	37
2.3 Vitamina E (α -Tocoferol).....	37
2.4. Carotenoides.....	39
2.5. Otros Antioxidantes: Ácido úrico, la bilirrubina y el piruvato.....	39
LA DIABETES MELLITUS (DM) Y LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	39
I. La retinopatía diabética: Alteración de la microvascularización retiniana.....	39
1. Estructura y función de la microvascularización retiniana.....	39
1.1. La retina.....	39
1.2. La microvascularización retiniana normal.....	40
1.3. Alteraciones de la estructura y de la función de los microvasos retinianos en la DM.....	43
2. Alteraciones de células retinianas no vasculares en la retinopatía diabética.....	50
2.1. Células Gliales.....	50
2.2. Neuronas.....	52
2.3 Microglía.....	52
2.4. Las células circulantes.....	52
II. La retinopatía diabética: mecanismos fisiopatológicos.....	55
1. Factores hemodinámicos.....	55
2. Cambios Endocrinológicos: Factores de Crecimiento.....	57
2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).....	57
2.2. Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF: insuline-like growth factor).....	59
2.3. Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb: basic fibroblast growth factor).....	59
2.4. Factor transformador del crecimiento (TGF: transforming growth factor).....	60
2.5. Factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF).....	60
2.6. Hormona de crecimiento y Hormonas del embarazo.....	61
2.7. Renina-Angiotensina.....	61
3. Las hipótesis bioquímicas.....	61

3.1. La vía de los polioles	61
3.2. Vía de la hexosamina	64
3.3. Productos finales de la glicación (Advanced Glycation Endproducts –AGES-)	65
3.4. Activación de la proteína quinasa C-β	69
3.5. El aumento del estrés oxidante.	70
III. Epidemiología de la retinopatía diabética.....	75
1. Duración del proceso. Control de la Glucemia. Control de la Tensión Arterial. Dislipemia. ..	76
2. Enfermedad renal.....	82
3. Anemia.....	82
4. Embarazo.	82
5. Otros factores de riesgo para la RD.....	83
Hipertensión arterial (HTA) y Retina.....	84
I. Definición y Prevalencia de la HTA.	84
II. Regulación Fisiológica de la Presión Arterial.	85
1. El sistema nervioso autónomo.	85
2. El Riñón.....	86
III. Etiopatogenia de la Hipertensión.....	87
1. Factores Genéticos.....	88
2. Factores Medioambientales.	90
3. Mecanismos Fisiopatogénicos.....	91
3.1. Hiperactividad del Sistema Nervioso Simpático y del Sistema Renina-Angiotensina II.....	91
3.2. La Microcirculación en la HTA.....	93
4. Estrés oxidativo e hipertensión.....	95
4.1. Fisiopatología del estrés oxidativo en la hipertensión.....	95
4.2. Detección Estrés Oxidativo en hipertensión.	97
4.3. Antioxidantes e hipertensión.	97
IV. La retina en la hipertensión.	99
1. Fisiopatología.	99
1.1. Fase de vasoconstricción.	99
1.2. Fase de esclerosis.	100
1.3. Fase exudativa.....	101
1.4. Fase de complicaciones.....	101
2. Epidemiología.	101
3. Importancia de la afectación de la retina en la hipertensión.	102
3.1. La hipertensión como factor de riesgo de patología ocular.....	102
3.2. Las alteraciones retinianas en HTA como factor predictivo de patología sistémica..	102

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS..... 105

Y OBJETIVOS DEL TRABAJO..... 105

I. Antecedentes y estado actual del tema.	107
II. Justificación del Estudio.	109
III. Hipótesis.....	111
IV. Objetivos.	112

MATERIAL Y MÉTODOS..... 115

I. DISEÑO DEL ESTUDIO.	118
II. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.	119
1. Criterios de inclusión.....	119
2. Criterios de exclusión.	119
III. EXPLORACIÓN CLÍNICA.	120
1. Anamnesis.	120
2. Exploración Oftalmológica.	120
3. Suplementación micronutricional.	123

IV. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	124
V. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS CLÁSICOS.	127
1. Glucemia basal.....	127
2. Hemoglobina glicosilada (HbA _{1c}).	128
3. Perfil lipídico.....	129
3.1.Colesterol total.....	129
3.2. HDL colesterol.....	130
3.3.Triglicéridos.....	131
3.4.LDL colesterol.....	132
4. Urea.....	132
5. Creatinina.....	133
IV. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EMERGENTES:	134
ANÁLISIS DEL ESTADO OXIDATIVO-ANTIOXIDANTE.....	134
1.Malonildialdehido (MDA).....	134
2. Antioxidante total (AOT).....	136
Preparaciones.....	138
Patrón	138
3. Superóxido Dismutasa (SOD).....	139
VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	143
Apéndice 1. Hoja de trabajo para la recogida de datos clínicos.....	144
Apéndice 2. Desglose de la base de datos (Excel) para el procesamiento informático de los datos.....	146

RESULTADOS..... 149

I. RESULTADOS DE LOS GRUPOS Y SUBGRUPOS AL COMIENZO DEL ESTUDIO (1999).....	151
II. RESULTADOS DE LOS GRUPOS Y SUBGRUPOS AL FINAL DEL ESTUDIO (2004)	161
III. COMPARACIÓN DE RESULTADOS CLÍNICO-ANALÍTICOS AL INICIO Y FINAL DEL ESTUDIO.....	175
1. Diabéticos con retinopatía.....	176
2. Diabéticos sin retinopatía.....	178
3. Comparación Global en pacientes diabéticos (con y sin retinopatía).....	179
4. Hipertensos con retinopatía.....	181
5. Hipertensos sin retinopatía.....	183
6. Comparación Global en pacientes hipertensos (con y sin retinopatía).....	184
7. Controles.....	186

DISCUSIÓN..... 191

I. EVALUACIÓN CRÍTICA DEL DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO.....	192
II. EVALUACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS.....	198
1. Estudio epidemiológico sobre las retinopatías vasculares.....	198
1.1. Datos personales y familiares, características de la enfermedad, hábitos de vida.....	199
1.2. Exploración oftalmológica.....	202
1.3. Examen bioquímico.....	203
2. Efectos de la administración de un suplemento micronutricional con propiedades antioxidantes en las retinopatías vasculares.....	210
III. APLICABILIDAD BIOMÉDICA.....	213
IV. COMENTARIOS FINALES.....	214

CONCLUSIONES..... 217

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 221

.

INTRODUCCIÓN.

Las Especies Reactivas del oxígeno.

I. Definición.

Desde el punto de vista de la química todo compuesto que puede aceptar electrones es un agente oxidante, incluyendo el oxígeno. Por el contrario, los compuestos que donan electrones son reductores. En general, una reacción química que culmina con ganancia de electrones es una reacción de reducción, mientras que la oxidación es un proceso en el que la reacción termina con una pérdida electrónica.



Cuando un agente reductor dona sus electrones induce la reducción del producto con el que interacciona y cuando un oxidante acepta electrones causa que otra sustancia se oxide.

En biología un agente reductor actúa mediante la donación de electrones, usualmente vía donación de hidrógeno o recepción de oxígeno. Un proceso de oxidación se acompaña siempre de otro de reducción (Red-Ox). En este hay normalmente una pérdida de oxígeno, mientras que en la oxidación hay una ganancia.

En general los agentes oxidantes se denominan en biología especies reactivas del oxígeno (EROX). En la literatura los términos EROX, especies derivadas del oxígeno, oxidantes, especies reactivas del nitrógeno, especies pro-oxidantes, son a menudo utilizados de forma intercambiable. Pueden ser clasificados en dos grupos: Radicales y no radicales. Los grupos radicales también llamados radicales libres (RL) tienen en común que todos poseen un electrón desapareado en su orbital más externo (gramaticalmente, el término radical libre no es adecuado, ya que los radicales son libres de forma innata. Sin embargo esta nomenclatura está aceptada por la comunidad científica como tal). El hecho de tener el electrón desapareado les confiere inestabilidad

y una gran reactividad, por su afinidad para donar o recibir un electrón, lo que tienden a hacer para así adquirir una mayor estabilidad. Se describen con un punto adjunto ($R\cdot$).

Por otra parte, el grupo de compuestos no radicales engloba una gran variedad de sustancias reactivas. Ambos tipos de especies radicales y no radicales quedan especificados en la tabla 1.

Name	Symbol
Oxygen radicals	
Oxygen (bi-radical)	O_2
Superoxide ion	$O_2^{\cdot-}$
Hydroxyl	OH^{\cdot}
Peroxyl	ROO^{\cdot}
Alkoxy	RO^{\cdot}
Nitric oxide	NO^{\cdot}
Nonradical oxygen derivatives	
Hydrogen peroxide	H_2O_2
(Organic peroxide)	$ROOH$
Hypochlorous acid	$HOCl$
Ozone	O_3
Aldehydes	$HCOR$
Singlet oxygen	1O_2
Peroxynitrite	$ONOOH$

Tabla 1. Metabolitos del oxígeno: Radicales y no radicales (Tomado de Halliwell y Gutteridge, 1999)

II. Formación.

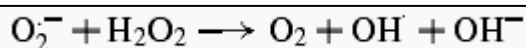
El principal proceso de formación de las EROX sigue un orden secuencial perfectamente establecido, caracterizado por la producción en primer lugar del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), seguido del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Fridovich I, 1978; Del Maestro RF, 1980; Mittac T, 1984).

El anión superóxido es el primer RL producido. Se forma también en otros procesos enzimáticos (como en las reacciones catalizadas por oxidasas/deshidrogenaras, flavoproteínas y metaloproteínas) por lo que es la forma más abundante. Carece de reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas ya que posee una vida media del orden de milisegundos. Sin embargo, puede iniciar la cadena de formación de RL.

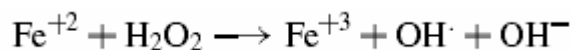
El peróxido de hidrógeno se considera tradicionalmente como RL debido a su capacidad para generar otros RL, entre ellos el potente radical hidroxilo. Pero el H_2O_2 es en realidad un derivado no radical ya que carece de desapareamiento electrónico, y debido a ello es menos lesivo que el anión superóxido. Además, al ser una molécula pequeña y sin carga presenta una importante difusión tisular, pudiendo atravesar las

membranas celulares y dar lugar a efectos adversos a mayor distancia que otros RL. Surge a partir de una dismutación (proceso de oxidoreducción entre moléculas similares) del $O_2^{\cdot -}$. Esta reacción, muy lenta a pH fisiológico, puede verse acelerada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) que de este modo actúa como mecanismo de defensa al eliminar un radical muy reactivo (Freeman BA y Crapo JD, 1982).

El radical hidroxilo OH^{\cdot} es el más potente de todos los RL y capaz de reaccionar con todas las moléculas que encuentra a su alcance. Tiene una vida media corta (del orden de 10-11 segundos) lo que limita su capacidad de difusión tisular. Se genera a partir del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno mediante la secuencia conocida como reacción de Haber-Weiss:



Sin embargo, el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido no pueden reaccionar directamente "in vivo" por lo que la activación ocurre según se describe en una reacción en la que los metales de transición (fundamentalmente el hierro) actúan como catalizadores. Es la llamada reacción de Fenton:



A un pH fisiológico la mayoría del hierro está oxidado y unido a sus quelantes biológicos en forma de Fe^{+3} . Para participar en la reacción de Fenton el hierro tiene, por tanto, que ser convertido a Fe^{+2} . Ejercen su acción frente a los lípidos, proteínas, citocromos y ácidos nucleicos.

El oxígeno molecular "singlete" (1O_2) tiene un origen incierto. Parece derivar de la fotoactivación del oxígeno y de la interacción de otros RL entre sí (Blake DR, Allen RE y Lunec J, 1987). Se ha descrito que ésta puede ser una importante fuente de peroxidación lipídica (PL) en las membranas celulares de las estructuras oculares (Florence TM, 1992).

Existen otro tipo de RL secundarios u orgánicos, formados por la reacción de los RL con otras moléculas biológicas, confiriéndoles a estos nuevos productos propiedades típicas de los RL. Entre ellos se encuentran los radicales alcoxi y peroxi (generados por acción de un RL oxigenado sobre las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados), el radical semiquinolona, los radicales hipoclorito y peroxinitrito, el óxido nítrico, etc.

Species	Comment
Superoxide anion (O_2^-)	Produced by electron transport chain and at other sites
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	Contains no unpaired electrons; can generate a free radical through the Fenton reaction
Hydroxyl radical (OH^\bullet)	The most reactive free radical
Lipid peroxyl radical (ROO^\bullet)	An organic free radical
Singlet oxygen (1O_2)	O_2 with antiparallel spins; damages molecules as it converts back to O_2
R = lipid; \bullet = unpaired single electron in the outer orbital	

Tabla 2. Las EROX más relevantes (Tomado de Beatty et al., 2000)

III. Origen de las EROX.

Las EROX pueden ser de origen exógeno o endógeno.

1. Fuentes exógenas de EROX

1.1. Oxígeno.

La exposición a oxígeno aunque no es un radical puede causar oxidación y daño a las proteínas y enzimas, aunque también puede resultar útil como en el caso de la terapia hiperbárica de oxígeno (Roth y Weiss, 1994).

1.2. Ozono.

También el ozono, aunque importante como captador de las radiaciones ultravioletas C en las capas altas de la atmósfera, es especialmente dañino en los seres vivos por su gran poder oxidante.

1.3. Radiaciones.

La exposición a radiaciones ionizantes y no ionizantes constituye otra fuente importante de EROX exógenos. La exposición a radiaciones γ produce una serie de especies radicales y no radicales por la ionización del agua intracelular.

Asimismo la exposición a radiaciones UV-C (<290 nm) UV-B (290-320 nm) y UV-A (320-400 nm) pueden producir indirectamente una amplia variedad de EROX como el 1O_2 , H_2O_2 y el radical O_2^\bullet .

1.4. Xenobióticos.

El aire contaminado de origen industrial, los gases de la automoción, el humo del tabaco, los fármacos y los conservantes y estabilizantes alimentarios pueden desencadenar también la formación de EROX, que atacan y dañan el organismo ya sea por contacto con la piel o por inhalación a través de las vías respiratorias. Entre los fármacos a considerar están la adreamicina, narcóticos, gases anestésicos, etc. y una gran cantidad de productos de nuestro medio (pesticidas, herbicidas, etc.). También el

alcohol y las drogas dan lugar asimismo a la producción in vivo de EROX (Pinazo-Durán MD, 1999).

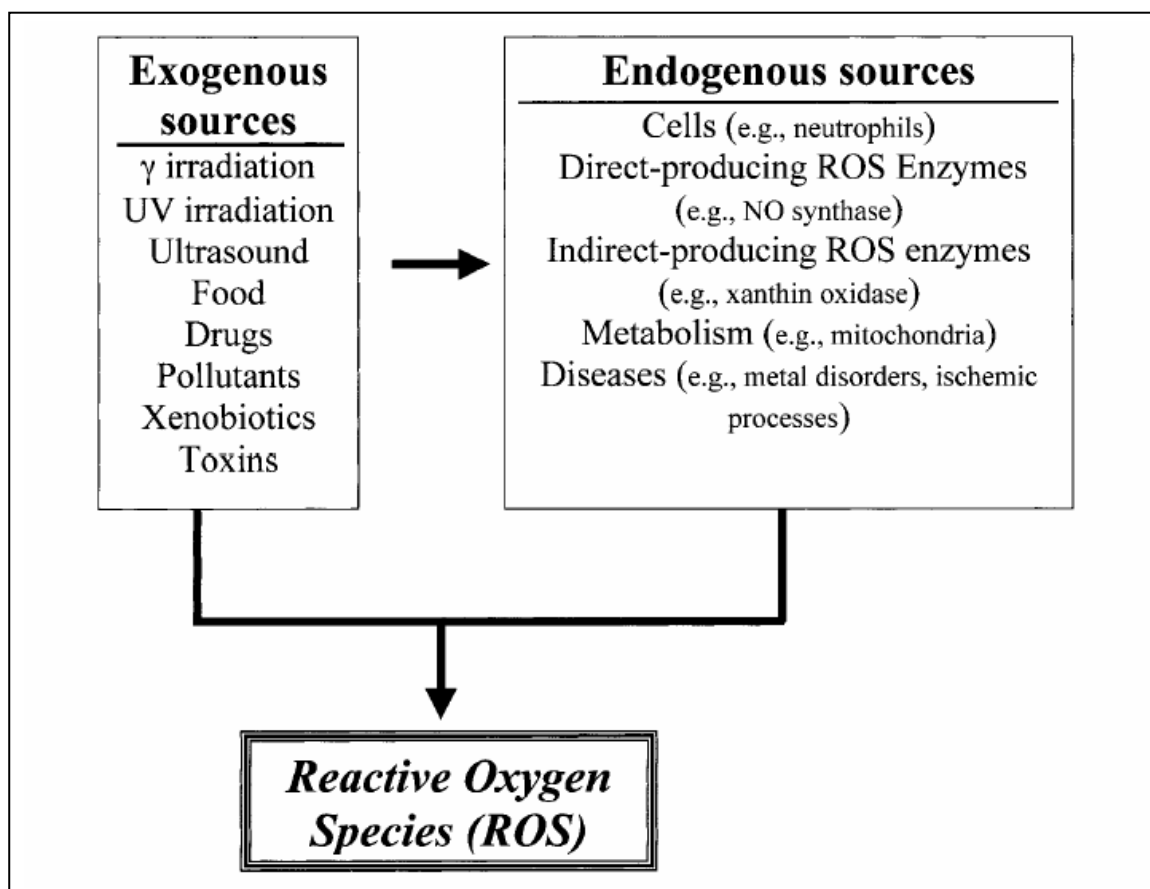


Figura 1. Fuentes de las EROX: exógenas y endógenas (Tomado de Kohen y Nyska, 2002)

2. Fuentes endógenas de EROX.

2.1. Oxidación mitocondrial.

Las mitocondrias (cadena respiratoria mitocondrial) actúan como la principal fuente de EROX, siendo su principal origen en tejidos sanos. La reducción del oxígeno hasta agua para producir ATP transcurre durante el metabolismo aerobio mediante la donación de 4 e⁻ al O₂ (reducción tetravalente). Sin embargo el oxígeno puede reducirse de modo monovalente. La mayor parte de las EROX generadas en la cadena respiratoria mitocondrial se producen por la oxidación de la ubiquinona o del citocromo b. Otras reacciones de óxido-reducción catalizadas por las enzimas NADPH reductasa, la xantina-oxidasa, citocromo C reductasa, deshidrogenasas, etc.... que actúan en condiciones fisiológicas y en algunas circunstancias patológicas, también generan EROX. En muchos casos hay un escape de EROX desde la mitocondria hacia el medio

citoplasmático acrecentado conforme la célula envejece pues progresivamente la función y la integridad de la membrana mitocondriales se ven dañadas.

2.2. La fagocitosis.

Los neutrófilos y los macrófagos al encontrarse con un agente infeccioso experimentan un aumento en el consumo de oxígeno denominado "explosión respiratoria", capaz de generar abundantes EROX con poder bactericida. Dicho proceso se inicia con el aumento en la formación de NADPH por la vía de las pentosas y la activación de la enzima NADPH oxidasa de membrana que produce radicales tipo peróxido. Éstos a través del sistema mieloperoxidasa-haluro dan lugar a compuestos del tipo hipoclorito y cloraminas. Todos ellos (RL, hipoclorito y cloramina) forman un potente arsenal bactericida capaz de luchar contra el agente infeccioso, pero vertidos al medio extracelular inician, mantienen y amplían la reacción inflamatoria.

2.3. Enzimas.

La mayoría de las enzimas producen EROX indirectamente como un producto intermediario de su actividad: es el caso de la síntesis de prostaglandinas y la activación de la xantino oxidasa durante la isquemia-reperfusión. Sin embargo hay otras enzimas designadas específicamente para producir EROX. Tal es el caso de la NO sintetasa (sintetasa del óxido nítrico).

2.4. La síntesis de prostaglandinas.

Las prostaglandinas (prostaciclina) y el tromboxano A₂ se originan a partir del ácido araquidónico, el cual es liberado por los fosfolípidos de membrana bajo la acción de la fosfolipasa A₂. Durante la síntesis de prostaglandinas se producen radicales hidroxilos, en la fase de transformación del ácido araquidónico en endoperóxidos bajo la acción de la ciclooxigenasa. Éstos intervienen secundariamente sobre la cascada del ácido araquidónico inhibiendo la ciclooxigenasa y favoreciendo la vía metabólica proagregante y vasoconstrictora del tromboxano A₂ frente a la antiagregante y vasodilatadora de la prostaciclina. Del mismo modo, estos RL inician reacciones de PL y generan hidroperóxidos que pueden actuar secundariamente sobre otros lípidos generando nuevos RL de tipo orgánico (alcoxi y peroxi), que autoperpetúan el daño inicial. Esta reacción es en último término una peroxidación enzimática. Los radicales son probablemente intermediarios pero están localizados en los sitios activos de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa.

2.5. Isquemia-reperfusión.

En la fase de isquemia y por tanto de aporte de oxígeno insuficiente, un fallo energético de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa de membrana provoca un aumento de calcio en el interior de la célula. Esto activa una proteasas que irreversiblemente convierte la Xatino Deshidrogenasa que predomina en vivo, hasta xantino oxidasa. De forma paralela el ATP celular es catabolizado hasta hipoxantina que se acumula. Sin embargo, durante la reperfusión, el oxígeno, la hipoxantina y la xantino oxidasa se combinan para generar superóxidos y peroxido de hidrogeno que dañan la célula (Figura 2).

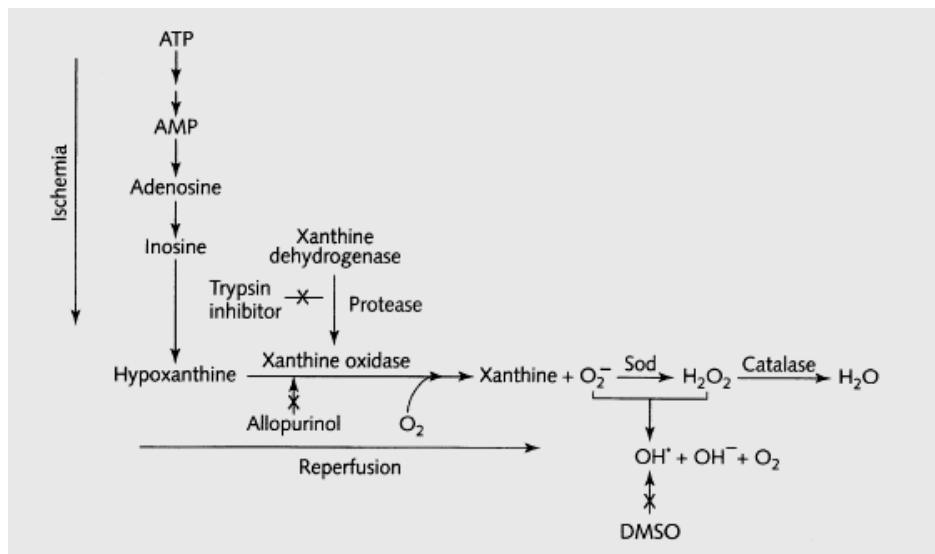


Figura 2. Mecanismos de producción de EROX en la isquemia-reperfusión
(Tomado de Granjea et al., 1986).

2.6. NOS sintetasa.

El oxido nítrico (NO) se produce cuando la arginina es transformada en citrulina por la oxido nítrico sintetasa. El NO tiene varias acciones biológicas como la vasodilatación y la citotoxicidad. La NOS sintetasa esta compuesta por cuatro grupos redox activos (FAD, FMN, protoporfirina IX -con hierro- y 6R-tetrahidrobiopterina (H4B).

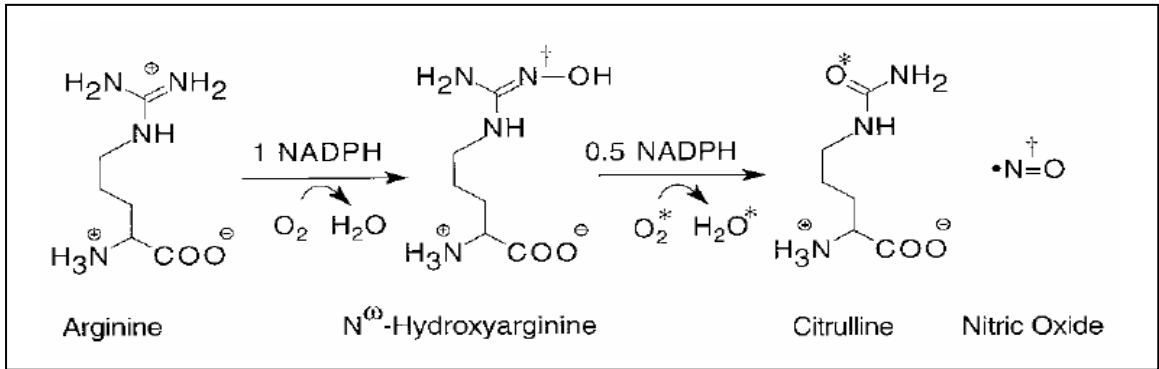


Figura 3. Síntesis de oxido nítrico catalizada por la oxido nítrico sintetasa en un doble paso
(Tomado de Stuehrt, Pou y Rosen., 2001)

En situaciones de hipoxia/isquemia aumenta la actividad de la de la NOS y también aparece un descenso marcado de arginina. Entonces la NADPH se oxida y se forman radicales superóxido (Figura 4). Se crea así un ambiente citotóxico por el mismo exceso de NO y la producción de radicales libres. El daño celular afecta al endotelio, los macrófagos y las plaquetas lo que se manifiesta en una actividad reducida de la NOS endotelial, vasoespasmo y un aumento de la agregación plaquetaria apareciendo mayor hipoxia.

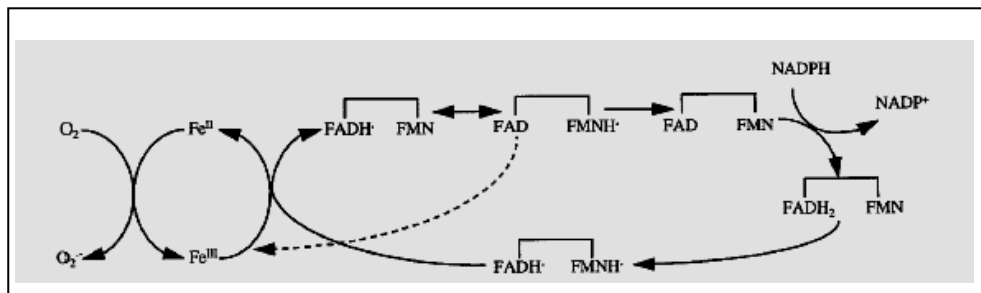


Figura 4. Modelo que ilustra la generación de O₂^{•-}. En ausencia de L-arginina el oxígeno es el substrato preferido para recibir un electrón. Las flechas indican el flujo electrónico.
(Tomado de Pou et al. 1999).

2.7. Otras formas de producción de EROX.

Existen otros procesos patológicos capaces de generar RL tales como los procesos inflamatorios, enfermedades metabólicas, procesos degenerativos, etc...

IV. Mecanismos de daño celular por las EROX.

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

han sido implicadas en la muerte celular y otros procesos tales como el envejecimiento, la carcinogénesis y la apoptosis y son: la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación de ácidos nucleicos (Figura 5).

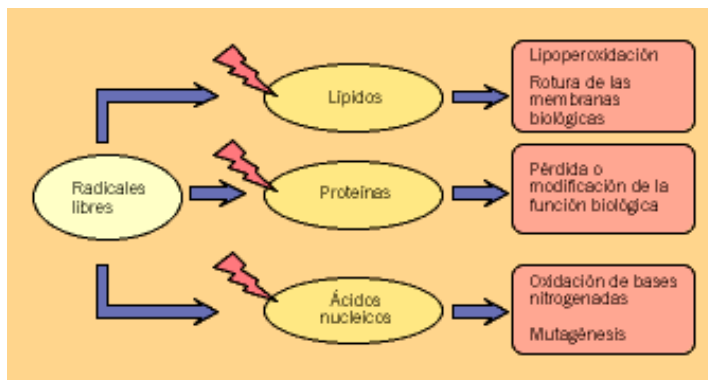


Figura 5. Daño producido por los radicales libres a las biomoléculas
(Tomado de Márquez et al., 2000).

1. Daño a lípidos: la Peroxidación lipídica (PL).

Todas las membranas celulares, mitocondriales y del retículo endoplásmico son especialmente vulnerables a la oxidación debido a su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Éstas tienen sus dobles enlaces separados por grupos metileno, lo que hace que las uniones C-H sean extremadamente sensibles a la agresión por los RL y las especies reactivas no radicales. Asimismo la peroxidación puede desarrollarse a nivel de macromoléculas circulantes, como es el caso de la LDL. Esto es importante pues se la LDL oxidada juega un papel importante en el inicio y la progresión de la aterosclerosis (Ross, 1993). La reacción en cadena (Figura 6) se esquematiza en los tres pasos siguientes:

1) Iniciación: el radical hidroxilo capta un átomo de hidrógeno de un doble enlace de un AGP. Entonces el AGP retiene un electrón y se estabiliza por reordenamiento de su estructura molecular transformándose en un radical lipídico (L').

2) Propagación: Cuando el oxígeno se encuentra en suficiente concentración en el medio el radical L. lo capta y se transforma en un peróxido lipídico (LOO'). Este compuesto es altamente reactivo, siendo capaz de extraer de una cadena insaturada vecina intacta un átomo de hidrógeno y transformarse en un hidroperóxido (LOOH) inestable, mientras que el radical lipídico (LOO') que se ha formado puede reiniciar un nuevo ciclo.

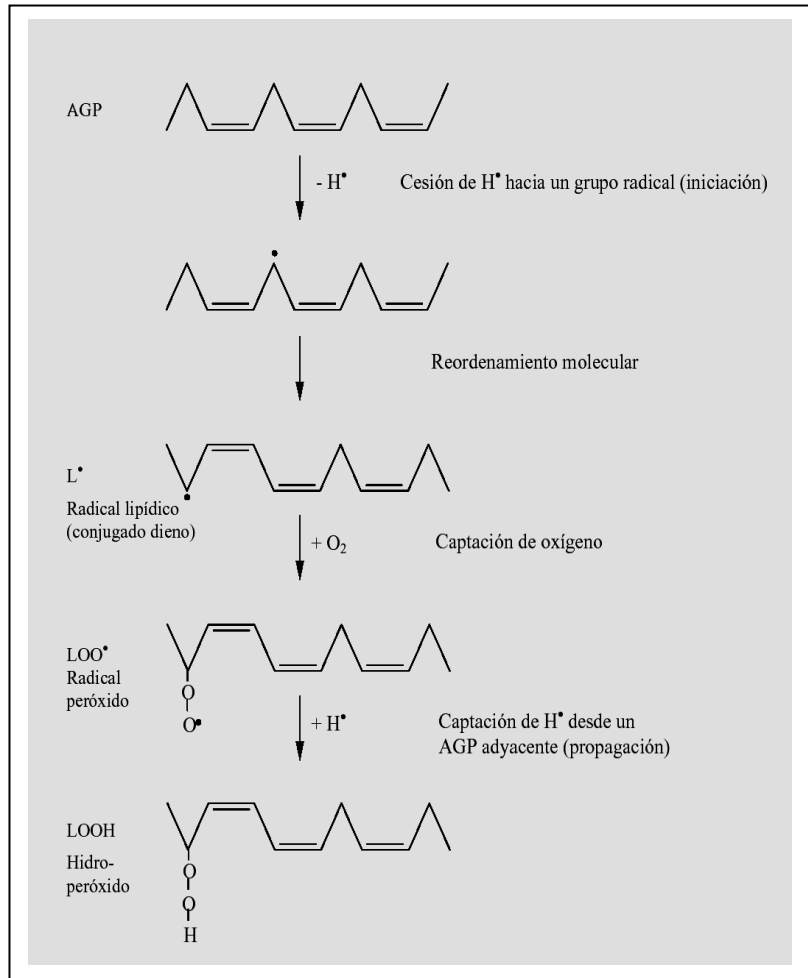


Figura 6. Mecanismo de la peroxidación lipídica no enzimática (Modificado de Gutteridge, 1995).

3) Terminación: La propagación puede dar lugar a la peroxidación de todos los AGP de una membrana. La cadena finaliza con la interacción de un LOO. con otro radical o con un antioxidante. El hidroperoxido lipídico puede también fragmentarse en compuestos tales como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxinonal (4-HNE) o alcanos que se comportan como “segundos mensajeros tóxicos” de las reacciones de oxido-reducción celular.

Esta reacción en cadena, resultado del ataque a los lípidos de membrana por los RL constituye el proceso conocido como peroxidación lipídica (PL) (Halliwell y Gutteridge, 1984). La consecuencia final de ésta reacción en cadena es la alteración funcional de la membrana celular, así como la inhibición de la actividad de proteínas enzimáticas y estructurales asociadas a la misma, lo que condiciona una rápida muerte celular.

1.1. El Malonildialdehído dimetil 1,1,3,3 Tetrametoxipropano (MDA).

Es una molécula de carácter aldehídico (CHO-CH₂-CHO), de bajo peso molecular (72.07) y volátil, con carácter de ácido débil (pH 4.46). El MDA es un producto generado durante la oxidación de moléculas lipídicas que incluye tanto la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico (en menor cantidad) como la peroxidación de lípidos (su fuente principal). El hígado elimina el MDA de la circulación por la acción de las enzimas del sistema aldehído deshidrogenasa y la tioquinasa. En sangre, es transportado por lipoproteínas de baja densidad a las que oxida modificando su apolipoproteína B100, lo que se ha relacionado directamente con la arteriosclerosis y con la enfermedad coronaria. La toxicidad del MDA se debe a su alta reactividad con las proteínas (tales como RNAsas, a-cristalinianas, colágeno) y con el ADN formando productos modificados de las bases nitrogenadas como la primidopurinona (M₁G) que es altamente mutagénico y carcinogénico (Marnett, 2002). Otros productos de la reacción MDA con el ADN, aunque menos abundantes, son el M₁A y el M₁C (Figura 7).

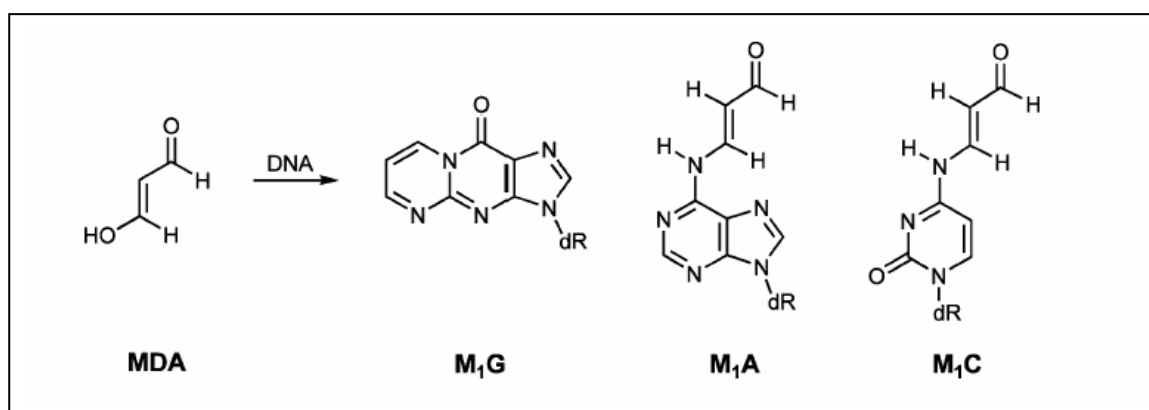


Figura 7. Formación de productos tras la reacción del MDA con el ADN (Tomado de Marnett, 2002).

Estos efectos son especialmente importantes en el caso de la DM. Inicialmente la glucosa produce una glicosilación del colágeno que favorece la oxidación de los lípidos y la producción de MDA, que al unirse al colágeno forma uniones cruzadas intermoleculares que alteran el funcionamiento y disminuyen el recambio de colágeno, produciéndose una mayor glicosilación del colágeno por la glucosa, lo que a su vez

inicia la oxidación de los AGP conduciendo a la formación de más MDA, creándose así un círculo vicioso (Slatter DA, Bolton CH y Bailey AJ, 2000) (Figura 8). Por todo ello se considera que el MDA es uno de los principales marcadores del estrés oxidativo (Esterbauer H, Shacur RJ Y Zollner H, 1991).

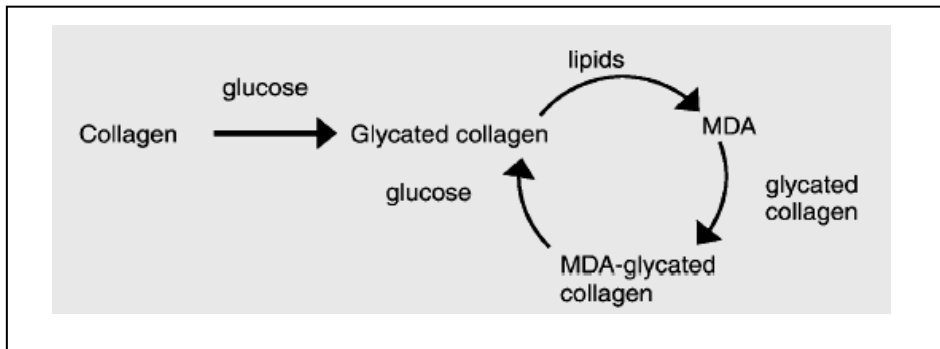


Figura 8. Modificación del colágeno en la diabetes (tomada de Slatter, Bolton y Bailev, 2000)

1.2. EL 4-Hidroxinonenal (4-HNE).

El 4-HNE ($C_9H_{16}O$) es un producto líquido incoloro de peso molecular 156.22 generado durante la peroxidación de los AGP. Posee propiedades citotóxicas, hepatotóxicas y mutagénicas (Parola M et al. 1999). Existen niveles elevados en plasma y en diversos órganos bajo condiciones de estrés oxidativo (Esterbauer H, Schaur RJ y Zollner H, 1990; Comporti M, 1998). Sin embargo también se produce en ciertos tejidos en condiciones fisiológicas cuya función aún es poco conocida. Por tanto parece un factor pluripotencial. Se le han adjudicado diversas acciones (Tabla 3).

<p>Hallazgos del HNE como un marcador bioactivo del estrés oxidativo</p> <p>HNE es un marcador de la peroxidación de LDL y uno de los agentes causales de la aterosclerosis</p> <p>HNE es un factor citotóxico, mutagénico y carcinogénico</p> <p>HNE induce la apoptosis</p> <p>HNE altera el cerebro: barrera sanguínea</p> <p>HNE es un agente neurotóxico</p> <p>HNE puede ser un factor crucial en la enfermedad de Alzheimer</p> <p>HNE es un marcador del daño hepático y uno de los agentes causales de la cirrosis</p> <p>HNE puede ser un factor esencial de las enfermedades por fibrosis</p> <p>HNE actúa como un factor regulador del crecimiento e interfiere con la actividad de otros factores de crecimiento (citoquinas)</p> <p>HNE induce la diferenciación de las células</p> <p>HNE es un constituyente fisiológico de varios tejidos</p>

Tabla 3. Hallazgos del HNE como marcador del estrés oxidativo
(Tomado y modificado de Zarkovic, 2003)

2. Daño a Proteínas.

Los RL y las especies no radicales atacan a las proteínas lo que conlleva graves trastornos sobre el metabolismo y la arquitectura celular, induciendo su destrucción (Comporti M, 1985; Stadtman ER, 1992). Pueden actuar sobre las proteínas de diferentes formas:

- Oxidando los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina) al actuar a nivel de los enlaces insaturados, en los anillos aromáticos y en los grupos tiol (-SH) y produciendo cambios en otros aminoácidos tales como la prolina, arginina, lisina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína (dando lugar a aldehídos).

- Fragmentando proteínas mediante el radical hidroxilo, hipoclorito y peróxido en presencia de metales.

- Formando entrecruzamientos y agregación de proteínas producidos por la formación de puentes disulfuro intramoleculares.

3. Daño de los Ácidos Nucleicos.

En el ser humano se ha calculado que los radicales libres modifican aproximadamente diez mil bases de ADN por célula cada día. El principal agente lesivo es el radical hidroxilo. Los RL serían capaces de dañar directamente las cadenas de

ADN originando su fragmentación en un primer momento. Posteriormente los RL modifican las bases nitrogenadas que van a ser incorporadas al ADN, dando lugar a compuestos anómalos del tipo de la deoxiguanosina, capaz de provocar importantes mutaciones (Fraga CG et al., 1990). Las enzimas reparadores del ADN son capaces de eliminar la mayoría de las lesiones oxidativas, pero no todas. El daño oxidativo en el ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear. Esto se debe a la cercanía de dicho ADN al lugar principal de generación de RL en la célula sana que es la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Fraga CG et al. 1990). Estas alteraciones causan desde deleciones y mutaciones puntuales hasta ruptura de cadenas y/o trastornos estructurales incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida de cromosomas.

V. Mecanismos de Defensa ante el Estrés Oxidativo.

Como consecuencia de la producción continua de RL y de sus efectos tan deletéreos, el organismo ha necesitado disponer de una amplia serie de sistemas de defensa antioxidante. Éstos pueden clasificarse básicamente en:

1. Sistemas de defensa enzimáticos: se trata de un mecanismo intracelular en el que las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa eliminan las especies reactivas del oxígeno una vez formadas.

2. Captadores de RL o "scavengers": enlentecen considerablemente las reacciones de oxidación en cadena o atrapan a los RL transformándolos en otras sustancias menos agresivas. Pueden ser hidrosolubles o citosólicos (glutatión y ácido ascórbico) o liposolubles o de membrana (vitamina A y E).

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

La existencia de una alteración en el equilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes a favor de las fuerzas pro-oxidación en la célula dará lugar al estrés oxidativo.

1. Sistemas de Defensa Enzimáticos.

1.1. Superóxido Dismutasa (SOD).

La SOD es una enzima citoplásmica que acelera la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno por lo que su acción debe hallarse

obligatoriamente asociada a la de catalasas y peroxidasas para evitar la acumulación de peróxido de hidrógeno, que si no fuera frenado daría lugar al radical hidroxilo.

En el hombre existen tres formas moleculares:

- Isoforma citosólica, que contiene cobre y zinc (el átomo de cobre es el que realiza directamente la dismutación).
- Isoforma mitocondrial que contiene manganeso
- Isoforma presente en líquidos extracelulares como el plasma, la linfa o el líquido sinovial. Esta última es irrelevante ya que posee muy baja actividad (Keller GA et al. 1991).

1.2. Catalasa (CAT).

La CAT se localiza en el interior de los peroxisomas. Su función es la de catalizar la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular (Fig.). Es una de las enzimas más activas que se conocen, exhibiendo una actividad de neutralización de 5.600.000 moléculas de peróxido de hidrógeno por minuto y por molécula del enzima (Barja G, 1997).

1.3. Glutation Peroxidasa (GPx).

La GPx elimina hidroperóxidos transformándolos en presencia de GSH (glutation reducido) en agua y en GSSH (glutation oxidado) (Fig 30). Es de localización citosólica y mitocondrial. Existen dos formas: la tipo I dependiente de selenio, que elimina tanto los peróxidos de hidrógeno como los hidroperóxidos lipídicos precursores de las prostaglandinas, reduciéndolos a ácidos grasos hidroxilados, y la tipo II que es independiente del selenio y sólo elimina a los hidroperóxidos lipídicos (Weitzel F, Ursini F y Wendel A, 1990). Como hemos reflejado anteriormente, algunos de estas enzimas antioxidantes requieren oligoelementos como el cobre, el zinc, el manganeso o el selenio como cofactores para desarrollar su actividad. Ello ha dado lugar a la comercialización de estos oligoelementos como tratamiento de enfermedades en las que el estrés oxidativo está implicado como mecanismo patogénico. Liles M, Newsome D y Oliver P en 1991 cuantificaron la actividad de la CAT en ojos de donantes humanos, demostrando que la actividad en el EPR era seis veces mayor a los valores obtenidos en otros tejidos tales como iris, retina o vítreo.

1.4. Sistema Aldehíodeshidrogenasa (ALDH).

El sistema ALDH (aldehído: NAD + óxido reductasa) agrupa a varias isoformas enzimáticas que desempeñan múltiples y variadas funciones en el organismo, siendo la principal oxidar aldehídos biogénicos, alifáticos y xenobióticos, y también catalizar la hidrólisis de ésteres activados a sus correspondientes ácidos carboxílicos. Puesto que los aldehídos peroxídicos altamente reactivos (como el MDA o el 4-HNE) se generan durante el metabolismo de los peróxidos lipídicos, el organismo los debe eliminar mediante reacciones de detoxificación mediadas por las ALDH, para convertirlos en subproductos menos dañinos para las células y tejidos como el acetato, por ejemplo. Este es el mecanismo conocido para la metabolización del etanol (oxidando el acetaldehído) habiéndose demostrado que la oxidación local del etanol y el acúmulo del correspondiente metabolito (acetaldehído) y los cambios redox subsecuentes podrían explicar algunos de los aspectos relacionados con la toxicidad del etanol (Holmes RS, van Oorschot RAH y Vanderberg JL, 1991; Pinazo-Durán et al. 2000; Thiele et al. 2001).

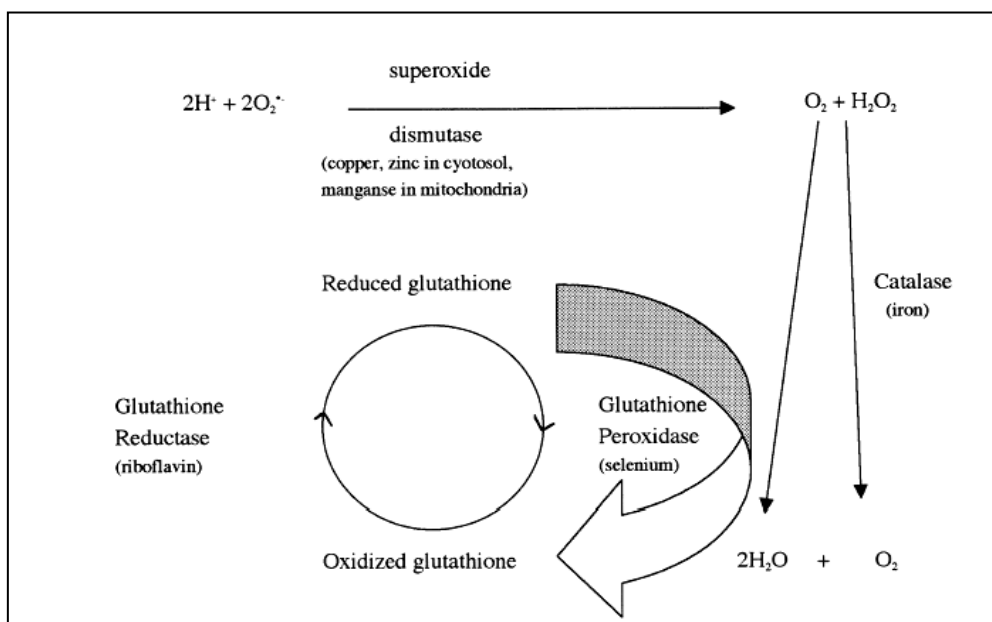


Figura 9 . Sistemas de defensa enzimáticos (Tomado de Beatty et al. 2000).

2. Captadores de EROX.

2.1. Glutation.

El glutatión es un potente agente reductor celular con un amplio potencial redox. Actúa como captador (scavenger) de peróxidos y sirve como almacén y transporte de azufre reducido. La función protectora del GSH sobre las células implica que si los niveles disminuyen, la célula va a ser más susceptible al daño ocasionado por compuestos exógenos, incluyendo los xenobióticos. No obstante, hay que recordar que el GSH está compartimentalizado y que esta característica ejerce una influencia decisiva en la relación entre la depleción del GSH, la oxidación y el daño a las células y los tejidos. La pérdida celular del GSH implicaría que otros grupos tioles (como algunos en particular en determinadas proteínas) podrían ser fácilmente atacados con la subsiguiente oxidación, entrecruzamientos, formación de grupos sulfhídricos o aductos covalentes. Los niveles celulares de GSH son un marcador indiscutible de la habilidad de las células y del tejido correspondiente para defenderse frente al ataque oxidativo.

2.2. Ácido Ascórbico (Vitamina C).

La vitamina C es el principal antioxidante hidrosoluble, capaz de eliminar el $O^{\cdot -}$ el H_2O_2 el OH^{\cdot} , y también el oxígeno singlete. Niveles apropiados de ascorbato en la dieta reducen drásticamente el daño oxidativo "in vivo" a lípidos y proteínas en animales como el cobayo que, al igual que el hombre, no puede sintetizar este antioxidante. El hombre es capaz de incorporarla en la dieta. En los fluidos intraoculares de los mamíferos diurnos se encuentra en concentraciones veinte veces superiores a las del plasma, lo que se interpreta como una adaptación a las radiaciones solares (Koskela TK, Reiss GR y Brubaker RF, 1989). Como compuesto hidrosoluble el ácido ascórbico actúa con mayor eficacia en la fase acuosa de la célula y realiza la regeneración no enzimática del α -tocoferol en el medio cerca del ambiente hidrofóbico de la membrana (Beyer, 1994).

2.3 Vitamina E (α -Tocoferol).

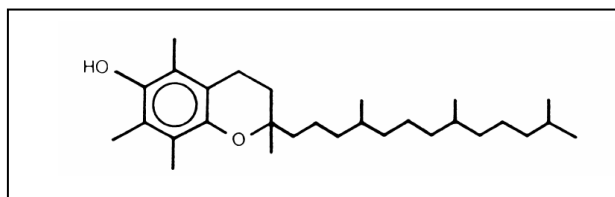
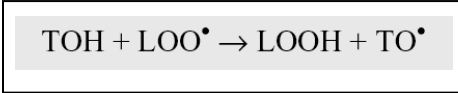
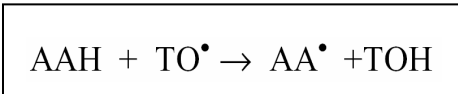


Figura 10. Alfa Tocoferol.

El α -tocoferol (TOH) es un antioxidante liposoluble localizado a nivel de las membranas celulares. Su solubilidad en la membrana le permite accesibilidad directa a grupos peroxi lipídicos (LOO') que son reducidos a hidroperóxidos (LOOH) apareciendo un radical tocoferilo (TO•):



Dichos radicales hidroperoxi son a su vez degradados a alcoholes estables por enzimas como la GPx. Con ello se detiene la cadena de formación y por consiguiente la PL. El radical tocoferilo es a su vez reciclado por el ascorbato (AAH), produciendo un radical ascorbato (AA•):



El radical AA• puede ser eliminado por dismutación rindiendo AAH y deshidroascorbato (DHA). Tanto el DHA como el AA pueden ser reducidos por enzimas que usan NADH o NADPH (Buettner 1993).

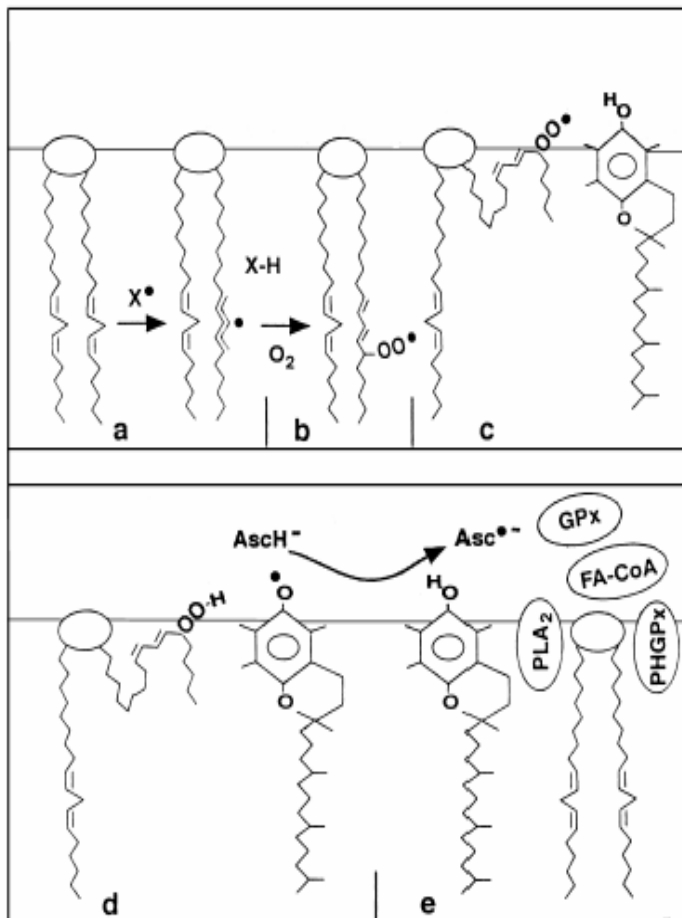


Figura 11. Inicio de la peroxidación por oxidación del radical X por cesión de un átomo de hidrógeno formando un radical pentadienil. (b) Oxigenación para formar un radical peroxil y un conjugado dieno. (c) El radical peroxil es alcanzado por el tocoferol (d) El radical peroxil es convertido en hidroperóxido y resulta un radical tocoferilo (e). El Tocoferol es reciclado por el ascorbato. El radical ascorbato resultante es reciclado por sistemas enzimáticos. Las enzimas fosfolipasas A2 (PLA2), Fosfolípido hidroperóxido glutation peroxidasa (PH-GPx), Glutation peroxidasa (GPx) y Acetil-coenzyma A (FA-CoA) cooperan para detoxificar y reparar la cadena oxidada de los ácidos grasos. (Tomado de Buettner, 1993)

2.4. Carotenoides.

Junto con la vitamina E, los carotenoides son los antioxidantes principales de las membranas biológicas. Se obtienen a partir de la dieta. Dan lugar a reacciones de extinción como la del oxígeno singlete a triplete y también pueden interaccionar con RL a presiones parciales bajas de oxígeno. Se han descrito múltiples carotenoides, pero sólo algunos de ellos aparecen en cantidades apreciables en los tejidos y en el plasma. Además de su papel antioxidante, muchos son precursores de la vitamina A, funcionan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis y protegen contra la sensibilización por la radiación luminosa (Krinsky NI, 1993).

2.5. Otros Antioxidantes: Ácido úrico, la bilirrubina y el piruvato.

Existen otras muchas sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o provenir de la dieta. Entre ellas destacan el ácido úrico, la bilirrubina y el piruvato. Entre los antioxidantes sintéticos se encuentran la N-acetilcisteína, la penicilamina y los ésteres de GSH.

LA DIABETES MELLITUS (DM) Y LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.

I. La retinopatía diabética: Alteración de la microvascularización retiniana.

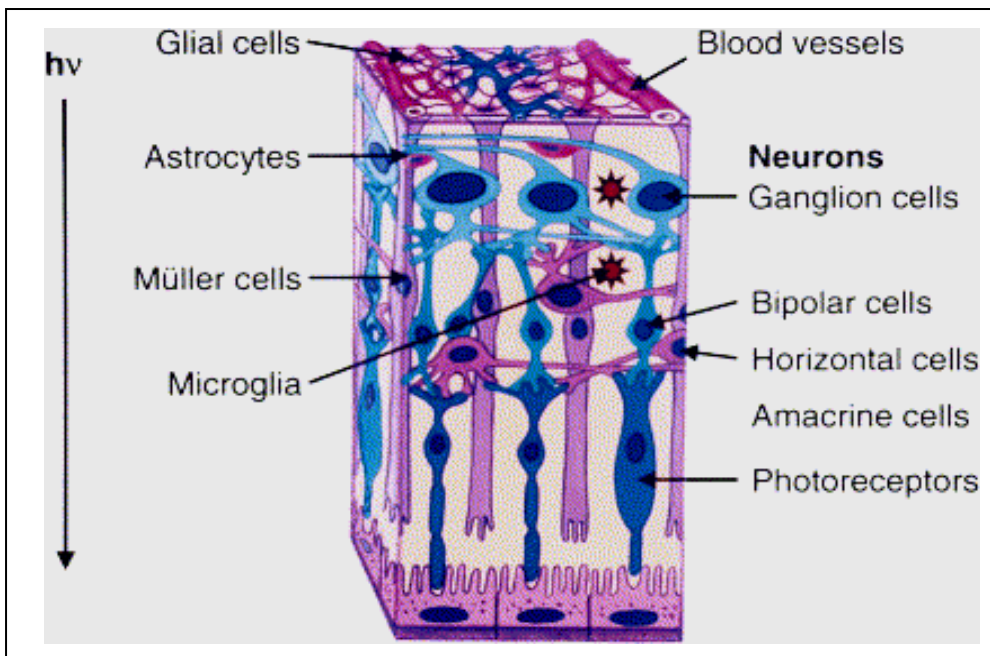
1. Estructura y función de la microvascularización retiniana.

1.1. La retina.

La retina se localiza en la superficie interna del globo ocular entre la coroides y el vítreo. Esta compuesta por cuatro tipos principales de células cuyas interacciones e integración funcional son necesarias para el desarrollo de una visión normal. Estas son:

- células vasculares (pericitos y células endoteliales).
- células de la macroglía (células de Müller y astrocitos).
- neuronas (fotocorreceptores, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares)
- células de la microglía.

Además en todo momento existen células sanguíneas que circulan en la luz de los vasos.



**Figura 12 .Esquema de los cuatro tipos de células retinianas.
No aparecen representadas las células circulantes.
(Tomado de Gardner et al. 2000).**

1.2. La microvascularización retiniana normal.

La nutrición y oxigenación de la retina es tributaria de la arteria oftálmica desde dos fuentes:

- La retina más externa, que corresponde a células del epitelio pigmentario retiniano (EPR) y fotorreceptores, se nutre por difusión a través de la coriocapilar.
- La retina más interna es irrigada por los vasos sanguíneos tributarios de la arteria central de la retina. Las arteriolas y las vénulas están localizadas en la capa de fibras nerviosas. Los capilares, de 5 a 6 μm de diámetro, están localizados en la capa células ganglionares y en la capa granular interna (Figura 13).

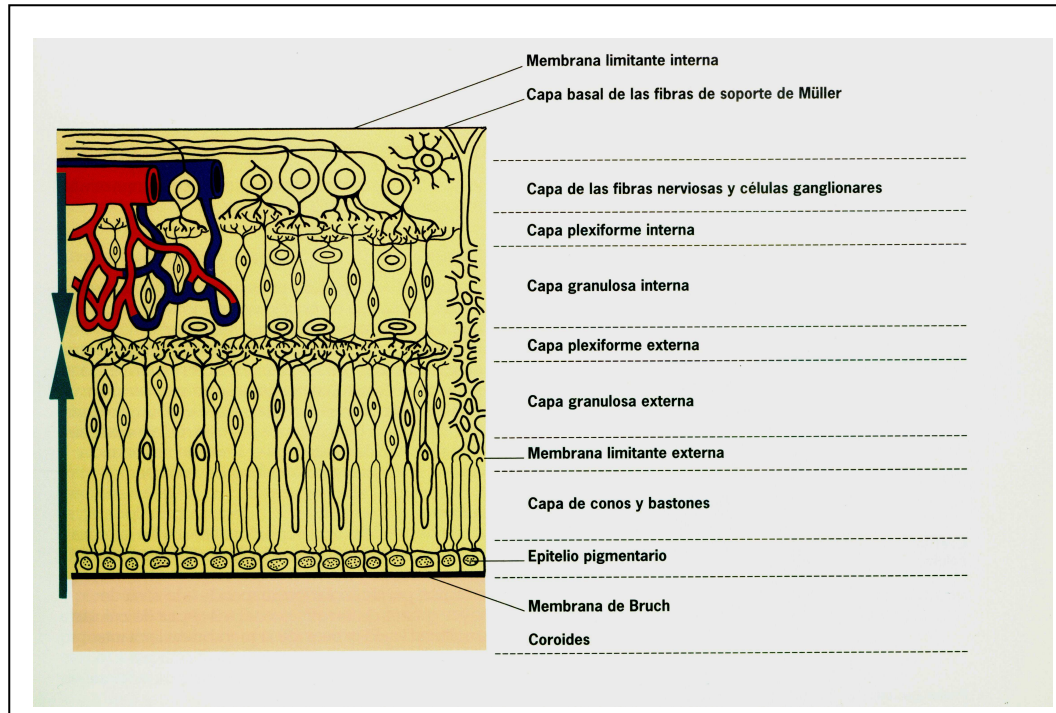


Figura 13. Capas de la retina y localización de los vasos retinianos. Las flechas del borde izquierdo señalan el alcance de las corrientes nutricias (desde los vasos retinianos y desde la coroides)
(Tomado de Piñero Bustamante, 1992).

1.2.1. Las células endoteliales.

Los vasos retinianos están compuestos por células endoteliales, por pericitos y por la membrana basal que envuelve estos dos tipos de células. (figura 14).

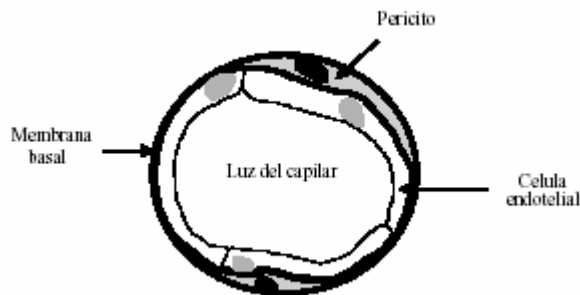


Figura 14. Esquema de la estructura de un capilar retiniano.

Las células endoteliales de los microvasos retinianos forman una monocapa continua y perfectamente estanca gracias a las uniones estrechas (Figura 15) constituyéndose la barrera hemato-retiniana interna que:

- protege la retina de células inflamatorias circulantes y de sus productos citotóxicos.

-permite un control fino de los intercambios moleculares entre la sangre y los espacios extravasculares de la retina, realizándose estos fundamentalmente vía transcelular y no por difusión pasiva. Así se consigue un ambiente iónico extracelular estable en la retina que es necesario para la adecuada actividad neuronal (Gardner et al. 1999).

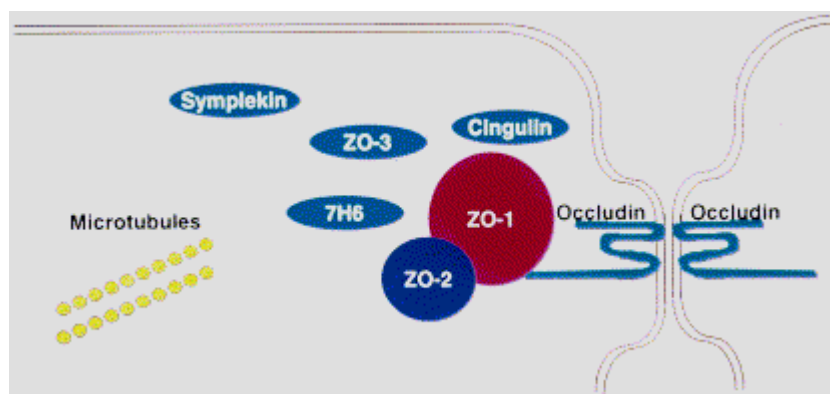


Figura 15. Esquema de las proteínas de una unión estrecha: La Ocludina y las claudinas sirven de puente entre las membranas celulares y limitan el flujo entre las células endoteliales. Otras proteínas tales como zónula occludens-1, zónula occludens-2, zónula occludens-3, simplekina y 7H6 residen en el citoplasma periférico y organizan la unión
(Tomado de Antonetti et al. 1999)

La barrera hemato-retiniana externa está constituida por el epitelio pigmentario y actúa bombeando fluidos por transporte activo desde la retina a la coroides. Las células endoteliales juegan igualmente un papel importante en el control del tono vascular y la hemostasia y participan en ciertos procesos inmunológicos (Demuth et al. 1995). también sintetizan compuestos de la membrana basal como la fibronectina, el colágeno IV o la laminina (Mandarino et al. 1993) y secretan factores de crecimiento como el bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Brooks et al. 1991).

Las células endoteliales interaccionan con diferentes células como las células circulantes sanguíneas, los pericitos y las células neuronales (astrocitos y células de Müller).

1.2.2. Los pericitos.

Los pericitos, a pesar de su localización en el interior de la membrana basal, interaccionan con los diferentes tipos celulares circundantes: mediante prolongaciones citoplasmáticas con las células endoteliales pero probablemente también con las células neuronales retinianas (Ruggiero et al. 1997). Su función es aun mal conocida. Parecen tener una actividad contráctil similar a la de las células musculares lisas regulando el

flujo vascular retiniano mediante dilatación y contracción. Participan también en la síntesis de la membrana basal (Mandarino et al. 1993) y desempeñarían un papel importante en la regulación del metabolismo de las células endoteliales. . Ha sido demostrado in Vitro que los pericitos inhiben el crecimiento de las células endoteliales, aumentan su secreción de prostaglandina I2 (PGI2) y las protegen del estrés oxidante (Yamagishi et al. 1993).

1.3. Alteraciones de la estructura y de la función de los microvasos retinianos en la DM

1.3.1. Los pericitos en la diabetes.

Una de las primeras alteraciones observadas en el curso de la retinopatía diabética es la desaparición selectiva de pericitos. Esta parece tener consecuencias importantes como un aumento de la proliferación de las células endoteliales y una alteración del soporte y la contractilidad vascular. (Figura 16)

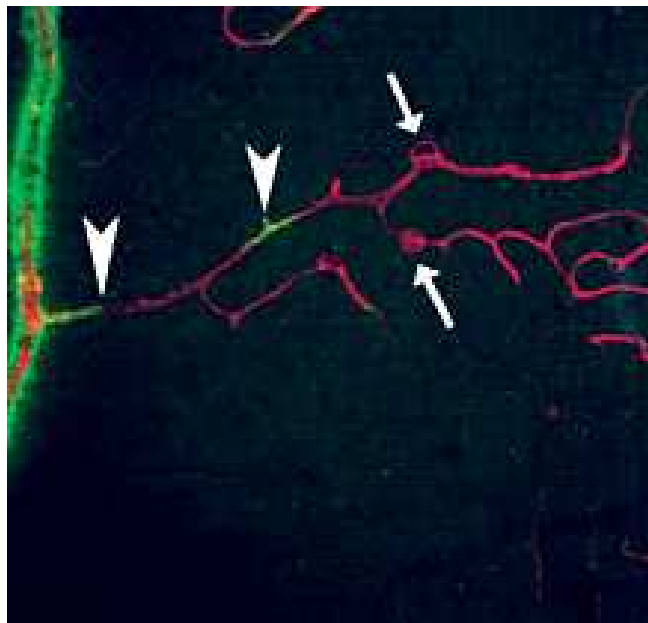


Figura 16. Tinción de las células endoteliales (rojo) y de los pericitos (verde). Nótese como los microaneurismas (flechas) están desprovistos de pericitos que se disponen a cierta distancia (cabezas de flecha)

(Tomado de Aguilar E, Friedlander M y Gariano RF, 2003).

Parece ser que los pericitos desaparecen por un fenómeno de apoptosis como sugieren los estudios realizados tanto in Vitro (Denis et al. 2001; Naruse et al. 2000; Li et al. 1996) como in vivo (Podesta et al. 2000; Li et al. 1997; Mizutani et al. 1996). Por otra parte, la desaparición de pericitos en la retina podría ser también explicada por

fenómenos inmunológicos. De hecho, se han encontrado autoanticuerpos circulantes dirigidos contra los pericitos microvasculares retinianos en pacientes prediabéticos, con diabetes tipo 1 o con diabetes tipo 2 (Attawia y Nayak, 1999; Nayak RC et al. 2003).

1.3.2. Las células endoteliales en la diabetes.

El crecimiento de las células endoteliales está afectado en el curso de la retinopatía diabética de dos maneras diferentes. Mientras que generalmente se observa una multiplicación acelerada de estas células que conduce a la obliteración de los capilares por una reducción de su luz en ciertos microvasos se observa una disminución de células endoteliales por apoptosis (Mizutani M, Kern TS y Lorenzi M, 1996) que conduce a la formación de tubos capilares acelulares de membrana basal desprovistos de células. In Vitro, se ha demostrado que los AGEs inducen, según su concentración, o una activación o una disminución de la proliferación de células endoteliales microvasculares retinianas (Chibber et al. 1997). Asimismo la proliferación e hipertrofia de las células endoteliales puede ser inducida por VEGF-A (Hoffman et al. 2001).

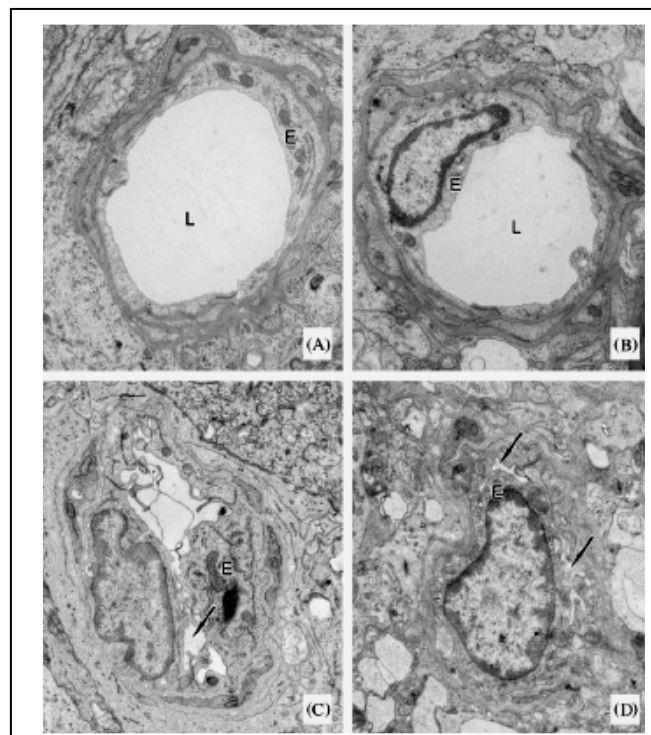


Figura 17. Micrografías electrónicas de la retina interna de monos normales (A, B) y con inyección intravítrea de VEGF-A(C, D). Nótese la pequeña luz (flechas) y la hipertrofia de la célula endotelial (E)
(Tomado de Hoffman et al. 2001).

En las células endoteliales se alteran también su morfología y sus funciones en el curso de la retinopatía. De esta forma, las uniones estrechas, normalmente compactas,

adquieren cierta laxitud produciendo una adherencia intercelular menor lo que contribuye a la ruptura de la barrera hemato-retiniana interna y a la fuga de macromoléculas hacia el espacio extravascular. Recientemente se ha demostrado que la diabetes experimental reduce la cantidad de ocludina en la unión estrecha en las células endoteliales lo que causa desorganización de dichas uniones estrechas (Antonetti et al. 1998; Barber et al. 2000).

Además el factor de crecimiento vascular endotelial (vascular endotelial growth factor –VEGF-) induce cambios similares en la expresión de estas proteínas e incrementa la permeabilidad vascular pudiendo desempeñar un importante papel en la patogenia del edema macular (Gardner et al. 2002). A diferencia de la barrera hemato-retiniana interna, cuya función se ve muy afectada según el grado de RD, la membrana hemato-retiniana externa parece bastante estable, lo que sugiere que el edema retiniano se debe a un aumento de la permeabilidad y no a una disminución del mecanismo de bombeo (Sander et al. 2001) (Figura 18).

Por otro lado el endotelio presenta disfunciones en el equilibrio pro y antiagregantes tales como:

- deficiencia secreción de prostaglandina I₂ (PGI₂) (Jennings and Barnett, 1988) que es un factor antiagregante y vasodilatador.

- aumento de los niveles circulantes del factor de von Willebrand (Ostermann and van de, 1986) lo que favorece la agregación plaquetaria.

- aumento en la expresión de moléculas de adhesión como por ejemplo las I (Miyamoto et al. 1999).

- cambios en la carga electrostática de superficie (Raz et al. 1988) o incluso en la síntesis de proteínas de la matriz extracelular.

- Las células endoteliales apoptóticas son procoagulantes (Bombeli et al. 1997) y generan un ambiente proinflamatorio (Hebert et al. 1998).

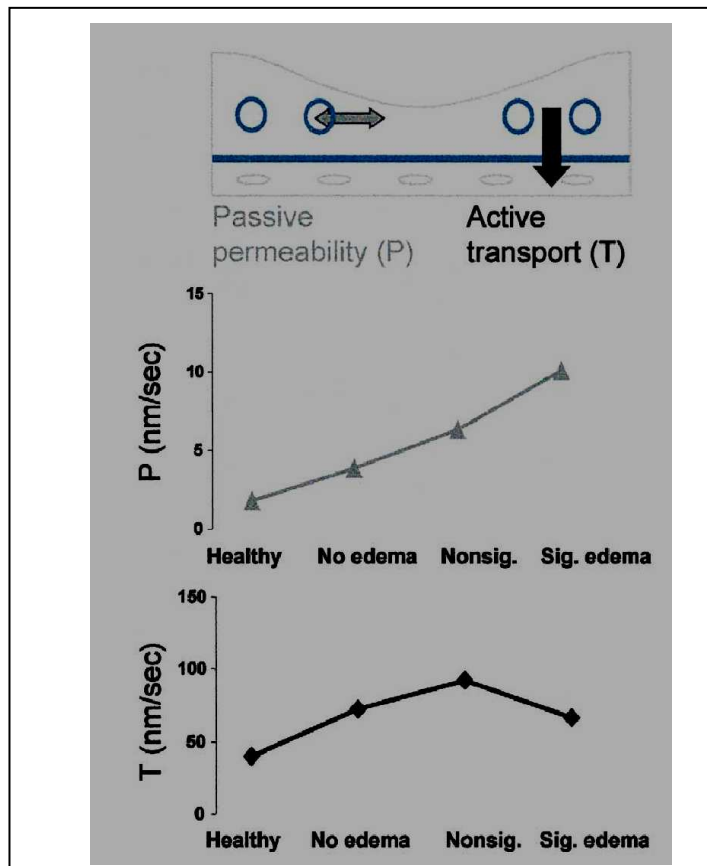


Figura 18. Barrera hemato-retiniana: Permeabilidad de la BHRI (P) y Transporte activo de la BHRE (T) en diferentes estadios de RD medidos por fluorofotometría
(Tomado de Lund-Andersen, 2002).

1.3.3. La membrana basal.

Aparece un engrosamiento marcado (Figura 19) de la membrana basal. Este cambio puede contribuir a alterar la comunicación de las células endoteliales y los pericitos, la difusión de nutrientes (como el oxígeno), la contractilidad capilar o la adecuada interacción celular con las proteínas constituyentes de la membrana basal. Se ha demostrado una inhibición de este engrosamiento por la administración de un AINE (sulindac) a largo plazo (Mansour et al. 1990; Gardiner et al. 2003).

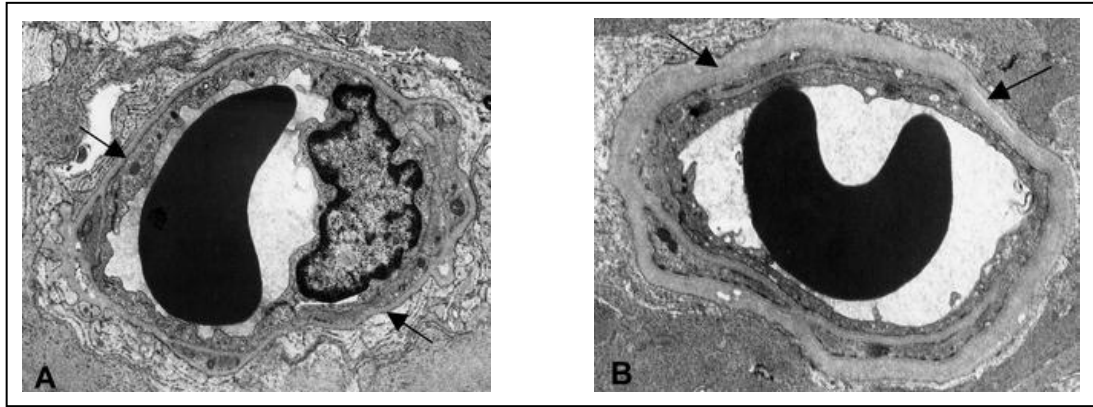


Figura 19 .Micrografías de transmisión electrónica de los capilares retinianos de un perro diabético. (A) Capilar retiniano de un perro control mostrando membrana basa (flechas) (B) Capilar retiniano de un perro diabético de 4 años de evolución
(Tomado de Gardiner et al. 2003).

1.3.4. Fases de la afectación microvascular.

La retinopatía diabética evoluciona en tres fases durante las cuales la estructura y la función de los microvasos se ven progresivamente alteradas:

- la fase no proliferativa
- la fase pre-proliferativa
- la fase proliferativa.

-Fase no proliferativa:

Las primeras manifestaciones estructurales de la afectación retiniana durante la diabetes consisten en un engrosamiento de la membrana basal, una desaparición de pericitos y proliferación de las células endoteliales en la pared de los microvasos. Estas lesiones disminuyen la resistencia mecánica de los capilares y favorecen la formación de microaneurismas, pudiendo dar lugar a pequeñas hemorragias. Estos microaneurismas dificultan el flujo sanguíneo y son rodeados de zonas de no perfusión capilar (Figura 20).

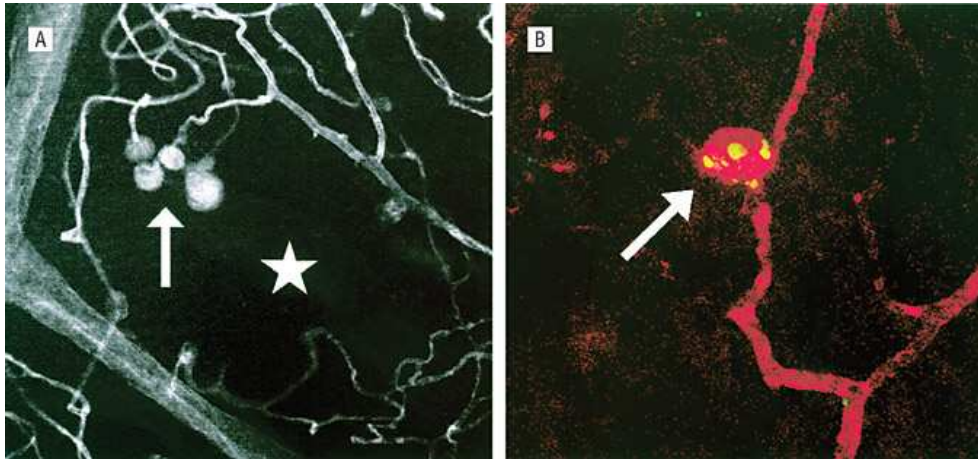


Figura 20. Microaneurismas (flecha) rodeados de zona de no perfusión capilar (estrella) (A). Tinción de células endoteliales (rojo) y de células endoteliales en división (Amarillo-verde) que pone de manifiesto la proliferación en el microaneurisma (flecha) (B)
(Tomado de Aguilar E, Friedlander M y Gariano RF, 2003).

En ciertos vasos las células endoteliales y los pericitos desaparecen, llevando a la aparición de capilares acelulares. A estas afectaciones de la estructura se asocian alteraciones en la función de los microvasos. La barrera hemato-retiniana no desempeña ya correctamente su papel. La hiperpermeabilidad permite el paso al medio extravascular de exudados plasmáticos (en particular lipídicos) que favorecen la aparición de edemas. Aparecen además alteraciones hemodinámicas y reológicas. El flujo sanguíneo y la viscosidad se encuentran aumentados lo que acentúa más la hiperfiltración a nivel de la barrera hemato-retiniana. Se observan igualmente alteraciones de la reactividad vascular, de la coagulación, de la agregación plaquetaria y de la actividad fibrinolítica. (La Selva et al. 1993).

-Fase pre-proliferativa:

Todas esas alteraciones estructurales y funcionales favorecen la oclusión de los capilares lo que conduce al déficit de perfusión de ciertos territorios retinianos y por tanto a una hipoxia. Parece que al menos pueden intervenir tres procesos principales: cambios proinflamatorios, microtrombosis y apoptosis. Además el engrosamiento de la membrana basal contribuye a la isquemia.

-Fase proliferativa:

Cuando las zonas de baja perfusión son bastante importantes la isquemia resultante estimula la proliferación de las células endoteliales por producción local de factores de crecimiento como el VEGF. En consecuencia aparecen neovasos retinianos. Mas frágiles se rompen fácilmente desencadenando hemorragias y un descenso de la agudeza visual (Figura 21) Estos nuevos vasos pueden también expandirse hacia el vítreo y provocar tracciones sobre la retina, que puede desprenderse.

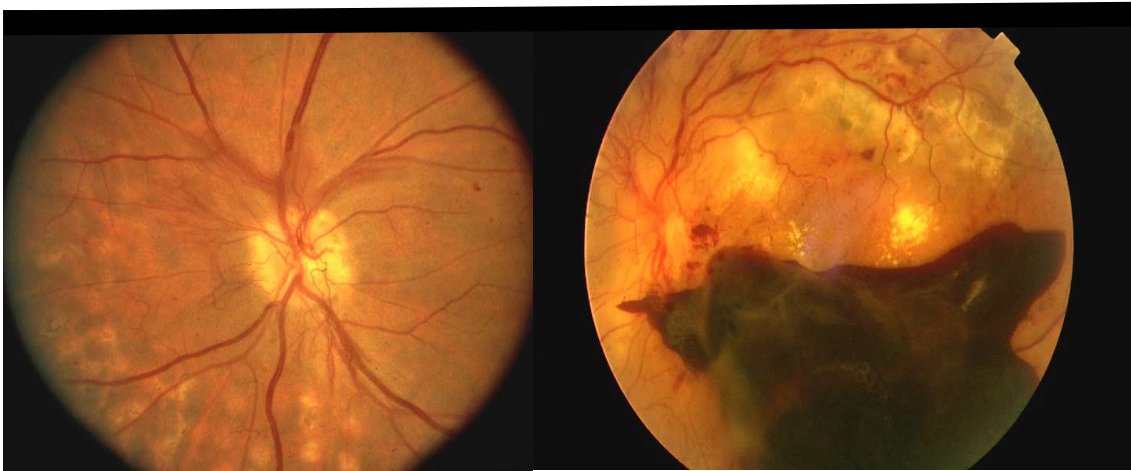


Figura 21. Neovasos papilares y de arcadas (derecha) y Hemorragia vítrea (izquierda).

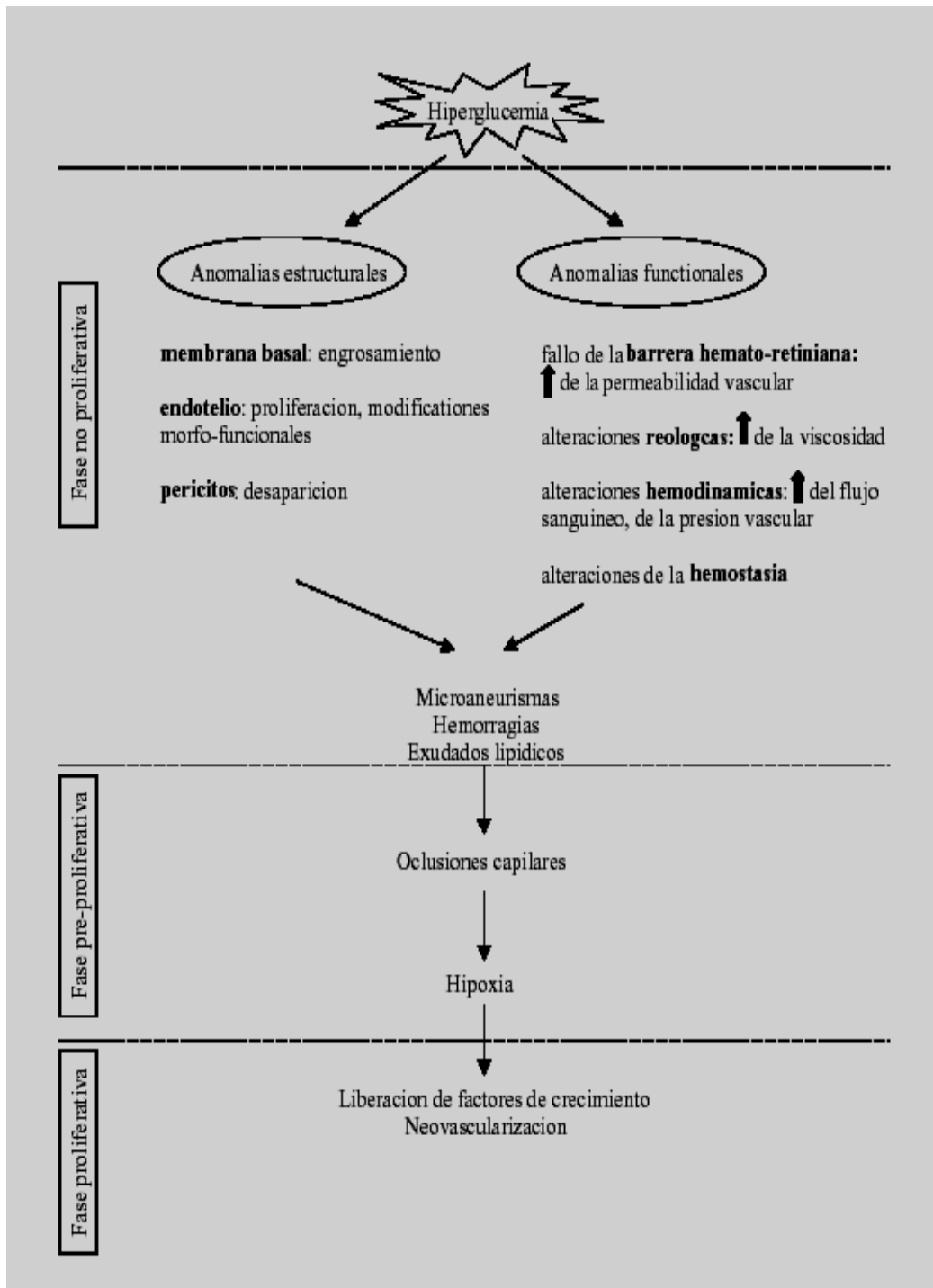


Figura 22. Fases de la afectación microvascular en la retinopatía diabética.

2. Alteraciones de células retinianas no vasculares en la retinopatía diabética

2.1. Células Gliales.

Las células macrogliales son básicamente células de soporte que regulan el metabolismo retiniano y modulan la función de las células neuronales y de los vasos

sanguíneos (Abbott NJ, Revest PA y Romero IA, 1992). En la retina existen principalmente dos tipos de macroglía: células de Müller y astrocitos.

Las células de Müller se extienden en todo el espesor de la retina desde el epitelio pigmentario hasta la membrana limitante interna, teniendo sus cuerpos celulares en la capa nuclear interna. Son las principales reguladoras del metabolismo del glutamato, del balance iónico extracelular y de la función neuronal.

Los astrocitos se limitan, en cambio, a la capa de células nerviosas donde sus prolongaciones citoplasmáticas envuelven los vasos sanguíneos y las células ganglionares (Figura 23) Parecen ejercer un papel importante en la nutrición y el soporte estructural de los axones, así como en la inducción de la expresión de las proteínas que conforman las uniones estrechas de las células endoteliales por mecanismo aun desconocido (Gardner et al. 1997).

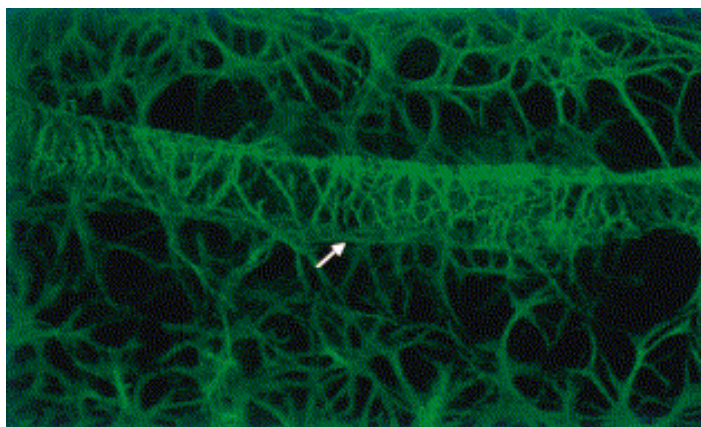


Figura 23. Los astrocitos extienden procesos ramificados que rodean los vasos (flecha blanca) de la retina interna
(Gardner et al. 2002).

Las células de Müller son menos funcionantes durante la diabetes pues transforman menos glutamato a glutamina al producir menos glutamina sintetasa (Lieth et al. 2000; Mizutani, Gerhardinger y Lorenzi 1998) y verse alterado su transportador de glutamato transmembrana (Puro 2002).

Además se ha descrito la invasión por las células de Müller de la luz vascular contribuyendo a la oclusión de la misma en la retinopatía diabética (Bek, 1997)

También durante la diabetes los astrocitos disminuyen de forma importante su estado funcional (Barber et al. 2000; Rungger-Brandle, Dosso y Leuenberger 2000) de modo que la inducción de las uniones estrechas también sería menor lo que puede provocar incremento de la permeabilidad vascular y cambios en el flujo sanguíneo (Figura 24)

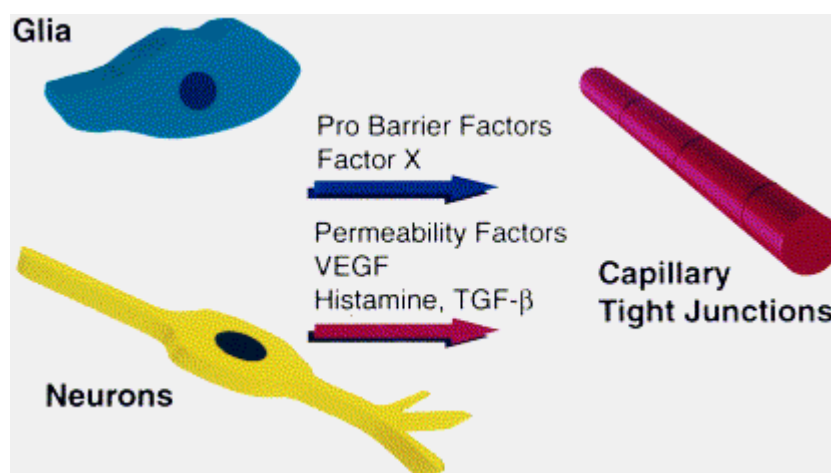


Figura 24. La retina neuronal regula la barrera hemato-retiniana interna. La formación de la barrera hemato-retiniana se debe a factores secretados por la retina neuronal. En la retinopatía diabética la retina neuronal aumenta la producción de factores de crecimiento y puede disminuir el contenido de los factores pro-barrera. Este cambio en el medio contribuye a la hiperpermeabilidad y a la angiogénesis
(Tomado de Antonetti et al. 1999)

2.2. Neuronas.

Desde estadios muy precoces en el curso de la diabetes aparece una pérdida progresiva de fotorreceptores y células ganglionares por un mecanismo de apoptosis (Barber 1998), cuyas causas son mal conocidas. En concordancia existen alteraciones funcionales precoces evidenciables en el electroretinograma (ERG) (Simonsen 1980), en la visión del color y la sensibilidad al contraste (Daley, Watzke y Riddle 1987) que pueden preceder a las lesiones microvasculares e hipotéticamente causarlas (Gadner et al. 2002). Esta pérdida neuronal podría ayudar a entender por qué pacientes con pérdida visual debida a retinopatía pierden visión incluso si el edema macular es tratado con fotocoagulación o vitrectomía. Las neuronas sintetizan en la retinopatía diabética factores de crecimiento (Figura 24) que serán considerados en próximos apartados.

2.3 Microglía.

Son células normalmente quiescentes pero cuando la homeostasis retiniana es alterada adquieren funciones de fagocitosis. En la diabetes aumenta tanto su número como su actividad, liberando citoquinas tales como el VEGF y el TNF, lo que puede ser la causa del incremento de la permeabilidad vascular (Rungger-Brandle, Dosso y Leuenberger, 2000).

2.4. Las células circulantes.

Las células sanguíneas (plaquetas, leucocitos y eritrocitos) se alteran durante el curso de la retinopatía diabética como veremos a continuación.

2.4.1 Plaquetas.

Se observan muchas alteraciones estructurales y funcionales en las plaquetas de los enfermos diabéticos tales como una actividad aumentada de la vía del ácido araquidónico, una formación aumentada de prostaglandinas y de tromboxano A₂, una disminución de la fluidez de membrana, modificaciones a nivel de las proteínas glicoconjugadas de superficie (Lagarde et al. 1980; Winocour 1992; Lupu et al. 1994) o incluso un aumento de sus moléculas de adhesión (Tschoepe et al. 1995). Dichas modificaciones, asociadas a niveles incrementados de inhibidor-1 mRNA (Cagliero, Grant y Lorenzi 1991) del activador de plasminógeno y niveles descendidos del activador tisular del plasminógeno (Lutty et al. 1991) en los diabéticos, conllevan una hiperagregabilidad y la formación de microtrombos de fibrina y plaquetas que provocando la oclusión de los capilares y la isquemia retiniana. Las oclusiones aparecen de forma centrípeta: de capilares aislados pasan a afectar a grupos de capilares y posteriormente a las arteriolas y sus ramas.

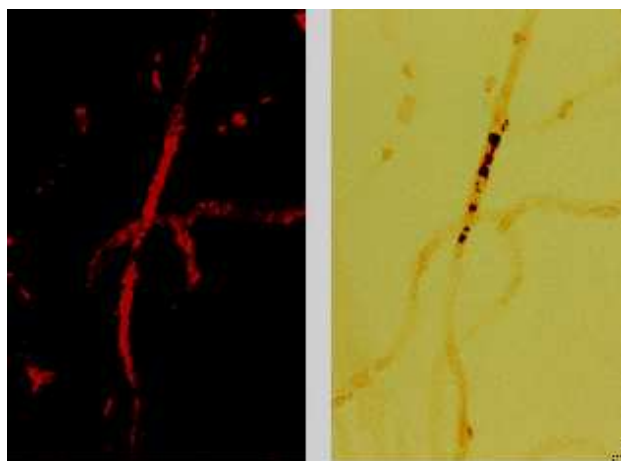


Figura 25. Los capilares de retina de donante diabético humano (postmortem) muestran zonas de tinción de anticuerpo para el factor XIIIa (derecha) y para GPIIIa (izquierda) que identifican los microtrombos
(Tomado de Boeri et al. 2001)

Las microtrombosis además de ser mucho más prevalentes y de mayor tamaño en los pacientes diabéticos que en los no diabéticos, se presentan contiguas a zonas de apoptosis (Boeri D, Maiello M y Lorenzi M, 2001). La hipercoagulabilidad plaquetaria se correlaciona fuertemente con la severidad de las complicaciones microvasculares en la diabetes (Iwase et al. 1998).

2.4.2. Leucocitos.

De la misma manera, los leucocitos parecen desempeñar un papel en la patogénesis de la retinopatía diabética, participando notablemente en la oclusión capilar y en los daños celulares por liberación de productos citotóxicos. Se han observado, en modelos de ratas diabéticas, oclusiones de los capilares retinianos por los leucocitos, así como daños de células endoteliales, acumulaciones extra vasculares de macrófagos y daños tisulares. Además las zonas de no perfusión y de neovascularización coinciden con los acúmulos de leucocitos extra vasculares (Schroder et al. 1991). La adhesión aumentada de los leucocitos al endotelio parece ser el principal mecanismo de estas alteraciones. Las interacciones leucocito-célula endotelial son mediadas por moléculas de adhesión de superficie de ambas células. Moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas tales como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) se expresan en la superficie de las células endoteliales lo que les permite unirse a las b2-integrinas expresadas en la superficie de los leucocitos. Se ha visto en la diabetes inducida en ratas una sobreexpresión en superficie de la ICAM-1 y de las integrinas aumentando proporcionalmente los leucocitos estáticos y tisulares (Miyamoto et al. 1999 ; Barouch et al. 2000).

En el aumento de la adhesión también están involucradas modificaciones de la glicosilación enzimática de las glicoproteínas, mediante una hiperactividad de la enzima responsable de la síntesis de O-glucanos, la core 2-transferasa (Chibber et al. 2000) que es causada por los niveles elevados de glucosa (Chibber et al. 2003).

2.4.3 Eritrocitos.

Los eritrocitos también están alterados en la retinopatía diabética. Como ocurre en los leucocitos, los eritrocitos son menos deformables, su membrana plasmática es menos fluida (Yang et al. 2000) y presentan igualmente hiperagregabilidad (Benhamou et al. 1990). Se ha demostrado en las ratas diabéticas que existe una disminución de las cargas negativas de residuos siálicos en su superficie desencadenando una reactividad más fuerte con el endotelio.

II. La retinopatía diabética: mecanismos fisiopatológicos.

La patogénesis exacta de la retinopatía diabética no es aún bien conocida. Sin embargo a día de hoy se han propuesto muchos mecanismos para intentar explicar los efectos tóxicos de la glucosa en la pared vascular. Todas estas vías intervienen probablemente en la patogénesis, pero cual o cuales de ellas son las responsables de las lesiones retinianas es un tema principal de investigación biomédica.

1. Factores hemodinámicos.

Recientes estudios indican que la hiperglucemia desencadena un aumento de los factores contráctiles derivados del endotelio (Endotelina-1 y productos de la ciclooxigenasa) y una disminución de los factores relajantes derivados del endotelio (Oxido nítrico, prostaciclina y factor polarizante derivado del endotelio) (Cai y Boulton, 2002). De hecho los pacientes diabéticos sin retinopatía tienen un flujo sanguíneo retiniano disminuido respecto a sujetos no diabéticos, lo que puede contribuir a la oclusión vascular. (Arend et al. 1995; Bursell et al. 1996). Este fenómeno está relacionado causalmente con niveles de DAG altos y activación de PKC- β incrementada. (Bursell, 1997). Sin embargo, conforme se instaura la retinopatía y esta avanza hacia la neovascularización, el flujo sanguíneo retiniano se encuentra por encima de lo normal de forma proporcional al grado de retinopatía (predomina la vasodilatación). La principal causa de este fenómeno parece ser la hipoxia ya que tras la panfotocoagulación se reduce el flujo sanguíneo retiniano. (Ciulla et al. 2002).

También entran en juego otras alteraciones del metabolismo retiniano y la hipertensión arterial. La fuerza hidrostática incrementada es transmitida a todo el lecho capilar y a las vénulas postcapilares. Esta fuerza incrementa la transudación de agua, iones y macromoléculas (lipídicas) a través de las paredes capilares, especialmente si las uniones estrechas están alteradas, dando lugar a la formación de edema macular. La presión hidrostática aumentada también contribuye a la dilatación y tortuosidad de las arteriolas y vénulas (Figura 26).

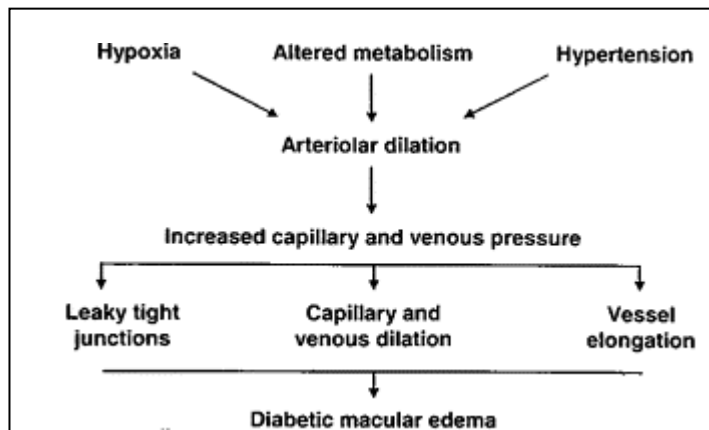


Figura 26. Mecanismos hemodinámicos en la instauración del edema macular
(Tomado de Kristinsson, Gottfredsdottir y Stesson, 1997).

Por tanto los factores que contribuye a la formación del Edema macular diabético son los que aumentan la presión hidrostática (hipertensión arterial, sobrecarga de fluidos) y disminuyen la presión oncótica (hipoalbuminemia, por ejemplo en la insuficiencia renal) según la ley de Starling. (Gadner et al. 2002).

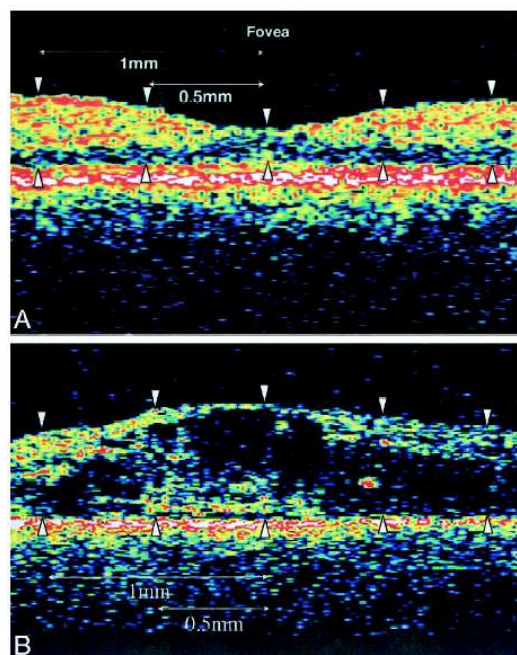


Figura 27. (A) Tomografía de coherencia óptica en el centro de la fovea en un individuo normal (A) y en un individuo diabético (B). Las puntas de flecha marcan los límites de la retina *(Tomado de Goebel y Kretzchmar-Gross, 2002).*

Diversos estudios han mostrado también anomalías en el flujo sanguíneo de la coriocapilar (recordemos que la retina externa recibe su nutrición de ella), de la arteria central de la retina y de la arteria oftálmica (Ciulla et al., 2002).

2. Cambios Endocrinológicos: Factores de Crecimiento.

La diabetes induce cambios vasculares retinianos que conllevan la aparición de áreas de no perfusión capilar e isquemia retiniana. Estos cambios van a estimular en las células retinianas (células ganglionares, glía de Müller y astrocitos) la producción y secreción de factores de crecimiento, los cuales van a difundir por la retina y el resto de estructuras oculares, uniéndose a receptores de alta afinidad de las células endoteliales (Lutty GA, McLeod DS y Merges C, 1996) e induciendo una serie de reacciones bioquímicas intracelulares, que son transmitidas para el aumento de la permeabilidad y la replicación celular. El resultado es la aparición de neovasos en la retina (Sebag J y Mc Meal JW, 1986). La regulación de la proliferación celular, una vez que la señal intracelular ha sido transmitida, implica a un gran número de moléculas distintas a los factores de crecimiento, tales como integrinas, angiostatinas, endostatinas y metaloproteinasas, que podrían constituir la base de nuevas opciones terapéuticas.

2.1. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).

Se trata de una familia de proteínas, que incluye al Factor de crecimiento placentario –PIGF-, con una gran actividad vasopermeable y angiogénica., de las cuales la más estudiada es la VEGF-A. Además existen tres tipos de receptores (VEGFR) con distinta afinidad. (Figura 28.)

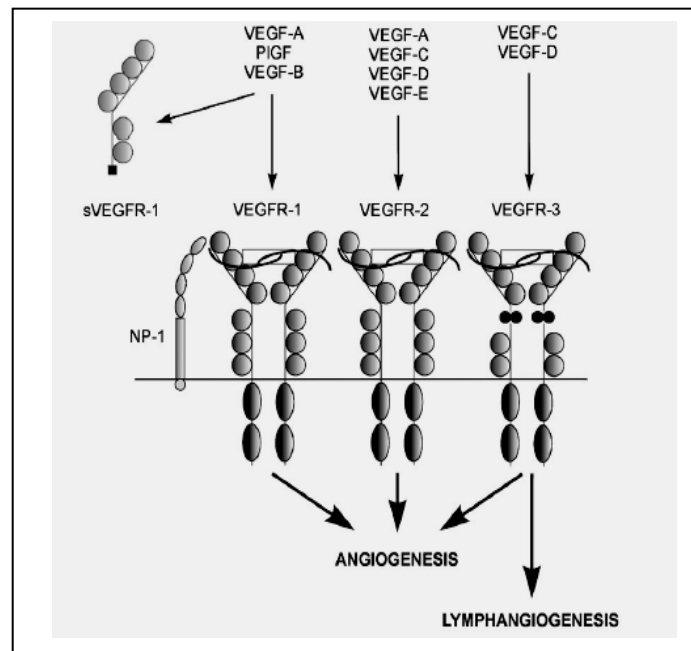


Figura 28. Representación esquemática de la familia de los VEGF, sus interacciones con receptores y sus efectos. (Tomado de Witmer et al. 2003)

En cuanto a la VEGF-A, existen cuatro formas diferentes en el humano: dos isoformas pequeñas (VEGF 121,165), que son difusibles y dos isoformas más grandes (VEGF 189, 206) unidas a la superficie de células tales como el epitelio pigmentario, pericitos, células endoteliales, células gliales, células de Müller y células ganglionares y a las membranas basales, que actúan localmente (Witmer et al. 2003)

El VEGF-A ejerce su función en las células endoteliales vía interacción con los receptores celulares Flt-1 (VEGFR-1) y Flk-1/KDR (VEGFR-2), ambos tirosin-quinasa. La interacción entre el VEGF y sus receptores inicia una señal de transducción que induce fosforilación de proteínas tales como:

- fosfolipasa C (PLC) (Millauer et al. 1993 ; Takahashi et al. 2001).
- fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-Kinasa) (Qi y Claesson-Welsh 2001).
- proteína activadora de guanina 5 trifosfato (GTP) (Suzuma et al. 2000).

La PLC fosfolipasa convierte el inositol fosfato en diacilglicerol (DAG) causando activación y translocación de la PKC, lo que da lugar a cambios importantes en la célula endotelial. (Igal et al. 2001). Se considera que la activación del receptor Flt-1 regula el metabolismo de células vasculares y no vasculares mientras que el receptor KDR, que es relativamente específico de las células vasculares endoteliales, estimula la migración y proliferación célula (Cai y Boulton 2002). Aparecen concentraciones elevadas de VEGF en el vítreo y retina de pacientes con RD sobre todo en estadio proliferativo (Adamis AP et al. 1994; Burgos R et al. 1997). Estos niveles aumentados parecen deberse a la hipoxia.(Simpson et al. 1999; Smith et al. 1999) pero también a altos niveles de glucosa y AGEs. (Lu et al. 1999).

El VEGF es necesario y suficiente para inducir neovascularización en la retina y en el iris, así como para producir un gran aumento de la permeabilidad vascular retiniana (Aiello 1997a). Este último efecto parece ser producido por la alteración a nivel de las proteínas de las zonas de unión, tales como la ocludina y la cadherina-VE (Antonetti et al. 1998; Hernández C et al. 2001).

Actualmente se ha observado que el VEGF puede ser un importante factor en desarrollo de la RD no proliferativa, ya que se ha visto que existe un aumento de la respuesta al VEGF que induce las alteraciones vasculares características de este estadio (Gerhardinger C et al., 1998). Al actuar la VEGF-A como factor de supervivencia de las células endoteliales, vía inducción de proteínas antiapoptóticas (Tran et al. 1999; Gerber et al. 1998) sus niveles pueden incrementarse en la retinopatía diabética preclínica como un mecanismo para mantener la integridad del lecho vascular.

Asimismo la proliferación e hipertrofia de las células endoteliales puede ser inducida por VEGF-A (Hofman et al. 2001). Además el VEGF puede intervenir en las alteraciones del flujo sanguíneo (Clermont et al. 1997) y en la leucostasis mediante inducción de expresión de ICAM-1 (Lu et al. 1999).

2.2. Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF: insuline-like growth factor).

Dicho factor aumenta la capacidad proliferativa del endotelio vascular. Los niveles plasmáticos de IGF 1 (es la cadena A de la insulina y es idéntico a la somatomedina) son mayores en pacientes con diabetes juvenil que en diabéticos adultos o en sujetos no diabéticos (Merimee, Zapf y Froesch 1983). Estos niveles también se relacionan con la progresión de la retinopatía, siendo muy altos en retinopatías altamente progresivas (Ashton et al. 1983).

Las concentraciones de IGF 1 en vítreo están elevadas en el vítreo de algunos pacientes diabéticos y en un 85 % de los diabéticos con retinopatías avanzadas (Burgos R et al., 2000), frente a las concentraciones bajas o no detectables en sujetos no diabéticos. Todos estos datos, sugieren que los niveles elevados de IGF favorezcan la fase acelerada de deterioro de la RD y sean responsables de los cambios proliferativos de dicha enfermedad.

2.3. Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb: basic fibroblast growth factor).

Por sí sólo no es suficiente para inducir neovascularización retiniana, sin embargo, estudios en ratones transgénicos han demostrado que tiene una acción sinérgica potente con el VEGF (Aiello LP, 1999). Tanto la diabetes como la hipoxia provocan daño celular que ocasiona la liberación de FGFb desde la matriz extracelular. Éste se une a su receptor de superficie, provocando la activación de la PKC y de la proteína quinasa activadora de la mitogénesis, que ocasionará un aumento de los receptores para el VEGF y para la mitogénesis.

Así, en situaciones donde existen escasos receptores para el VEGF, éste tendrá escasa actividad mitógena pero, por el contrario el FGFb estimulará bajo estas condiciones un aumento de los receptores para VEGF, que conllevará un aumento de la actividad de éste. Del mismo modo el VEGF aumentará la trombina y el activador del plasminógeno, lo que provocará una liberación de FGFb desde la matriz extracelular, potenciándose la respuesta.

Aparecen niveles altos en vítreo en algunos de los pacientes con enfermedad proliferativa activa, frente a los vítreos de pacientes con RD regresiva o no diabéticos (Sivalingam A, Kenney JK y Brown GC, 1990), así como en aquellos con hemorragias persistentes de vítreo, comparados con los que presentaban un desprendimiento de retina traccional.

2.4. Factor transformador del crecimiento (TGF: transforming growth factor).

El TGFb in vivo, estimula la proliferación de células endoteliales de los capilares y favorece la neovascularización. También interviene en la fibrosis de las vitreorretinopatías proliferativas, siendo las concentraciones de dicho factor unas tres veces mayores en ojos con PVR moderada y severa que en ojos con desprendimiento de retina no complicados (Connor T et al., 1989).

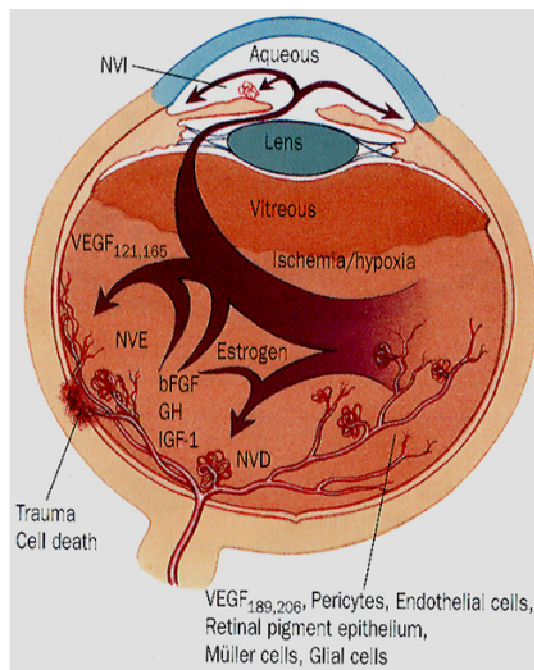


Figura 29. Difusión de los factores de crecimiento (Tomado de Aiello et al., 1995)

2.5. Factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF).

Se trata de una glicoproteína que se identificó inicialmente en las células del EPR pero ha sido encontrado posteriormente en la mayoría de tipos celulares retinianos. Es un factor inhibidor de la angiogénesis mediante la estimulación de la apoptosis de las células endoteliales (Mori et al. 2001). Es uno de los factores más prometedores.

2.6. Hormona de crecimiento y Hormonas del embarazo.

Los niveles de hormona del crecimiento aumentan en proporción al grado de hiperglucemia y se relacionan con el engrosamiento de la membrana basal capilar. Esta hormona puede contribuir al desarrollo de retinopatía mediante variaciones en plasma del nivel del factor de Von Willebrand. Por otra parte El cambio hormonal del embarazo puede acelerar el curso de la RD. El empeoramiento es mayor si la retinopatía es más grave, especialmente si es proliferativa. Después del parto la retinopatía puede mejorar, sobre todo si empeoró durante el embarazo.

2.7. Renina-Angiotensina.

Los fármacos inhibidores de ECA (Enzima convertidora de Angiotensina) retardan la progresión de la retinopatía diabética no proliferativa y la neovascularización. (Chatuverdi et al., 1998) Se ha demostrado que la ECA es producida localmente en el endotelio vascular y el epitelio pigmentario (Danser et al. 1994; Wagner et al. 1996). Además se ha comprobado que la expresión de ECA produce efectos adversos en el flujo retiniano y en la estructura vascular independientes de la presión sanguínea (Engler et al. 1991). Por otro lado la Angiotensina II estimula la formación de neovasos retinianos y el aumento de la permeabilidad vascular, vía potenciación de la acción del VEGF (Gilbert et al. 2000).

3. Las hipótesis bioquímicas.

3.1. La vía de los polioles.

En condiciones fisiológicas normales la glucosa se metaboliza a glucosa-6-fosfato por la hexoquinasa y después es dirigida hacia la vía de la glicolisis o de las pentosas. En la diabetes, cuando la tasa de glucosa aumenta, la hexoquinasa se satura y la glucosa en exceso es metabolizada por la vía de los polioles. Esta vía hace intervenir dos enzimas sucesivamente: la aldosa reductasa y el sorbitol deshidrogenasa. La aldosa reductasa, que solo está activa con altas concentraciones de glucosa por su débil afinidad por esta, reduce la glucosa a sorbitol. (Figura 30). El donante del hidrógeno es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que se oxida a NADP⁺. Esta enzima ha sido bien estudiada pues regulada por la hiperosmolaridad (Smardo, Jr. et al. 1992) y parece que su expresión está aumentada en la diabetes (Ghahary et al. 1989; Shimizu et al. 2000). La segunda enzima de la vía de los polioles,

la sorbitol deshidrogenasa, oxida una pequeña parte del sorbitol en fructosa utilizando el NAD⁺ como cofactor (Figura 30).

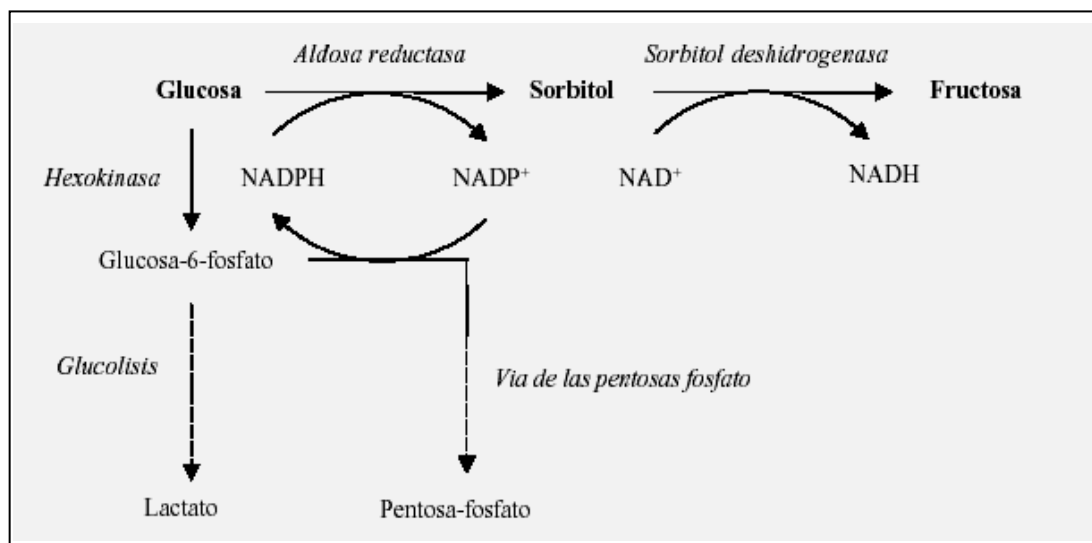


Figura 30. Diferentes vías de la metabolización de la glucosa.

La metabolización de la glucosa en exceso por la vía de los polioles tiene dos consecuencias principales:

- Un estrés osmótico intracelular.
- Una alteración del potencial redox de las células.

Como el sorbitol formado atraviesa con dificultad las membranas, este se acumula en la célula. La hiperosmolaridad celular resultante podría ser responsable de la depleción de otros osmolitos orgánicos como el mioinositol o la taurina. La depleción intracelular de mioinositol conlleva una disminución de la síntesis de fosfoinosidos, teniendo consecuencias negativas un aumento del calcio intracelular (que es inductor de la apoptosis), la activación de la proteína Quinaza C (PKC) y la actividad alterada de la bomba Na⁺/K⁺ ATPase (Tomlinson et al. 1994).

Pero la principal consecuencia de la activación de la vía de los polioles parece ser la modificación del potencial redox de las células. Así, la vía de los polioles consume NADPH y del NAD⁺, en detrimento de otras reacciones que requieren igualmente estos cofactores (Figura 31). En particular la glutatión reductasa, enzima fundamental para la regeneración del glutatión reducido, utiliza niveles elevados de NADPH. La disminución de reservas del NADPH para el ciclo redox del glutatión podría aumentar el estrés oxidante y así se favorece la apoptosis celular contribuyendo en la patogénesis de la retinopatía. La vía de los polioles compite con otras reacciones

que necesitan NADPH, como la síntesis de NO por la NO sintetasa. Como ha sido demostrado la producción de NO es deficiente en los pacientes diabéticos (Calver et al. 1992), y este déficit se previene por la inhibición de la aldosa reductasa en las ratas diabéticas (Cameron y Cotter 1992).

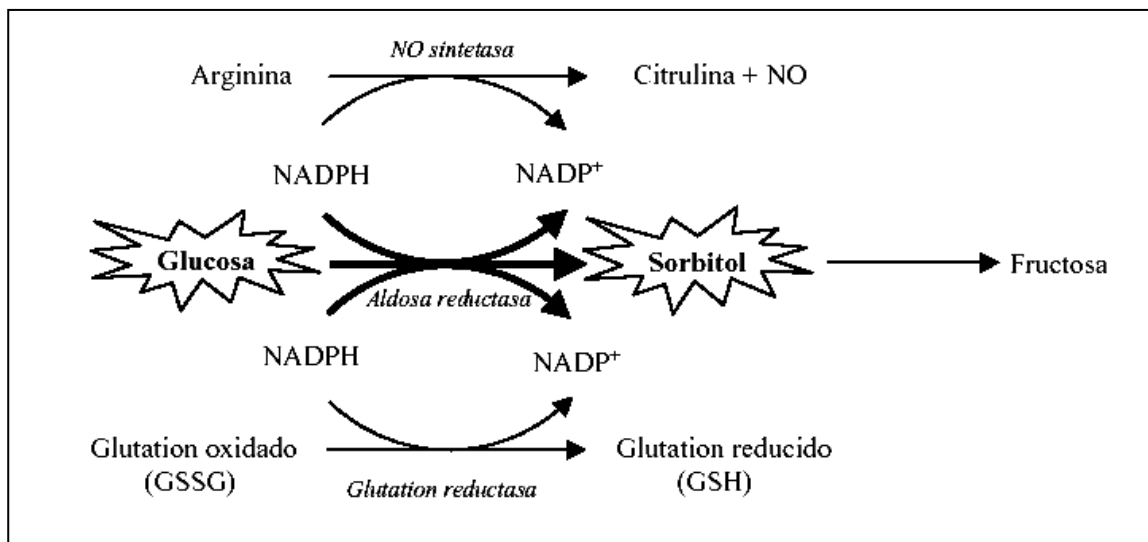


Figura 31. Competición de las diversas reacciones por el NADPH.

La implicación de la vía de los polioles en el desarrollo de la retinopatía diabética queda aun llena de controversias. Numerosos trabajos han demostrado la presencia de la aldosa reductasa en cultivos de pericitos retinianos de diversas especies, incluido el hombre (Buzney et al. 1977; Hohman et al. 1989; Sato et al. 1999). En todo caso parece que esta enzima esta ausente en las células endoteliales retinianas de la mayoría de las especies (Ludvigson y Sorenson 1980; Sato et al. 1999).

In vivo, el desarrollo y la severidad de la retinopatía ha sido correlacionada con el nivel de aldosa reductasa presente en el epitelio pigmentario retiniano (Vinores et al. 1988), en los eritrocitos (Nishimura et al. 1997) y en las mononucleares (Hasegawa et al. 1999).

Numerosos inhibidores de la aldosa reductasa han sido desarrollados con la esperanza de reducir la aparición de las complicaciones en la diabetes. Los diferentes estudios efectuados tanto en animales como en el hombre han dado resultados muy variables. En el hombre tratamientos de tres años con Epalrestat (Hotta et al. 1990) o de seis meses con Tolrestat (van Gerven et al. 1994) han mostrado ciertas mejorías en la clínica de la retinopatía diabética. Por el contrario, pacientes tratados durante tres años y medio con Sorbinil no han obtenido mejoría de su retinopatía. (Sorbinil Retinopathy

Trial Research β Group 1990). Recientemente se ha visto que el fidarestat puede reducir la permeabilidad vascular (Makino et al. 2001) prevenir el estrés oxidativo y la sobreproducción de VEGF en retinas de ratas diabéticas (Obrosova et al. 2003), no habiendo aun ningún estudio en humanos in vivo.

Parece ser que la vía de los polioles desempeña un papel mas importante en la apoptosis de los pericitos (Miwa et al. 2003) que en el de las células neuroretinianas (Asnaghi et al. 2003).

3.2. Vía de la hexosamina.

Implica la vía de la metabolización de la glucosa en UDP-N-acetilglucosamina. La fructosa-6-fosfato, formada a partir de la glucosa puede ser convertida en glucosamina-6-fosfato por la glutamina fructosa-6-fosfato amidotransferasa, antes de ser transformada en UDP-N-acetilglucosamina (Figura 32). Se ha demostrado que esta enzima esta presente en numerosos tejidos y células y que la hiperglucemia conduce al aumento de UDP-N-acetilglucosamina en diferentes células como las vasculares (Nerlich et al. 1998; Wu et al. 2001).

Este aumento parece tener dos consecuencias principales:

- la modificación de la glicosilación des glucoconjugados.
- la expresión de diferentes genes vía activación de factores de trascrición .

Así la UDP-N-acetilglucosamina interviene en la biosíntesis de las glucoproteínas y se ha demostrado que su aumento provoca un aumento de la cantidad de N-acetilglucosamina de estas glucoproteínas (Sayeski y Kudlow 1996). Por otra parte la UDP-N-acetilglucosamina puede transformarse fácilmente en UDP-N-acetilgalactosamina que interviene en la síntesis de numerosos glicoesfingolípidos. Se sabe los glucoconjugados de superficie, que juegan un papel importante en las interacciones celulares, están muy alterados en la retinopatía diabética (Ruggiero et al. 1997). Además se ha demostrado que el aumento de UDP-N-acetylglucosamina provoca la glicosilación del factor de trascrición SP1, lo que permite la activación de genes como los del Transforming Growth Factor (TGF) α y β 1 Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) (Du et al. 2000; Kolm-Litty et al. 1998; Sayeski and Kudlow 1996).

El TGF β parece desempeñar un papel en la retinopatía diabética controlando entre otras la síntesis de la matriz extracelular y la proliferación de las células

endoteliales. Su aumento parece además asociado a la retinopatía en los pacientes diabéticos (Pfeiffer et al. 1996).

Por otro lado la modificación de SP1 por la N-acetilglucosamina puede potencialmente regular otros genes y otros factores de transcripción.

La vía de la hexosamina abre por tanto amplias posibilidades en cuanto al descubrimiento de nuevos mecanismos en la patogénesis de la retinopatía diabética.

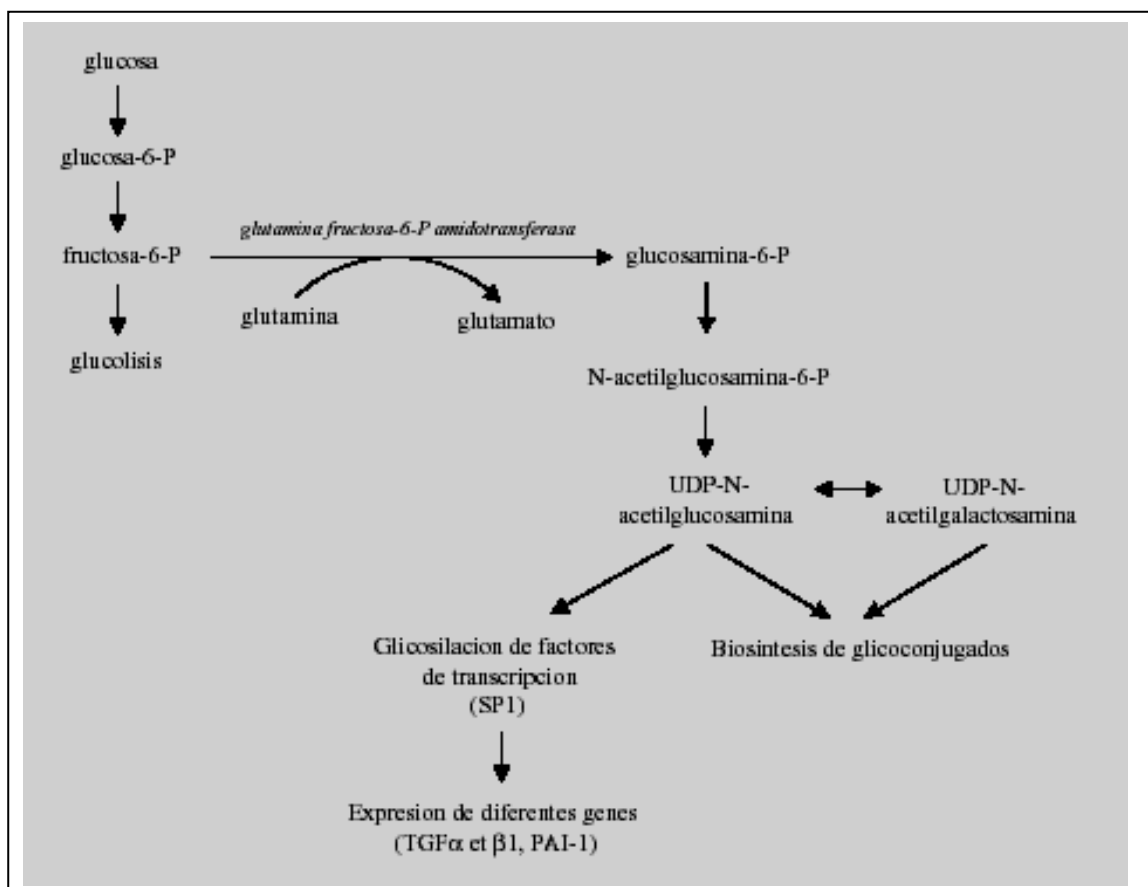


Figura 32. Vía de la hexosamina.

3.3 Productos finales de la glicación (Advanced Glycation Endproducts –AGES-)

3.3.1. Formación des AGEs (Stitt 2003)

Los AGEs son el resultado de un conjunto de reacciones agrupadas bajo el término de glicosilación no enzimática. Un glúcido reductor como la glucosa puede reaccionar con los grupos aminos de las proteínas y formarse una base de Schiff, estabilizándose a continuación en producto de Amadori (Figura 33). Esta primera etapa es reversible y depende de la concentración de glucosa y proteínas.

Un producto de Amadori muy conocido es la hemoglobina glicosilada (HbA1c), utilizada en los diabéticos como índice del control de la glucemia. Los productos de Amadori pueden:

-experimentar una fragmentación oxidativa y formar productos llamados de glicosilación como la carboximetilisina (CML).

-reagregarse dando lugar a la formación de compuestos dicarbonilos como la 3-desoxiglucosona (Figura 33).

Los dicarbonilos, altamente reactivos, reaccionan con los grupos aminos de las proteínas de vida media larga para dar lugar al nacimiento de los AGEs.

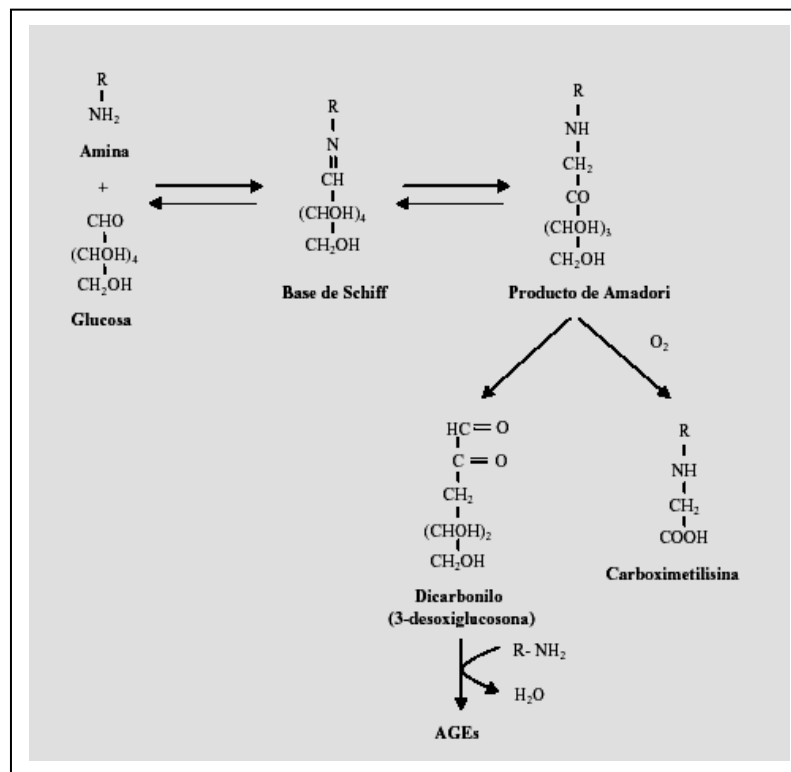


Figura 33. Glicosilación enzimática.

Los AGEs pueden también formarse a partir de:

- la unión de dos productos de Amadori.
- la reacción de un dicarbonilo con un producto de Amadori.

La formación de los AGEs es irreversible y se asocia a la producción de radicales libres. La glicosilación no enzimática tiene efectos en la estructura y función de las moléculas modificadas principalmente de las proteínas pero también de lípidos y ácidos nucleicos. En la diabetes las moléculas mas afectadas son las directamente expuestas a la glucosa sanguínea o de larga vida media como proteínas y células circulantes y las proteínas de la matriz extracelular. Por otro lado los AGEs pueden formarse en el interior de las células (Figura 34). También los AGEs son capaces de unirse a receptores de membrana e inducir diferentes respuestas celulares (Figura 35).

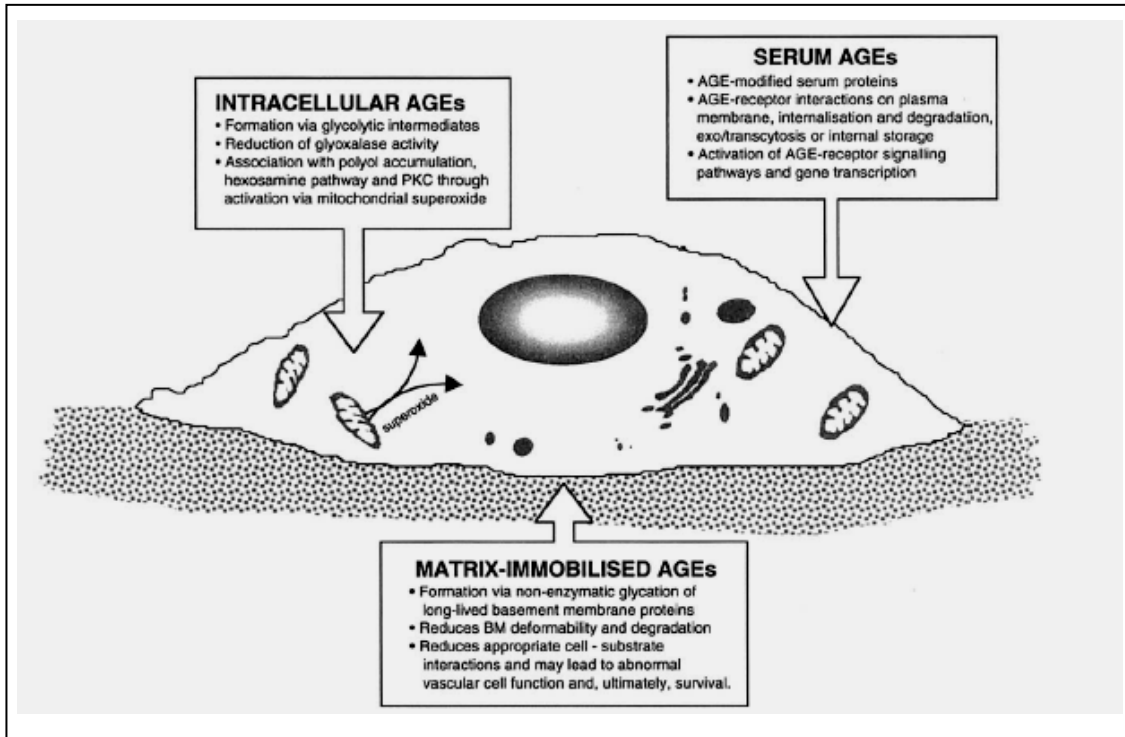


Figura 34. Exposición celular de las células retinianas a los AGEs (Tomado de Stitt 2003).

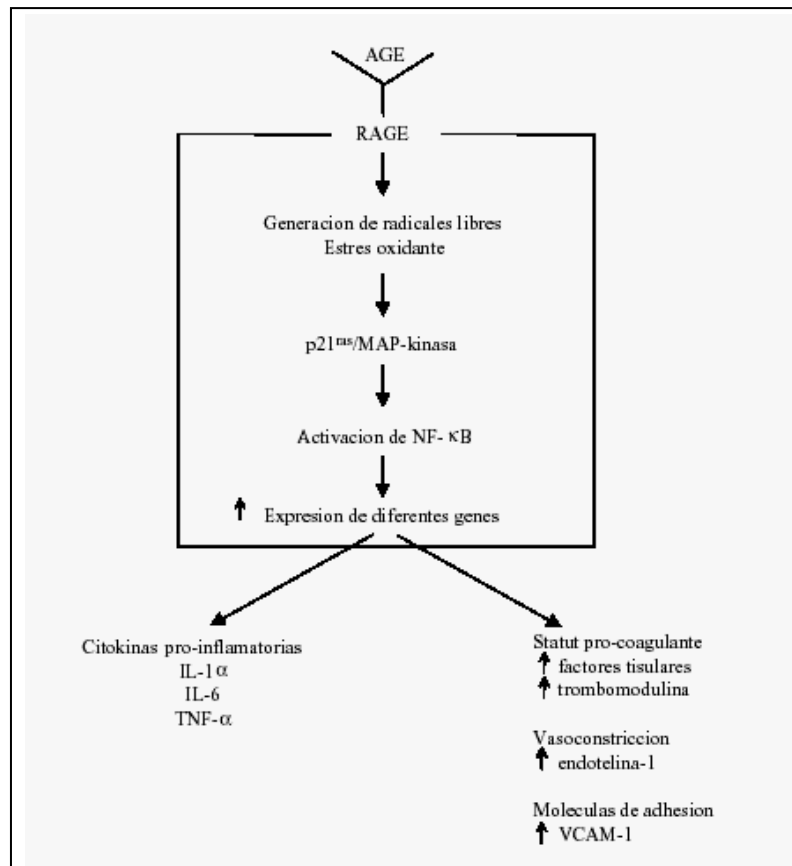


Figura 35. Efectos de la unión de AGEs con sus receptores (RAGE).

3.3.2. AGEs y la retinopatía diabética.

Numerosos trabajos sugieren la implicación de los AGEs en la patogénesis de la retinopatía diabética.

In Vitro, los AGEs modifican la proliferación de dos tipos celulares presentes en los microvasos retinianos : inhiben en particular el crecimiento de los pericitos (Chibber et al. 1997; Ruggiero-Lopez et al. 1997) e inducen la apoptosis de estos (Denis et al. 2001). Por otra parte, los pericitos retinianos proliferan menos en la matriz glicada mientras que las células endoteliales proliferan más (Kalfa et al. 1995).

Los AGEs son también capaces de alterar la glicosilación enzimática de las proteínas (Rellier et al. 1999) y la producción de prostaciclina (Yamagishi et al. 1996) en las células endoteliales retinianas. Se ha demostrado igualmente glicación de las proteínas intracelulares en los pericitos y las células endoteliales retinianas activadas en presencia de una concentración elevada de glucosa (Chibber et al. 1999).

In vivo, se ha puesto en evidencia un acumulo de AGEs a nivel de la membrana basal, de los pericitos y de las células endoteliales de las ratas diabéticas (Stitt et al. 1997). Mas concretamente estructuras como la carboximetilisina y los derivados imidazolones se han encontrado aumentados en las retinas de las ratas diabéticas (Hammes et al. 1999a). Además la inyección de AGEs en ratas normales induce disfunciones de su barrera hemato-retiniana así como un aumento en la expresión de VEGF (Stitt et al. 2000).

En el hombre la tasa de AGEs presentes en el suero, la cornea y el interior de los linfocitos T ha sido correlacionada positivamente con la severidad de la retinopatía diabética. (Aso et al. 2000; Hammes et al. 1999b; Sato et al. 2001). también se ha encontrado que los AGEs tiene un efecto proangiogénico, al menos en la exposición aguda (Okamoto et al. 2002). Por último, los inhibidores de la glicación han sido desarrollados recientemente, siendo el mas conocido la aminoguanidina. La aminoguanidina administrada a ratas diabéticas previene la desaparición de los peritos y de la proliferación de las células endoteliales retinianas y disminuye el número de capilares acelulares, de microaneurismas y de oclusiones vasculares (Hammes et al. 1995). Sin embargo parece que la prevención de las disfunciones por la aminoguanidina no esta relacionada con la inhibición de la glicación, pudiendo tener la aminoguanidina otro mecanismo de acción (Kern y Engerman 2001). Otro inhibidor es la piridoxamina, derivada de la vitamina B6, que impide la conversión de los productos de Amadori en AGEs (Voziyan et al. 2002). En ratas diabéticas es altamente efectivo en

la reducción retiniana de la acumulación de AGEs y también previene la alteración de la membrana basal y la pérdida de capilares (Stitt et al. 2002).

3.4. Activación de la proteína quinasa C- β

Las Proteínas quinasas son una familia de enzimas de membrana que funcionan como señales para una gran variedad de hormonas, neurotransmisores y citoquinas. Entre las diferentes isoformas la PKC β II es la forma activa predominante en los tejidos durante la hiperglucemia (Koya y King 1998) lo que es debido al aumento de producción de DAG (diacilglicerol) y de AGEs y al exceso de estrés oxidativo (Kowloru 2001a).

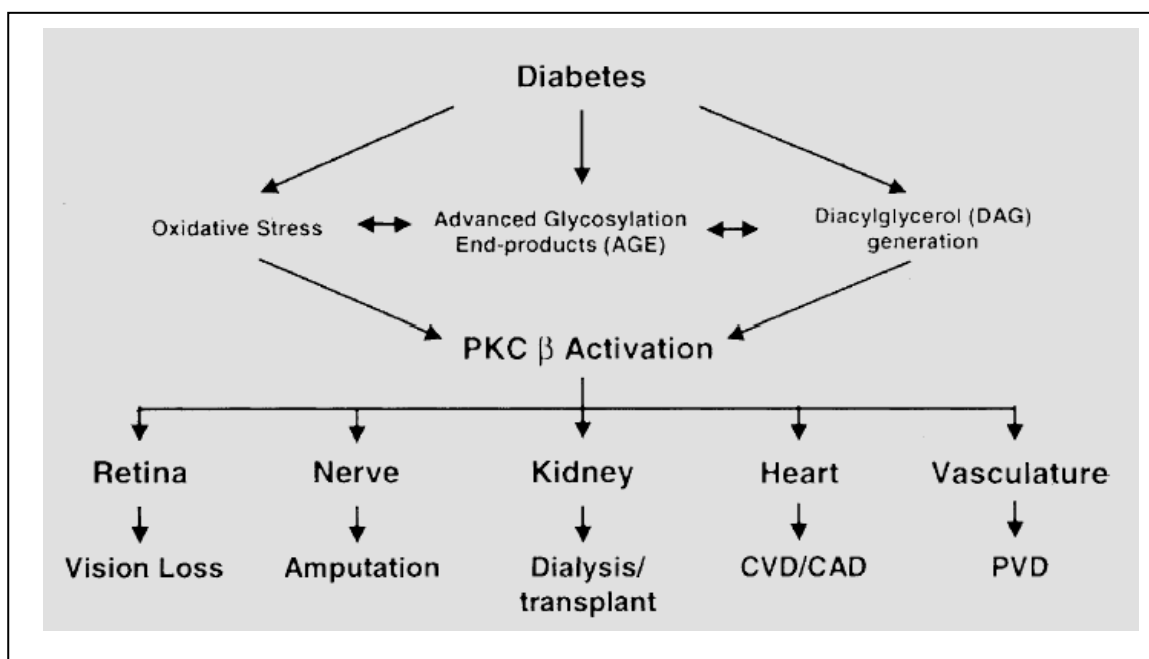


Figura 36. Activación de la Proteína quinasa C durante la diabetes (Tomado de Aiello 2002).

Las consecuencias de la activación de la PKC son múltiples. Se ha descrito una activación de la fosfolipasa A2 citosólica lo que conlleva la liberación de ácido araquidónico, la formación de prostaglandina E2 y la inhibición de bombas Na⁺/K⁺ ATPasas (Xia et al. 1995) Además activación de la PKC β por la glucosa es capaz entre de aumentar la proliferación celular, la producción de citoquinas y de proteínas de la matriz extracelular (Koya and King 1998) así como la contractilidad y la permeabilidad de los vasos (Aiello et al. 1997b; Park et al. 2000). El estrés oxidativo puede no solo ser causa de activación de la PKC sino también consecuencia: se ha observado un

mecanismo de producción de radicales libres mediante la activación PCK dependiente de la NADPH oxidasa (Inoguchi et al. 2000).

La implicación de la PKC β en los mecanismos patogénicos de la retinopatía diabética se ha confirmado por trabajos que utilizan inhibidores de esta enzima. Así la administración oral de un inhibidor permite mejorar las anomalías hemodinámicas que existen en la retina de ratas diabéticas (Ishii et al., 1996) y corregir el aumento de permeabilidad vascular inducida por inyección intravítrea de VEGF (Aiello et al. 1997b). Por tanto la PKC β parece participar en la cascada responsable de los efectos del VEGF.

La inhibición específica de la PKC β es posible usando fármacos tales como el LY333531. Los estudios experimentales indican que este compuesto puede inhibir cambios patológicos de la retinopatía como el incremento de permeabilidad y la formación de neovasos. La fase I del ensayo clínico mostró buena tolerancia del fármaco en humanos (Aiello 2002). La fase II se ha completado y la fase III ha comenzado. Hasta la fecha, no parece tener efectos secundarios clínicamente significativos (Aiello 2003).

3.5. El aumento del estrés oxidante.

El estrés oxidante resulta de un desequilibrio entre la producción de radicales libre altamente reactivos y su destrucción por mecanismos de defensa antioxidante.

Los radicales libres pueden a su vez atacar diferentes moléculas como los lípidos, las proteínas o los ácidos nucleicos y causar daños celulares. Pueden asimismo participar como mediadores intracelulares en concentraciones subtóxicas activando factores de transcripción como el NF- κ B. En la diabetes se ha observado a la vez una disminución de las defensas antioxidantes y un aumento de la producción de radicales libres que causa un aumento de los marcadores del estrés oxidante como los marcadores de la peroxidación lipídica.

3.5.1. Aumento de producción de radicales libre en la diabetes y la retinopatía. Alteración de las defensas antioxidantes. Marcadores de estrés oxidativo en la diabetes y la retinopatía.

La hiperglucemia puede inducir una producción incrementada de radicales libre por varios mecanismos:

1) La glucosa puede ser auto-oxidada mediante una reacción catalizada por metales de transición (durante la cual se producen aniones superóxido (O_2^-)) (Wolff and Dean 1987). Estos son precursores del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y del radical

hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), muy reactivo, que puede dañar proteínas, lípidos o ácidos nucleicos (Figura 37). La auto-oxidación de la glucosa parece ser la principal fuente de radicales libres (Maritim, Sanders y Watkins 2003).

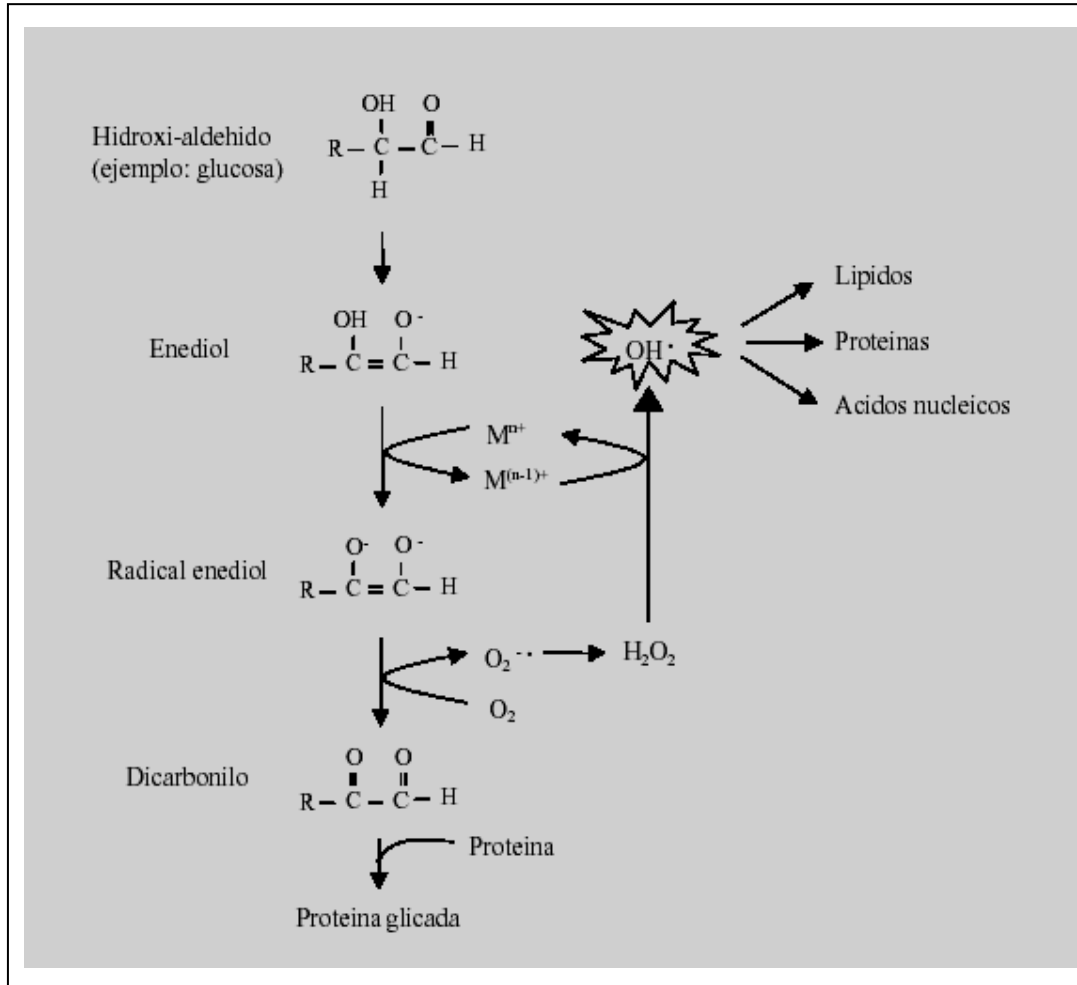


Figura 37. Auto oxidación de la glucosa.

2) La hiperglucemia induce también un aumento de la relación NADH/NAD^+ principalmente por la activación de la vía de los polioles. Así pues el el NADH es cofactor o substrato de diferentes enzimas catalizadoras de reacciones que generan radicales libres. Es el caso por ejemplo de la prostaglandina hidroxidasa y de la NADH oxidasa (Ellis et al. 1998; Kukreja et al. 1986).

3) También se pueden liberar reacciones libres como resultado de la glicosilación no enzimática de proteínas, lípidos o ADN o como resultado de la unión de AGEs a su receptor, como ya hemos visto en capítulos anteriores.

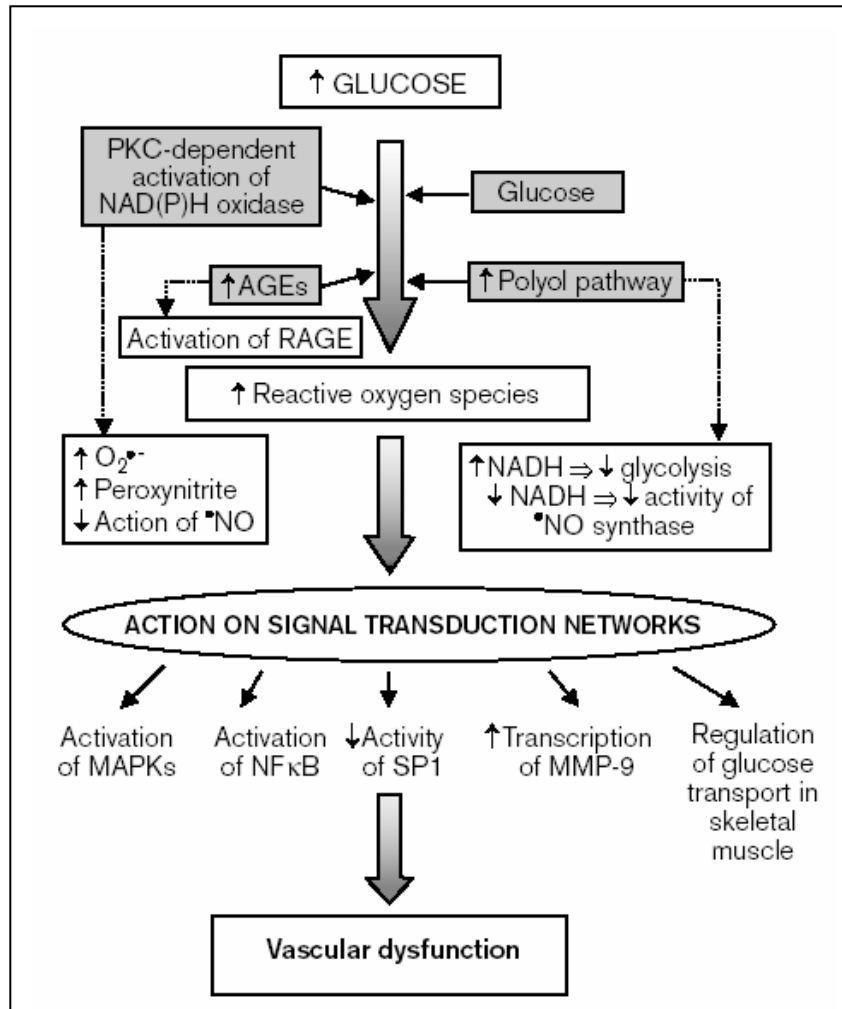


Figura 38. Relación entre la glucosa y la producción de especies reactivas del oxígeno. AGE, Advanced glycation endproduct; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MMP, matrix metalloproteinase; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form; NFκB, nuclear factor kappa B; NO, nitric oxide; O₂^{•-}, superoxide; PKC, protein kinase C; RAGE, advanced glycation endproduct receptor; specific protein 1 (Tomado de Bonnefont-Rousselot 2002)

Se han observado una disminución de las defensas antioxidantes en el curso de la diabetes. Así se ha descrito una disminución de la capacidad antioxidante plasmática total (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos) en los pacientes con diabetes tipo II (Ceriello et al. 1997) aunque menos acentuada en los pacientes tipo 1 (Seghrouchni et al. 2002). Asimismo otro estudio ha demostrado la disminución de la superóxido dismutasa cobre/zinc dependiente (SOD Cu/Zn) en los individuos diabéticos no insulino-dependientes así como una reducción de las tasas de vitaminas E y C (Rema et al. 1995).

La disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes podría explicarse por la glicación como la descrita para la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa eritrocitarias (Arai et al. 1987; Baldwin et al. 1995), la catalasa (Yan y Harding JJ 1997) y la glutatión reductasa (Blakytyn y Harding 1992). Por contra varios trabajos muestran un aumento de las enzimas antioxidantes como la catalasa o la glutatión peroxidasa en los pacientes diabéticos (Al-Abrash AS et al. 2000; Rema et al. 1995), en ratas diabéticas (Sechi et al. 1997) o en células endoteliales incubadas en presencia de altas concentraciones de glucosa (Ceriello et al. 1996). Estos resultados sugieren un mecanismo compensatorio de los tejidos frente a una producción elevada de radicales libres.

En la retina de los pacientes diabéticos se encuentran también modificaciones de las defensas antioxidantes que se encuentran o bien disminuidas o bien aumentadas probablemente por un mecanismo compensatorio. Así en la retina de las ratas diabéticas se comprueba una disminución de las enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa, la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa cobre/zinc dependiente (SOD Cu/Zn) o la catalasa (Kowluru et al. 1997; Obrosova et al. 2000), siendo la principal localización de la lipoperoxidación a nivel de los fotorreceptores y la retina interna (Pinazo-Duran 2000). Se ha descrito asimismo un aumento de metabolitos de Malonildialdehído (MDA) y de 4-hidroxinonenal (4-HNE) y una disminución de la actividad de la superóxido dismutasa y de la catalasa en muestras de vítreo de pacientes con vitreorretinopatía proliferativa diabética (Verdejo et al. 1999)

Además se ha correlacionado con la retinopatía diabética una disminución de los niveles séricos de vitamina C en el hombre pero no con variaciones de la actividad superóxido dismutasa ni de la glutatión peroxidasa (Gurler et al. 2000). Por otra parte los AGEs inducen un aumento de ciertas enzimas antioxidantes de los pericitos retinianos (Paget et al. 1998).

La producción de radicales libres en los sistemas biológicos es difícilmente medible. El aumento del estrés oxidante en la diabetes ha sido demostrado principalmente por un aumento de los daños causados por los radicales libres sobre proteínas y lípidos. El principal marcador del aumento de radicales libres es el aumento de la peroxidación lipídica. Varios estudios han evidenciado el aumento de productos de la peroxidación lipídica en la diabetes como los TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) o los isoprostanos (Aydin et al. 2001; Gopaul et al. 1995).

El aumento de productos de peroxidación se ha correlacionado con la presencia de microangiopatías (Jennings et al. 1987). Sin embargo se ha demostrado que los ácidos aminados de las proteínas de la matriz extracelular no se oxidados en los pacientes diabéticos, lo que indica que la diabetes no conduce a un estrés oxidante generalizado (Wells-Knecht et al. 1997). Al contrario los llamados productos de la glicosilación están aumentados en la diabetes. La autooxidación de glúcidos o lípidos permite la formación de dicarbonilos altamente reactivos como el glicoxal, el metilglicoxal, etc...Estos compuestos dicarbonilos, que pueden reaccionar como grupos amino de proteínas y formase así AGEs, estarían en el origen de un “estrés carbonilo” en relación con las complicaciones microvasculares asociadas a la diabetes (Miyata et al. 1999a; Miyata et al. 1999b).

En la retina se ha evidenciado un aumento de TBARS en ratas diabéticas (Kowluru et al. 1996; Obrosova et al. 2000). En el hombre los TBARS se han encontrado significativamente aumentados en pacientes diabéticos que presentan retinopatía en relación a aquellos pacientes diabéticos sin ninguna complicación angiopática (Gurler et al. 2000).

3.5.2. Implicación del estrés oxidante en la retinopatía diabética.

En resumen, es patente que existe estrés oxidante en la diabetes puesto en evidencia por un aumento de marcadores de peroxidación lipídica y una alteración de las defensas antioxidantes. Sin embargo existe controversia en cuanto a la participación real de este estrés en la patogenia de las microangiopatías. Algunos autores piensan que el estrés oxidante no interviene mas que como un agente potenciador en el curso de las alteraciones celulares observadas en la diabetes (Wells-Knecht et al. 1997).

Por otro lado, estudios recientes que han utilizado antioxidantes inducen a pensar que la corrección del estrés oxidante permite mejorar los efectos vasculares de la diabetes. La administración oral a ratas diabéticas de Trolox, un antioxidante, ha permitido la conservación parcial de sus pericitos retinianos (Ansari et al. 1998). Por otro lado la utilización de ácido lipoico ha permitido mejorar la reactividad vascular y la morfología de los vasos de las ratas diabéticas (Kocak G et al. 2000), y prevenir un aumento de VEGF en sus retinas (Obrosova et al. 2001). Mas recientemente la administración oral de una mezcla de antioxidantes (bien una dieta rica en vitamina C + vitamina E o bien un complejo vitamínico que contenía trolox + α -tocoferol + N-acetilcisteína + ácido ascórbico + β -caroteno + selenio) a ratas diabéticas un mínimo de

12 y un máximo de 18 meses ha permitido reducir a la mitad la pérdida de pericitos y el número de capilares acelulares (Kowluru et al. 2001b).

Como ya se ha mencionado el flujo sanguíneo retiniano decrece en la diabetes temprana y esto es consecuencia en parte de una disminución de la síntesis endotelial de NO, una elevación de niveles de DAG y un incremento en la activación de la PKC-β retiniano.

El tratamiento con Vitamina C mejora la vasodilatación derivada del endotelio en pacientes diabéticos tipo 1 (Timini et al. 1998). El tratamiento con vitamina E de ratas diabéticas reduce los niveles retinianos de DAG, normaliza la activación de la PKC-β retiniano, normaliza el flujo sanguíneo retiniano (Kunisaki et al. 1995) y restaura la relajación aórtica dependiente del endotelio mediada por óxido nítrico (Keegan 1995). A pesar de la elevación mantenida de la hiperglucemia. En pacientes diabéticos que no tenían retinopatía o esta era mínima la administración de altas dosis de vitamina E durante 4 meses normalizó el flujo sanguíneo retiniano a pesar de que el control de la glucemia permaneció sin cambio (Bursell et al. 1999). La vitamina E además de reducir la cantidad de radicales libres inhibe la PKC directamente con lo que su acción puede ser dual a nivel de ambas vías (Speicher et al. 2003), que por otra parte están muy interrelacionadas.

III. Epidemiología de la retinopatía diabética.

La retinopatía diabética es la causa más importante de ceguera legal de la población en edad laboral activa. La diabetes tipo 1 está asociada a afectación visual con más frecuencia y con más severidad que la tipo 2. Sin embargo como solo supone un 5-10% de toda la población diabética, los diabéticos tipo 2 constituyen la mayor parte de los afectados por RD (Klein R, Klein BEK y Moss SE, 1984). Varios factores sistémicos se han relacionado con el aumento del riesgo de aparición y progresión de la retinopatía diabética (Tabla 4).

Duración de la Diabetes
Pobre control de la Glucemia
Hipertensión
Dislipemia
Enfermedad renal
Anemia
Embarazo

Tabla 4. Factores sistémicos asociados a la progresión de la Retinopatía Diabética.

1. Duración del proceso. Control de la Glucemia. Control de la Tensión Arterial. Dislipemia.

La duración de la diabetes es uno de los factores de riesgo principales. Fue bien estudiada en el Estudio epidemiológico de la retinopatía diabética de Wisconsin (USA). Después de 5 años, aproximadamente el 25% de los pacientes tipo 1 presentan retinopatía. Después de 10 años, casi el 60% tienen retinopatía y después de 15 años el 80%. La retinopatía diabética proliferativa (RDP), que es la forma de la enfermedad que más amenaza la visión, está presente en aproximadamente un 25% de los pacientes tipo 1 con una duración de la enfermedad de 15 años (Klein et al. 1984a).

Entre los pacientes tipo 2 con duración filiada de su enfermedad de menos de 5 años, el 40% de los que requieren insulina y el 24% de los que no la requieren presentan retinopatía. Estas prevalencias aumentan hasta un 84% y 53% respectivamente cuando la duración de la diabetes se ha documentado a los 19 años. La RDP se desarrolla en un 2% de los pacientes que tienen diabetes menos de 5 años y en un 25% de los pacientes con diabetes de 25 años o más de evolución (Klein et al. 1984b). Las progresiones de la retinopatía en 10 años en el estudio de Wisconsin fueron mayores en diabéticos tipo 1 que en diabéticos tipo 2 (Tabla 5).

	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2 con insulina	Diabetes tipo 2 sin insulina
Incidencia Retinopatía	89%	79%	67%
Progresión Retinopatía	76%	69%	53%
Progresión a forma Proliferativa	30%	24%	10%

Tabla 5. Incidencia y progresión de la RD a los 10 años de seguimiento
(Tomado de Klein et al. 1994a).

En un estudio reciente se valoró la prevalencia de la diabetes y la retinopatía diabética en mayores de 65 años observándose que ambas aumentaban considerablemente durante el periodo de observación (entre 1991 y 1999). (Tabla 6).

	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999
Sample size	20325	19183	18073	16841	15512	14141	12840	11586	10476
Diabetes mellitus, % of total sample	14.5	16.5	18.1	19.7	21.2	22.6	23.7	25.0	25.6
Proliferative diabetic retinopathy	2.1	2.2	2.2	2.6	3.1	3.4	3.5	3.7	3.8
Background diabetic retinopathy	5.4	7.2	8.6	10.0	11.1	12.3	13.5	13.9	15.1
Macular edema	0.4	0.6	0.8	0.8	1.2	1.3	1.5	1.8	2.1
Any diabetic retinopathy or macular edema	6.9	9.0	10.5	12.0	13.4	14.2	15.6	16.2	17.4
Any diabetic retinopathy or macular edema, % of total sample	1.0	1.5	1.9	2.4	2.8	3.2	3.7	4.0	4.4

Tabla 6. Prevalencia de la Diabetes Mellitus y la Retinopatía diabética en una población de mayores de 65 años
(Tomado de Lee et al. 2003).

En lo que respecta al control de la glucemia, ésta puede determinarse directamente mediante la glucemia capilar o indirectamente mediante el porcentaje de hemoglobina glicosilada (HbA1c). La HbA1c se correlaciona con la glucemia media de los 2-3 meses precedentes a la determinación.

A1C (%)	Mean plasma glucose	
	mg/dl	mmol/l
6	135	7.5
7	170	9.5
8	205	11.5
9	240	13.5
10	275	15.5
11	310	17.5
12	345	19.5

Tabla 7. Correlación entre la HbA1c y la glucemia media
(Tomado de American Diabetes Association 2003).

Ya los estudios epidemiológicos de Wisconsin demostraron una estrecha relación entre la hemoglobina glicosilada (HbA1c) medida en el momento de inicio y a los 10 años de seguimiento y la progresión de la retinopatía en pacientes con diabetes (Figura 39).

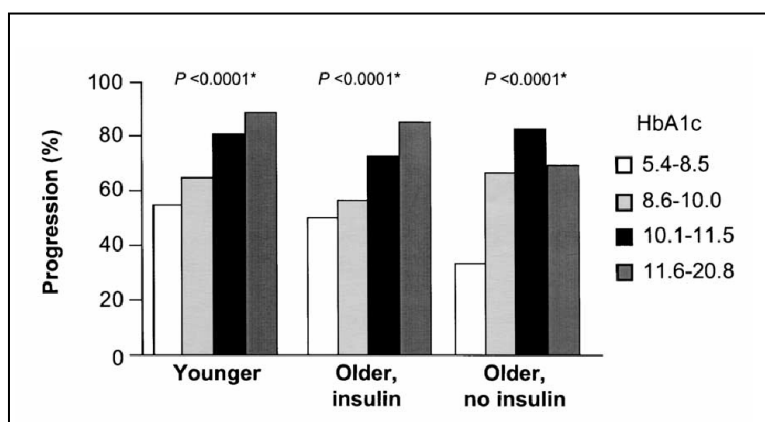


Figura 39. Relación entre la hemoglobina glicosilada medida al principio del estudio y a los diez años de seguimiento de la retinopatía diabética en jóvenes diabéticos insulino dependientes, en personas mayores insulino dependientes y en personas mayores no insulino dependientes. Estudio Epidemiológico de la Retinopatía diabética de Wisconsin
(Tomado de Klein et al 1994b).

Dos importantes estudios, El estudio Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) y el estudio United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) han demostrado los efectos beneficiosos del control intensivo glucémico en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2. El DCCT concluyó una mayor progresión de la RD en pacientes diabéticos tipo 1 con terapia convencional en comparación a pacientes con terapia

intensiva de insulina tanto en un grupo de prevención primaria (pacientes diabéticos sin retinopatía) como en un grupo de intervención secundaria (pacientes diabéticos con retinopatía). (Tabla 8).

Diabetes Control and Complications Trial, 1983–1993	
Características	
Paciente asignados al azar al grupo del tratamiento convencional o intensivo	
Grupo de tratamiento Convencional	
Inyecciones de insulina 1 o 2 veces por día	
Automonitorización diaria de la glucosa en sangre o en orina	
Visitas clínicas cada 3 meses	
Educación en dieta y ejercicio	
Grupo de tratamiento Intensivo	
Bomba de insulina o 3 o más inyecciones de insulina diarias	
Automonitorización de la glucemia 4 o más veces al día	
Dosis de insulina ajustadas a glucemia, dieta y ejercicio	
Plan de dieta y ejercicio	
Hospitalización inicial para implementar el tratamiento	
Visitas clínicas semanales o mensuales con frecuentes contactos telefónicos	
Randomización	
1441 patients	
Prevención primaria	
Intervención secundaria	
Control de la glucemia Convencional vs Intensivo	
Factores analizados	
Desarrollo/progresión de la Retinopatía Diabética (RD)	
Evaluación de Neuropatía/nefropatía	
Criterios de elección de pacientes	
DM Tipo 1 diabetes mellitus (DM)	
Edad de 13 a 39 a.	
Ausencia de hipertensión, hipercolesterolemia y complicaciones médicas o diabéticas severas	
Cohorte de prevención primaria	
DM Tipo 1 de 1 a 5 a.	
Sin RD en siete fotografías estereoscópicas de fondo de ojo	
Secreción urinaria de albumina < 40 mg/24 horas	
Conclusiones del grupo de prevención primaria (seguimiento medio de 6.5 a.)	
Control intensivo de glucemia	
Reducción del 27% en el desarrollo de RD	
Reducción del 78% en la progresión de la RD	
Cohorte de intervención secundaria	
DM Tipo 1 de 1 a 15 a.	
RD no proliferativa leve o moderada	
Secreción urinaria de albumina < 200 mg/24 hours	
Conclusiones del grupo de intervención secundaria (seguimiento medio de 6.5 a.)	
Control intensivo de glucemia	
Reducción del 54% en la progresión de la RD	
Reducción del 47% en RD proliferativa y no proliferativa severa	
Reducción del 56% en necesidad de fotocoagulación	
Reducción del 23% en edema macular	
Conclusiones Generales del Control intensivo de glucemia	
Niveles medios más bajos de HbA1C en grupo intensivo (7.2%) que en grupo convencional(9.1%)	
Reducción de la retinopatía clínicamente significativa entre un 27% y un 76%	
Reducción de la nefropatía clínicamente significativa entre un 34% to 57%	
Riesgo reducido de otras complicaciones microvasculares de la DM	

Tabla 8. Resumen del DCCT
(Tomado y modificado de Aiello 2003)

Otras conclusiones del DCCT fueron que los factores de riesgo el desarrollo de un empeoramiento precoz eran: Un nivel inicial de HbA1c alto, la severidad de la retinopatía de base y la duración de la diabetes. Resulta clínicamente significativo que el riesgo reducido de progresión en la retinopatía y en la nefropatía resultante de la terapia

intensiva con insulina persistió durante 4 años después del final del estudio DCCT a pesar de la equiparación de niveles de control de la glucemia en ambos grupos (The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group 2000).

Asimismo UKPDS mostró una mayor progresión de la RD en pacientes diabéticos tipo 2 con terapia convencional (control dietético que consiguió media de HbA1c de 7.9%) en comparación a pacientes con control intensivo (sulfonilurea, insulina o metformina con lo que se consiguió una HbA1c de 7.0%).

United Kingdom Prospective Diabetes Study 1977-1999	
Características	
Randomización	
	4,209 pacientes
Prevención primaria	
Intervención secundaria	
	Control de glucemia convencional vs intensivo
Factores analizados	
	Desarrollo/progresión de la Retinopatía Diabética (RD)
	Evaluación de Neuropatía/nefropatía/riesgo cardiovascular
Pacientes asignados al azar: tratamiento convencional/intensivo	
Grupo de tratamiento	
	Grupo de tratamiento convencional
	Control de dieta
	Seguido por sulfonilurea, insulina o metformina
Grupo de tratamiento intensivo	
	Sulfonilurea
	Insulina
	Si sobrepeso: metformina
Criterios de elección	
	DM tipo 2 recién diagnosticada
Cohorte de prevención primaria	
	DM tipo 2 recién diagnosticada
	Sin RD en siete fotografías estereoscópicas de fondo de ojo
Cohorte de intervención secundaria	
	DM tipo 2 recién diagnosticada
	RD no proliferativa leve o moderada
Conclusiones (seguimiento medio 10 a.)	
	Reducción de la retinopatía (entre un 27% y un 76%)
	Reducción del 17% en la progresión de la RD
	Reducción del 29% en la necesidad de fotocoagulación
	Reducción del 23% en hemorragias vítreas
	Reducción del 24% en necesidad de extracción de catarata
	Reducción del 16% en cegueras legales
	Reducción en la nefropatía entre un 34% y un 57%
	La presión sanguínea es un factor de riesgo independiente para la progresión de la RD

Tabla 9. Resumen del estudio UKPDS
(Tomado de Aiello 2003).

De los resultados de estos dos estudios se ha estimado los siguientes objetivos en el control glucémico en los pacientes diabéticos:

Glycemic control	
A1C	<7.0%*
Preprandial plasma glucose	90–130 mg/dl (5.0–7.2 mmol/l)
Peak postprandial plasma glucose	<180 mg/dl (<10.0 mmol/l)

Tabla 10. Recomendaciones para control glucémico en adultos
(Tomado de American Diabetes Association 2003).

Diversos estudios han evaluado la asociación entre hipertensión y retinopatía diabética.

En Diabetes tipo 1:

-En el WESDR la presión diastólica resultó un factor predictor de la progresión de la retinopatía diabética y de la incidencia de retinopatía proliferativa en pacientes DM tipo 1 (Klein et al. 1998).

-En el estudio The EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (EUCLID) se obtuvo como conclusión que el uso de un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA) , en este caso el lisinopril durante 2 años, en pacientes DM tipo 1 normotensos reduce un 50% de la progresión de la RD. También se reduce la incidencia de RD proliferativa (Chauverdi et al. 1998).

En Diabetes tipo 2:

-En un estudio del UKPDS la incidencia de retinopatía se asoció a la presión sanguínea sistólica. Por cada 10 mmHg de disminución en la presión sistólica media se conseguía una reducción del 13% en las complicaciones microvasculares de pacientes DM (Adler et al. 2000).

-En otro estudio del UKPDS se obtuvo como conclusión que el descenso de la presión arterial (se demostraron igualmente efectivos un betabloqueante como el atenolol y un IECA como el captopril) descende un 34% la progresión de la RD, un 35% la necesidad de fotocoagulación y un 47% el deterioro de la agudeza visual. Esto es debido a la reducción de la incidencia del edema macular diabético (UK Prospective Diabetes Study Group 1998b).

-En un periodo de seguimiento de 5 años no hay diferencia significativa entre el control intensivo y moderado de la tensión arterial en relación a la progresión de la RD

en pacientes DM tipo 2. Esto sugiere la existencia de un umbral de tensión arterial por debajo del cual se alcance la disminución del riesgo de progresión de la RD (Estacio et al. 2000).

Los estudios anteriores parecen indicar que los efectos de la tensión arterial en la progresión de la RD son independientes de la glucemia, pudiendo el control de la HTA prevenir la pérdida visual. Una cifra recomendable de tensión arterial según la American Diabetes Association es de <130/80.

Finalmente en cuanto al perfil lipídico, los triglicéridos y los lípidos están asociados con exudados duros retinianos en pacientes con diabetes. En los años sesenta se realizaron ensayos con medicamentos para reducir la concentración de lípidos en sangre (clofibrato o atomid). Estos reducían la cantidad de exudados duros retinianos pero sin mejoría de la agudeza visual (Duncan et al. 1968; Cullen, Ireland y Oliver, 1964).

En el WESDR se asoció la concentración alta de colesterol sérico a la alta prevalencia de exudados duros retinianos en diabéticos que usaban insulina, pero no en diabéticos tipo 2 no insulino dependientes (Klein et al. 1991).

En el ETDRS, se asociaron niveles altos de lípidos séricos (triglicéridos, LDL y VLDL) con un riesgo aumentado de desarrollo de exudados duros en la macula y de reducción de la agudeza visual (Chew 1996).

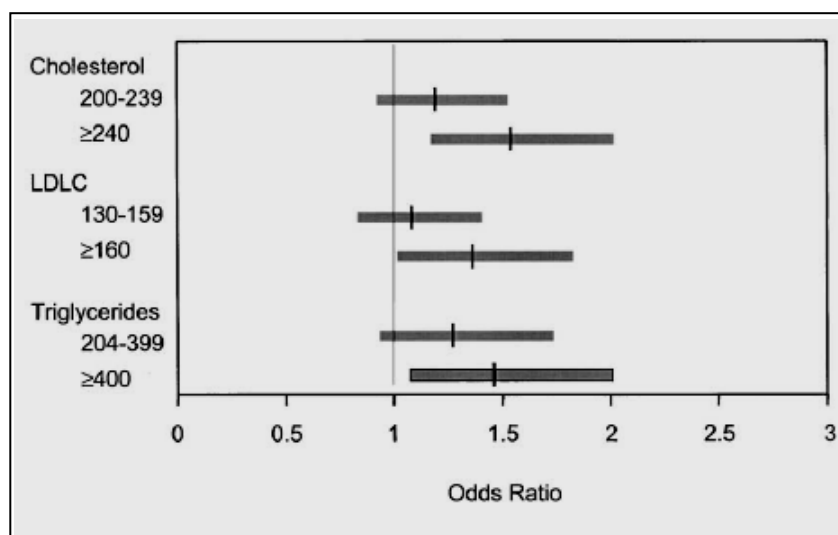


Figura 40. Asociación de niveles de lípidos con la incidencia de exudados duros en el The Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (Tomado de Chew 1996).

Hasta ahora no hay ningún ensayo clínico que haya mostrado la eficacia de fármacos en la reducción de la progresión de la retinopatía, la incidencia del edema macular o la pérdida de visión.

Los niveles de lípidos recomendados en los pacientes diabéticos son los siguientes:

Lipids	
LDL	<100 mg/dl (<2.6 mmol/l)
Triglycerides†	<150 mg/dl (<1.7 mmol/l)
HDL	>40 mg/dl (>1.1 mmol/l)‡

Tabla 11. Recomendaciones para de lípidos séricos en adultos
(Tomado de American Diabetes Association 2003).

2. Enfermedad renal.

La relación entre neuropatía y retinopatía ha sido ampliamente demostrada. La interrelación entre ambas es compleja. Ambas pueden tener varios factores predisponentes: así la hiperglucemia, una HbA1c alta, la duración de la diabetes y la presión arterial elevada son factores predisponentes para ambas entidades (Aiello, Cahill y Wong, 2001). Varios estudios han demostrado que la presencia y severidad de la RD son indicadores de riesgo de proteinuria importante como un estudio del WESDR que reveló que la mitad de los pacientes DM tipo 1 con RDP y 10 años o más de diabetes tenían proteinuria (Klein et al., 1986). Inversamente la proteinuria predice la RDP (Klein, Moss y Klein, 1993). Por otro lado si la proteinuria es importante se asocia con un riesgo del 95% de desarrollar edema macular en pacientes DM tipo 1 (Klein et al., 1998), debido presumiblemente a la disminución de la presión oncótica.

3. Anemia.

El hematocrito bajo es uno de los factores de riesgo independientes en la ETDRS para el desarrollo de PDR y pérdida visual severa (Davis, Fisher y Gagnon 1998).

Otro estudio realizado en Finlandia con 1691 individuos ha demostrado que los pacientes con hemoglobina menor de 12 g/dl comparados con aquellos con niveles más altos tiene el doble de riesgo en el desarrollo de retinopatía y que de los pacientes con retinopatía, aquellos con bajos niveles de hemoglobina tenían un riesgo cinco veces mayor de retinopatía severa (Quiao, Keinanen-Kiukaanniemi y Laara 1997).

4. Embarazo.

Durante el embarazo la retinopatía puede progresar rápidamente pero esta es normalmente una progresión pasajera ya que a largo plazo el embarazo no parece

incrementar la progresión de la RD. Las embarazadas con peor control de la glucemia en el primer trimestre son las que tienen mayor riesgo de progresión de la RD (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 2000).

5. Otros factores de riesgo para la RD.

Otros factores que se han estudiado en relación con la RD son:

Tabaquismo
Alcohol
Sedentarismo

Tabla 12. Otros factores estudiados en relación con la RD.

El tabaco causa hipoxia tisular mediante el incremento en sangre del monóxido de carbono. Además el tabaco incrementa la agregación y adhesividad plaquetaria. Por estos dos mecanismos es un factor de riesgo claro para enfermedades cardiovasculares. Sin embargo el papel del tabaco en la retinopatía diabética permanece mal conocido pues algunos estudios han sugerido una asociación y otros no (Aiello 2001). En una revisión sistemática la asociación entre el tabaco y la RD parece menos consistente que la encontrada entre el tabaco y la nefropatía (Muhlhauser 1994). En todo caso se recomienda a los pacientes no fumar.

Existen pocos estudios al respecto pero se podría prever que el alcohol fuese un factor protector por disminución de la agregación plaquetaria. En el WESDR el consumo de alcohol no pareció aumentar el riesgo de retinopatía y parecía tener un efecto beneficioso en diabéticos jóvenes (Moss Klein y Klein 1992)

No hay asociación entre el ejercicio físico y la presencia y severidad de la retinopatía diabética (Cruickshanks et al. 1992). De todas formas se recomienda en todos los programas de salud favorecer el sistema cardiovascular evitando el sedentarismo.

Hipertensión arterial (HTA) y Retina.

I. Definición y Prevalencia de la HTA.

La hipertensión arterial (HTA) se define como aquella en la que la presión sistólica (PAS) es mayor de 140 mmHg y la diastólica (PAD) mayor de 90 mmHg en varias mediciones durante 2 ó 3 semanas.

Categoría	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)
Normal	<130	<85
Normal-Alta	130-139	85-89
Hipertensión		
Grado 1 (leve)	140-159	90-99
Grado 2 (moderada)	160-179	100-109
Grado 3 (severa)	180-209	110-119
Grado 4 (muy severa)	>210	>120

Tabla 13. Clasificación de la HTA

(Tomado de The fifth report on the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 1993).

Es uno de los mayores problemas de salud pública pues tiene una prevalencia alta en la población y constituye uno de los principales factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, principal causa de muerte en los países desarrollados. En España la prevalencia global entre los 35 a los 64 de la HTA es de un 45.1%, aumentando con la edad (Banegas JR et al. 1998). Esta prevalencia es similar a la de los países vecinos, aunque mayor que en Estados Unidos o Canadá. En nuestro país menos de la mitad de los hipertensos (44.5%) saben que padecen HTA. De estos el 71.9% están tomando algún medicamento (32% de todos los hipertensos) y de estos tratados sólo el 15.5% están controlados (un total del 5% de los hipertensos) (Banegas JR et al. 1998). Esta mayoría de hipertensos deficientemente controlados puede explicarse por el hecho de mantener una terapia a largo plazo para una enfermedad asintomática particularmente cuando la terapia puede interferir con la calidad de vida y su beneficio no es obvio para el paciente.

Una vez diagnosticada la enfermedad deben realizársele a todo paciente, para descartar una etiología secundaria, una serie de estudios secundarios básicos como hemograma, creatinina análisis de orina, glucosa, lípidos, electrocardiograma y radiografía de tórax.

La mayoría de las ocasiones (90-95%) la causa es desconocida con lo que la HTA es esencial, idiopática o primaria.

II. Regulación Fisiológica de la Presión Arterial.

La presión arterial depende principalmente de dos variables hemodinámicas:

-El gasto cardiaco. Que esta muy influenciado por el volumen sanguíneo, que a su vez depende de la cantidad de sodio corporal. La regulación de la hemostasia del sodio y de los fluidos es fundamental en la regulación de la presión arterial.

-La Resistencia periférica total. Las resistencias vasculares periféricas están principalmente determinadas por el tamaño de la luz vascular. Este depende del tono vascular (dilatación-contracción) y del grosor de la pared arteriolar. El tono vascular normal resulta de la competición de sustancias vasoconstrictoras (que incluyen la angiotensina II, catecolaminas, tromboxano, leucotrienos y endotelina) y vasodilatadores (quininas, prostaglandinas y ácido nítrico). Ciertos productos metabólicos (como el ácido láctico) y la hipoxia pueden actuar también como vasodilatadores locales.

Por otra parte, las arteriolas tienen la capacidad de Autorregulación por la que los aumentos de flujo inducen vasoconstricción como un mecanismo adaptativo que protege a los tejidos ante un aumento excesivo de presión hidrostática.

1. El sistema nervioso autónomo.

Especialmente el sistema simpático, juega un papel importante en el control circulatorio por mecanismo reflejo actuando sobre el tono vascular. El descenso de TA estimula los barorreceptores arteriales (aórticos y carotídeos) y cardiopulmonares con la liberación de noradrenalina (NA) en las terminaciones nerviosas produciendo VC y aumento de la FC (Figura 41).

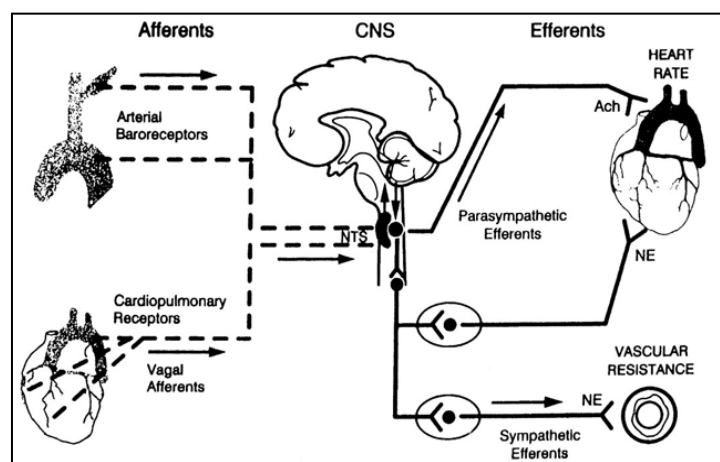


Figura 41. Los reflejos más importantes en la regulación de la tensión arterial. Ach, acetilcolina; CNS, sistema nervioso central; NE, norepinefrina; NTS, núcleo del tracto solitario (Tomado de Rea 1993).

2. El Riñón.

El riñón desempeña un papel importante en la regulación de la tensión arterial y se considera que la disfunción renal es esencial para el desarrollo y el mantenimiento tanto de la HTA esencial como de la secundaria. El riñón influencia tanto a la resistencia periférica como a la homeostasis del sodio. El sistema Renina-Angiotensina parece ser el responsable. La renina, secretada por las células del aparato yuxtaglomerulares (JGA) del riñón en respuesta a la disminución de flujo de la arteria aferente glomerular renal, la disminución de Na^+ plasmático o estímulos simpáticos cataliza la producción de angiotensina I a partir de su precursor inactivo, el angiotensinógeno hepático. La angiotensina I es convertida entonces en el endotelio (principalmente pulmonar) por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) en el octapéptido activo, la Angiotensina II. Existen otras vías alternativas (aunque menos importantes y poco estudiadas) de transformación de la Ang I en Ang II que no requieren la presencia de la ECA a través de enzimas tales como la quimasa, la catepsina G y la CAGE (Chymostatin-sensitive Ang II Generating Enzyme).

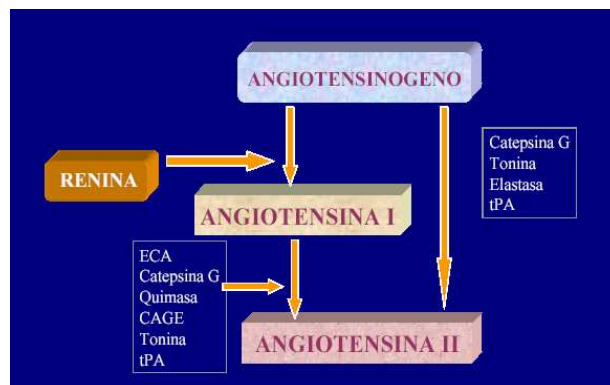


Figura 42. Sistema Renina-Angiotensina.

La Angiotensina II tiene principalmente tres acciones (Figura 43). :

- Reabsorción de sodio y líquidos mediada por la aldosterona.
- Aumenta las resistencias periféricas mediante acción directa sobre las células musculares lisas de la media vascular y la estimulación del Sistema nervioso simpático.
- Aumenta la contractilidad cardíaca.

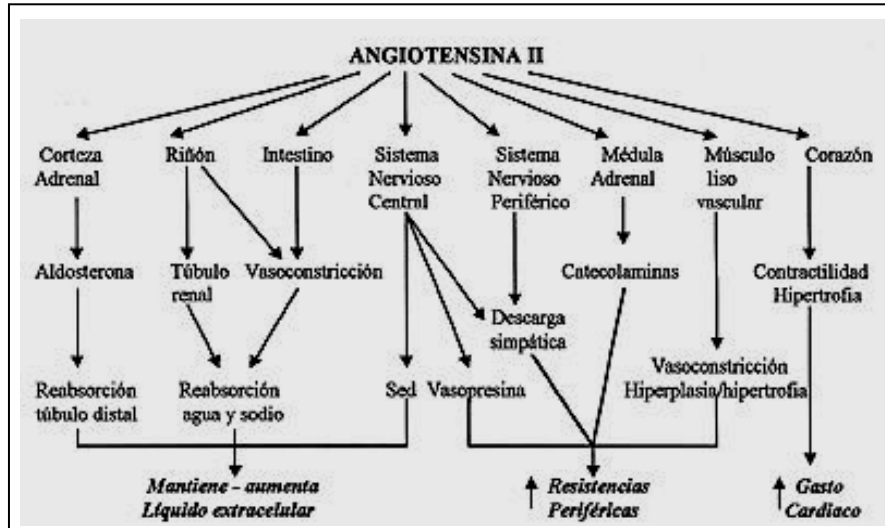


Figura 43. Acciones de la Angiotensina II (Tomado de Alcasena, Martínez y Navarro, 1998).

El riñón produce una serie de sustancias vasodepresoras o antihipertensivas que contrarrestan el efecto de las prostaglandinas. Estas incluyen prostaglandinas, el sistema caliceína-quinina, el factor activador plaquetario y el óxido nítrico. Los factores natriuréticos, incluidos el factor atrial natriurético, un péptido secretado por la auricular cardíaca en respuesta a la expansión de volumen, inhiben la reabsorción de sodio en los túmulos distales y causan vasodilatación.

III. Etiopatogenia de la Hipertensión.

La Hipertensión Arterial acontece cuando ocurren cambios que alteran la relación entre el volumen sanguíneo y la resistencia periférica total que están modulados por mecanismos combinados (Figura 44).

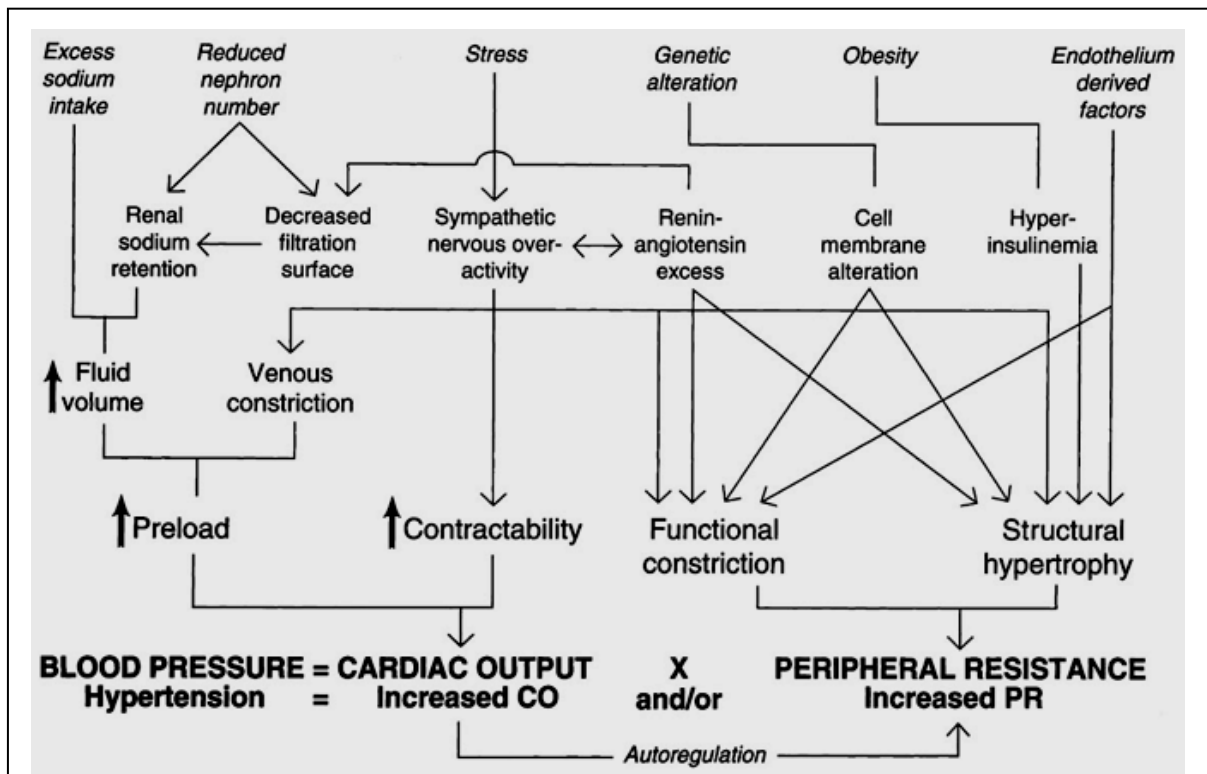


Figura 44. Mecanismos implicados en la HTA (Tomado de Anonymous 1977).

Para varias formas de hipertensión secundaria los mecanismos son bien entendidos como es el caso de la hipertensión renovascular. En ella, la estenosis de la arteria renal causa un descenso del flujo glomerular y la presión en la arteriola aferente del glomérulo. Esto induce la secreción de renina con lo que se desencadena el sistema renina-angiotensina-aldosterona y sus efectos. De forma similar, en el feocromocitoma, un tumor de la médula adrenal las catecolaminas segregadas masivamente por las células tumorales causan vasoconstricción episódica e inducción de la hipertensión.

1. Factores Genéticos.

Los factores genéticos que intervienen en la HTA no siguen en general los patrones clásicos de herencia mendeliana, sino que siguen el que se ha llamado patrón de herencia de rasgos complejos (Schorck 1997).

Herencia de rasgos complejos	Herencia mendeliana (<1%)
Se hereda predisposición	Se hereda la causa
Gran influencia ambiental	Escaso impacto ambiental
Son polimorfismos de genes comunes	Son mutaciones de genes específicos
Están implicados varios genes	Se implica un solo gen

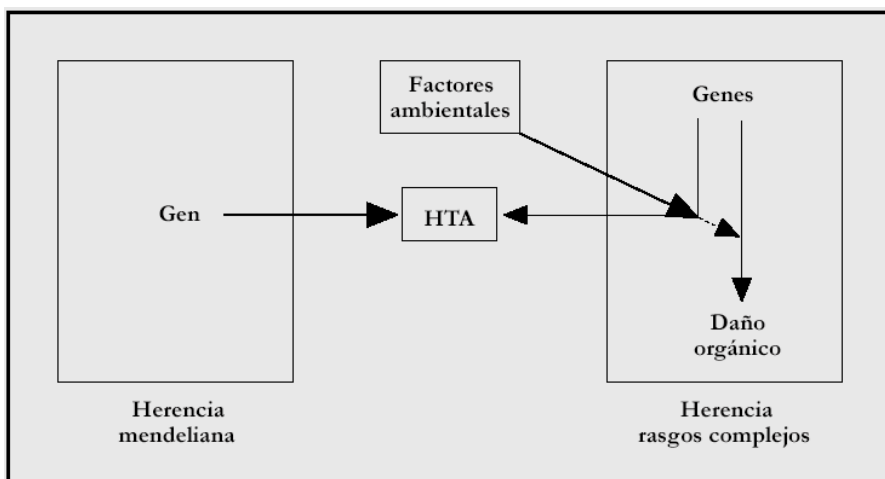


Figura 45. Características de la herencia en la HTA (Tomado de Redón Más y Giner Galván 2002).

En esta herencia de rasgos complejos frecuentemente existe la interacción de más de un gen entre sí con los factores ambientales (Figura 46).

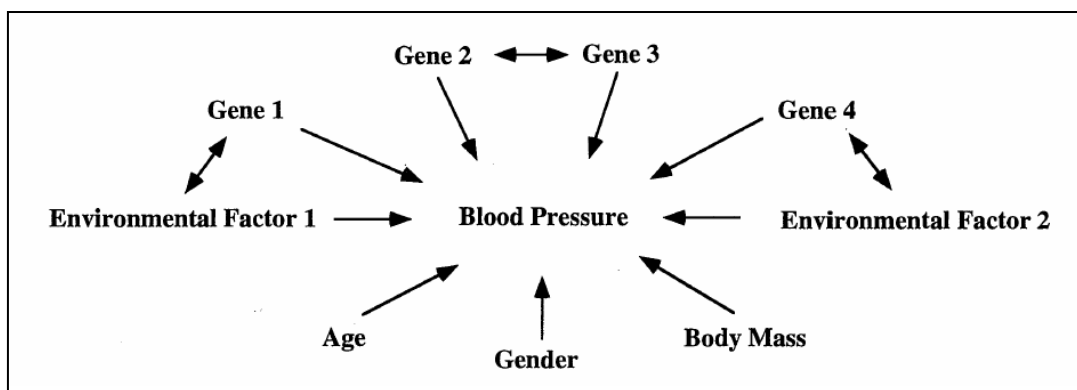


Figura 46. Modelo multifactorial etiológico de la HTA (Tomado de Lifton 1995)

La HTA esencial es un rasgo complejo con factores genéticos y ambientales estimándose que la herencia es responsable entre un 30% y un 50% (Lalouel y Rohrwasser 2001).

Tan sólo en un escaso porcentaje de pacientes con HTA (<1%) se ha podido establecer la asociación familiar de herencia mendeliana, en la que la mutación de un

gen lleva al aumento de la PA en una elevada proporción de los miembros de la familia (Lifton 1995).

2. Factores Medioambientales.

Se piensa que los factores ambientales contribuyen a la expresión de determinados factores genéticos que aumentan la presión. El papel del ambiente se demuestra por ejemplo por la baja incidencia de HTA en los chinos que viven en China en comparación con descendientes de chinos que viven en Estados Unidos. Varios factores aumentan la presión arterial incluidos la obesidad, la resistencia insulínica, el consumo elevado de alcohol, el consumo elevado de sal (en individuos sensibles a la sal), la edad y quizás la vida sedentaria, el estrés y el bajo consumo de potasio y calcio (Carretero y Oparil 2000). Además muchos de estos factores son aditivos como la obesidad y la ingesta de alcohol (Figura 47).

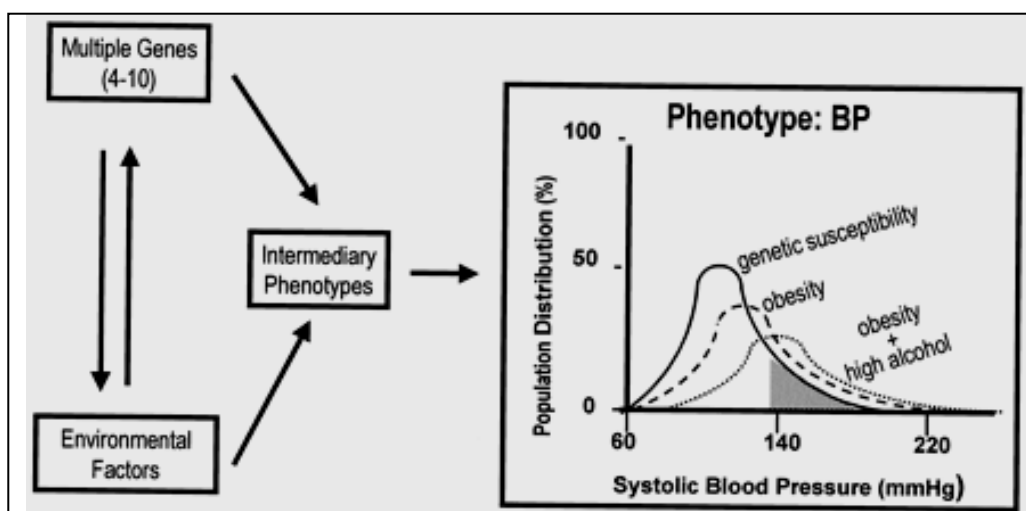


Figura 47. Interacción entre factores genéticos y medioambientales el desarrollo de la hipertensión.

En la figura de la izquierda se muestra como interaccionan los factores medioambientales y genéticos y determinan fenotipos intermediarios. El resultado de estos es una TA con una distribución normal desviada a la derecha. Las líneas continuas indican la TA teórica de la población si no estuviese afectada por factores hipertensiogénicos. El área sombreada indica las TA sistólicas en el rango hipertensivo. Las líneas discontinuas y punteadas indican poblaciones con uno (obesidad) o dos (obesidad + consumo alto de alcohol) factores hipertensiogénicos añadidos.

(Tomado de Carretero y Oparil 2000).

3. Mecanismos Fisiopatogénicos.

3.1. Hiperactividad del Sistema Nervioso Simpático y del Sistema Renina-Angiotensina II.

Estudios experimentales y clínicos han mostrado consistentemente un aumento de la actividad simpática en pacientes con hipertensión esencial. Los diferentes mecanismos etiológicos de este fenómeno y sus interacciones no son aún completamente conocidos. Se han propuesto como tales la alteración del barorreflejo, el aumento de la actividad simpática central y la alteración en la regulación de la noradrenalina (Biaggioni 2003). Existen diversas evidencias en humanos de una elevada actividad del sistema nervioso simpático (SNS) en las fases iniciales de la HTA, así como en las fases de HTA evolucionada y casos de HTA secundaria con un cierto acuerdo actual de la participación del riñón y SNS en el origen de la HTA (Rahn, Barenbrock y Hausberg 1999).

La HTA parece comenzar como un síndrome con gasto cardíaco elevado debido a dicha hiperactividad de las terminaciones simpáticas. La activación de receptores adrenérgicos modifica el gasto cardíaco y las resistencias vasculares sistémicas (RVS), favorece la expansión volumétrica al provocar vasoconstricción renal y reabsorción tubular de sodio (DiBona 2002). Además, la activación adrenérgica estimula la liberación de renina y la consiguiente activación de angiotensina y liberación de Aldosterona. Por otro lado, la génesis de angiotensina II estimula, a nivel central y periférico, la activación del SNS y liberación catecolamínica.

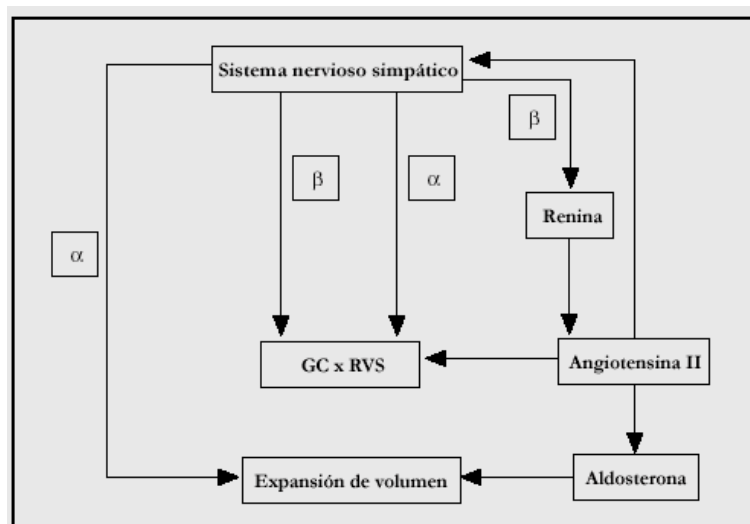


Figura 48. Relaciones del sistema adrenérgico y Sistema Renina-Angiotensina en la HTA inicial. GC: gasto cardíaco; RVS: resistencias vasculares sistémicas; receptores α y β (Tomado de González-Juanatey y González Cid, 2002).

Esta fase hiperdinámica parece condicionar el desarrollo de los cambios vasculares (vasoconstricción, reducción de la luz arteriolar e incremento de su espesor parietal) que determinan un aumento de las resistencias vasculares, elemento característico de la HTA establecida. Debido al aumento del gasto cardíaco el flujo tisular se hace mayor del requerido. Este aumento de flujo aporta nutrientes extra o elimina productos del metabolismo tisular. Como consecuencia los vasos se contraen, disminuyendo el flujo sanguíneo y volviendo a un balance metabólico entre aporte y necesidades. Entonces las resistencias periféricas aumentan al principio funcionalmente por simple contracción. A este fenómeno se le conoce como autorregulación del flujo. Después el aumento se perpetúa morfológicamente por la inducción de una remodelación de los vasos de resistencia.

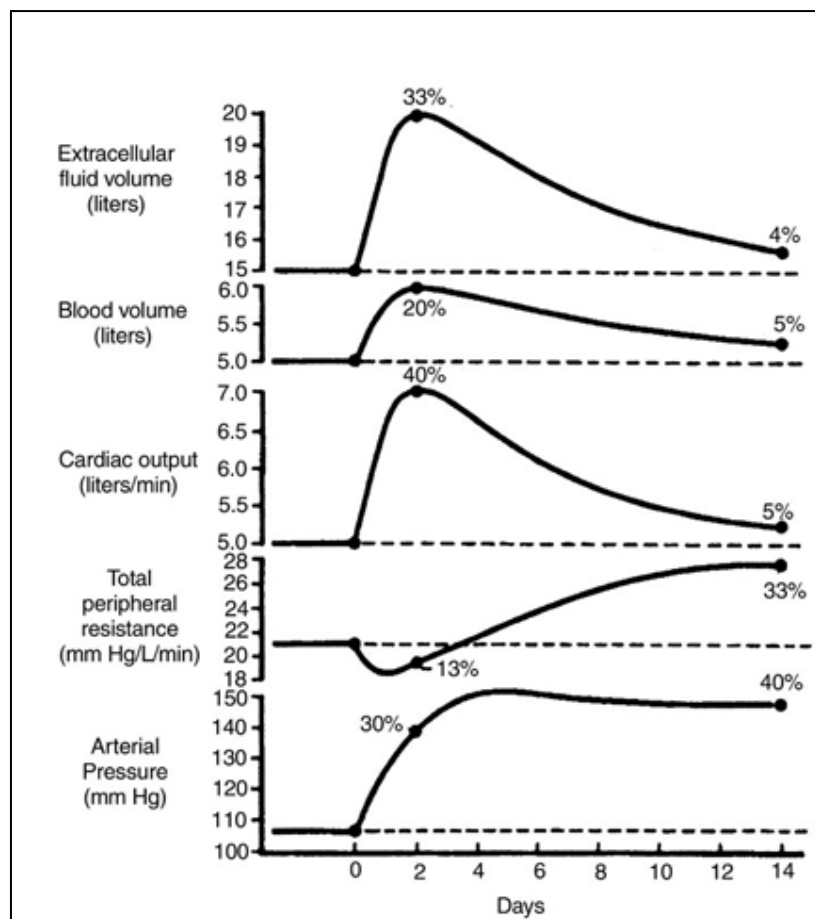


Figura 49. Cambios progresivos en el sistema circulatorio durante las primeras semanas de hipertensión por sobrecarga de volumen. El aumento inicial del gasto cardíaco es la causa básica de la hipertensión. Posteriormente el mecanismo de autorregulación disminuye el gasto cardíaco hasta casi la normalidad y al mismo tiempo causa un incremento secundario de la resistencia periférica total (Tomado de Guyton 1992)

Después la vasoconstricción activa se transforma en una remodelación pasiva de la como se ha demostrado in Vitro (Bakker et al., 2001) con lo que el aumento de resistencias periféricas se perpetúa.

3.2 La Microcirculación en la HTA.

En la hipertensión el incremento de las resistencias periféricas radica principalmente en los vasos de la microcirculación (arteriolas precapilares) (Pries 1995). La estructura y la función de la microcirculación en la hipertensión están alterados de tres formas (Levy et al. 2001):

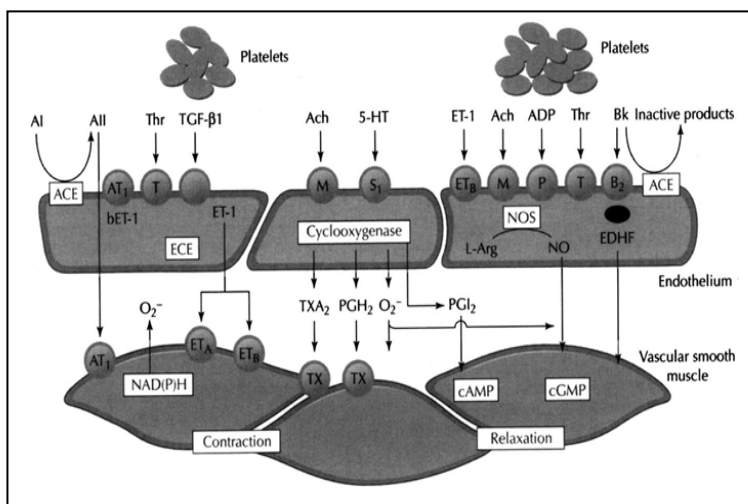
- La disfunción endotelial provocada por la hipertensión produce una alteración del tono vascular predominando la vasoconstricción.
- Existen alteraciones anatómicas de la estructura de los vasos precapilares (remodelación vascular).
- Aparecen cambios a nivel del lecho microvascular en forma de reducción de la densidad de las arteriolas y los capilares lo que se conoce como rarefacción.

3.2.1. Disfunción endotelial y alteración del tono vascular.

El endotelio vascular tiene la capacidad de modular:

- el componente interior de la luz vascular (antiagregante, inhibe activación, adhesión y agregación plaquetaria así como la adhesión leucocitaria).
- la proliferación y la función del músculo liso de la media por tanto el tono vascular.

Esto último lo lleva a cabo mediante la secreción de sustancias vasoactivas de las que destacan como vasodilatadoras el NO y como vasoconstrictoras la endotelina-1 (Figura 50). Por otro lado el endotelio en condiciones fisiológicas impide la proliferación de las células del músculo liso.



50. Sustancias vasoactivas derivadas del endotelio: varias sustancias circulantes o derivadas de plaquetas pueden activar receptores específicos (círculos) en la membrana endotelial. Liberan factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) la prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante (EDHF).

(Tomado de Cosentino y Lüscher 2001).

Los factores vasoconstrictores derivados del endotelio son también producidos por este, como la endotelina-1 (ET-1), angiotensina II (AII), tromboxano A₂ (TXA₂), prostaglandina H₂ (PGH₂). AI, angiotensina I; ACE, enzima convertidora de la angiotensina; Ach, acetilcolina; ADP, adenosina fosfato; Bk, bradikina; cAMP, AMP; cGMP; ECE, enzima convertidora de la endotelina; 5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); NOS, óxido nítrico sintetasa; O₂⁻, anión superóxido; TGF-β1, transforming growth factor-β1; Thr, trombina.

Por todo ello la disfunción del endotelio se considera un mecanismo clave en la patogenia de la HTA.

3.2.2 Remodelación vascular.

Varios estudios han demostrado que la hipertensión esencial se asocia con una reducción de la luz vascular y un incremento de la relación media/luz vascular. En autopsias de pacientes hipertensos se ha visto que no aumenta el área de sección de la media. Se produce una remodelación eutrófica, más que hipertrófica, por un reordenamiento de células normales musculares alrededor de un diámetro de sección menor (inward eutrophic remodeling) (Heagerty et al. 1993).

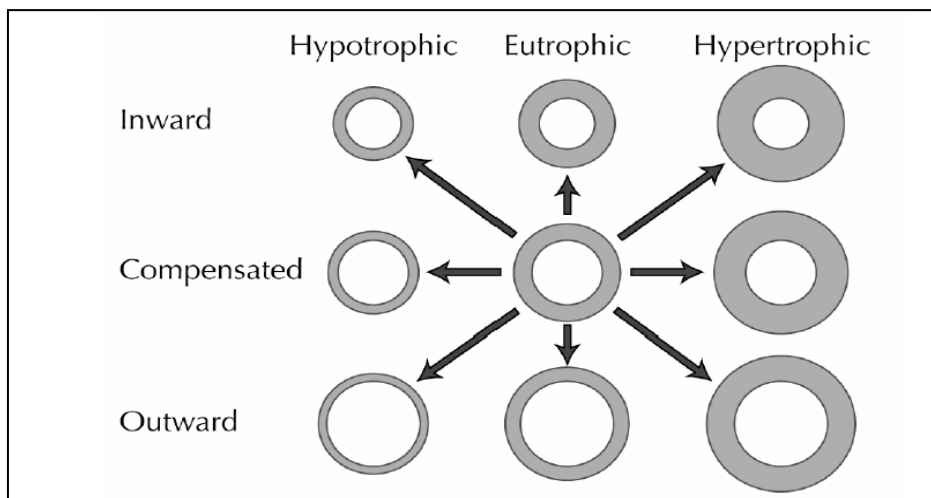


Figura 51. Modelos de remodelación vascular en secciones. La hipertensión arterial tiene una remodelación eutrófica y con reducción de diámetro (Eutrophic inward remodeling).
(Tomado de Mulvany 1996).

El mecanismo es el siguiente: la vasoconstricción activa por estímulos neurohormonales se transforma en una remodelación pasiva como se ha demostrado in vitro (Bakker et al. 2001) con lo que el aumento de resistencias periféricas se mantiene.

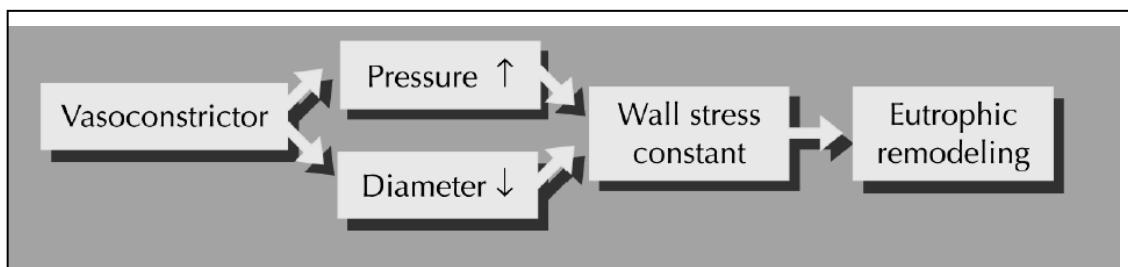


Figura 52 . Mecanismo de la remodelación de las pequeñas arterias en HTA
(Tomado de Mulvany 2002).

3.2.3. Rarefacción.

La rarefacción o reducción de la densidad de arteriolas, capilares y vénulas se ha descrito en la mayoría de las formas de hipertensión clínica o experimental. Este fenómeno reduce la superficie vascular disponible para la cesión de oxígeno a tejidos y aumenta la distancia de difusión entre los vasos y las células diana, dando lugar a la isquemia (Levy et al. 2001). Un estudio ha demostrado una disminución del número de arteriolas y vénulas perifoveales en la pacientes hipertensos (Ibrahim et al. 1998).

4. Estrés oxidativo e hipertensión.

Los cambios vasculares en la hipertensión están modulados por diversos factores:

- vasoconstrictores y vasodilatadores como ya hemos visto.
- Factores de crecimiento y citoquinas (Touz 2000).
- Factores mecánicos (Koller 2002).

Además de estos existe una evidencia cada vez mayor de que las EROX actúan intra e intercelularmente regulando el tono y la estructura vascular. Se ha demostrado experimentalmente que en la hipertensión tanto las células del endotelio (Kerr 1999) como las células musculares lisas vasculares (Miller 1998) como los fibroblastos de la adventicia (Wang 1999) producen radicales superóxido.

4.1. Fisiopatología del estrés oxidativo en la hipertensión.

La sustancia más importante en el mantenimiento de la vasodilatación es el óxido nítrico (NO) y su principal fuente de producción la Oxido Nítrico Sintetasa endotelial (ONSe). Esta convierte la L-arginina en citrulina con liberación de óxido nítrico (NO). El NO difunde libremente hacia la media donde produce relajación muscular por vía de la guanilato ciclasa. Existen varias fuentes de superóxido intracelulares como: la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la Oxido Nítrico sintetasa (paradójicamente) y la respiración mitocondrial. La SOD en sus isoformas mitocondrial (MnSOD), extracelular (SODec) e intracelular dependiente de cobre-zinc (CuZnSOD) cataliza la reducción del superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno puede difundir también libremente produciendo contracción e hipertrofia de las células musculares vasculares y es reducido por la catalasa hasta agua.

En la hipertensión el exceso de superóxido se combina con el NO (disminuyendo los niveles de este) y forman peroxinitrito (ONOO^-) un oxidante altamente reactivo que tiene diversos efectos deletéreos como el inicio de la

lipoperoxidación y la inactivación funcional de diversas proteínas como la SOD mitocondrial

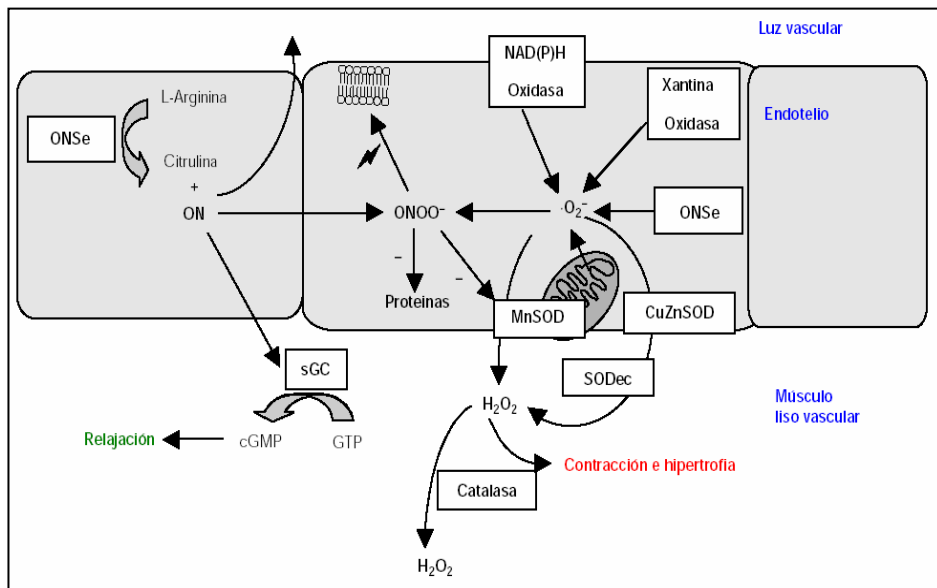


Figura 53. ROS en la Hipertensión arterial (Tomado de Berry et al, 2001).

La principal fuente de EROX es debida a la estimulación de la NADPH oxidasa por diversos factores vasoactivos como la Angiotensina II (Seshiah et al. 2002), de crecimiento y mecánicos. Mediante complejas mecanismos de transducción intracelular las EROX producen sus efectos.

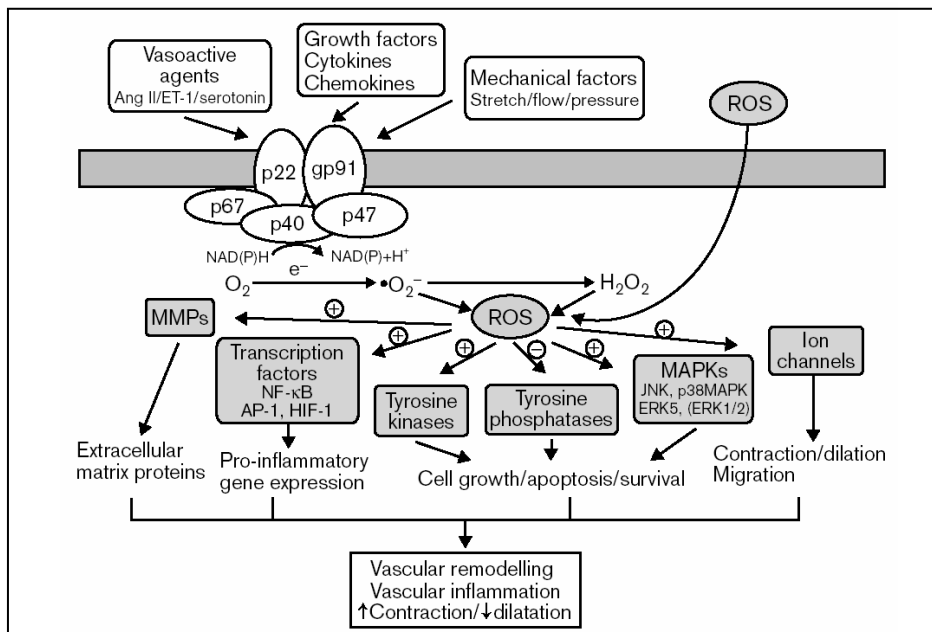


Figura 54. Activación de NADPH oxidasa representada en sus subunidades, producción de EROX, transducción intracelular y efectos (Tomado y de Touyz 2003).

Las EROX además de estimular el crecimiento celular y la inflamación aumentan la concentración intracelular de calcio a nivel las células musculares vasculares durante la hipertensión (Lounsbury, Hu y Ziegelstein 2000). Por tanto las EROX producen vasodilatación por dos vías: por reducción de NO y por un mecanismo dependiente del calcio.

4.2. Detección Estrés Oxidativo en hipertensión.

Varios estudios transversales han constatado que los sujetos hipertensos presentan , respecto a los controles sanos, niveles de MDA séricos aumentados y niveles de agentes antioxidantes disminuidos (SOD, Catalasa, Glutation peroxidasa, Vitamina A y Vitamina E) de forma significativa (Russo et al. 1998; Kumar y Das 2000; Redón et. al 2003).

4.3. Antioxidantes e hipertensión.

La evidencia de diversos estudios sugiere que los antioxidantes son en la actualidad agentes potencialmente terapéuticos en la hipertensión arterial. Parece apropiado proponer algunas recomendaciones dietéticas con un contenido alto de antioxidantes (es decir, vitaminas C ,E y flavonoides) que, aparte de sus propiedades antioxidantes no tienen efectos secundarios. Recientemente, dos estudios demostraron que una dieta rica en frutas y verduras disminuye la presión sanguínea en pacientes con hipertensión moderada.(Appel et. al 1997; John et. al 2002).

Se ha demostrado que los niveles séricos de vitamina C se relacionan inversamente con la presión diastólica y las personas con niveles bajos de vitamina C tienen niveles más altos de la presión diastólica independientemente de otros factores como la edad o el índice de masa corporal (Block 2002). La administración continuada de ácido ascórbico (Vitamina C) oral reduce la presión arterial media y sistólica en ratas y pacientes hipertensos (Duffy et al. 2001). Recientemente se ha descrito que la infusión intra-arterial de vitamina C en pacientes con hipertensión arterial aumenta significativamente el flujo sanguíneo del antebrazo en respuesta a la acetilcolina (On et al. 2002).

El mecanismo por el que dosis farmacológicas de ácido ascórbico mejoran la vasodilación deficiente dependiente del endotelio es desconocido aunque se ha atribuido a una acción antioxidante que previene la disminución de los niveles de NO.

Por otro lado, la ingestión crónica de dosis farmacológicas de vitamina E inhibe la elevación de la presión sanguínea y el estrés oxidante en ratas hipertensas (Noguchi et

al. 2001). En otro estudio la atenuación del estrés oxidativo inducida por las vitaminas C y E en ratas hipertensas mejora la función y la estructura vascular y previene la progresión de la hipertensión (Chen et al. 2001). Otro trabajo muestra que la administración de vitamina E durante 3 semanas baja la presión sanguínea en ratas hipertensas (Pezeshk y Derick Dalhouse 2000)

En discordancia con estos resultados los datos de un ensayo controlado aleatorizado de suplementación de vitamina E a pacientes hipertensos (300 mg/día) no ofrecen efectos clínicamente relevantes en la presión sanguínea. (Palumbo et al. 2000). A pesar del hecho de que esta dosis es más alta que los requerimientos dietéticos, es más baja que otras dosis farmacológicas que previenen con éxito el deterioro de la función endotelial de los vasos de resistencia en pacientes sanos (Raghuveer et. al 2001)

Recientemente, un estudio mostró que la incubación de aortas de ratas hipertensas en presencia de vitamina C y E mejora la función endotelial, reduce la producción de radical superóxido y la actividad de la NADPH oxidasa e incrementa la actividad de la NO sintetasa y la producción de NO (Ulker, McKeown y Bayraktutan 2003).

Por tanto la suplementación de antioxidantes, ya sea en dietas ricas en vitaminas o en dosis farmacológicas, podría reforzar otras terapias antihipertensivas o incluso podría prevenir la evolución de la hipertensión esencial.

IV. La retina en la hipertensión.

1. Fisiopatología.

Las alteraciones microvasculares retinianas pueden consistir en:

- Cambios arteriolares retinianos que afectan sólo a arteriolas como el estrechamiento generalizado o focal arteriolar o alteraciones de los cruces arteriovenosos.
- Retinopatía si además se afecta el parénquima retiniano como en hemorragias, exudados duros, manchas algodinosas, edema macular o de papila.
- Arteriosclerosis para definir los cambios de engrosamiento y endurecimiento de las paredes vasculares.

Los cambios microvasculares forman parte de un conjunto de procesos patológicos que incluyen alteraciones de la circulación de la coroides y el nervio óptico.

Tales cambios se asocian tanto a la edad (aterosclerosis) como a la presión sanguínea elevada (tono arteriolar incrementado, vasoespasmo, remodelación de la media y engrosamiento de la íntima).

Pueden diferenciarse varias fases en la fisiopatología de las alteraciones microvasculares (Tso 1982; Tso 1990):

1.1. Fase de vasoconstricción.

La presión sanguínea elevada causa un incremento del tono arteriolar debida a la autorregulación llevando a un estrechamiento arteriolar generalizado más evidente en individuos jóvenes sin arterioclerosis.

En pacientes con arteriosclerosis moderada o severa el estrechamiento (segmentos sin esclerosis) puede alternar con zonas dilatadas (segmentos escleróticos).

El estrechamiento suele ser más prominente en las arteriolas de segundo y tercer orden y menos común en las arteriolas cercanas a papila.

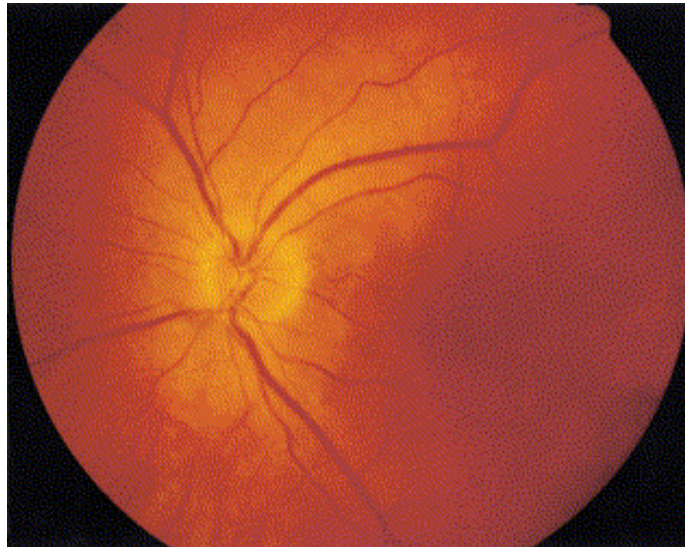


Figura 55. Estrechamiento arteriolar generalizado (Tomado de Wong et. al 2001a).

1.2. Fase de esclerosis.

La presión sanguínea elevada persistente causa una remodelación de la media y una degeneración hialina de la pared. Estos cambios añaden a los de la fase de vasoconstricción una alteración del reflejo arteriolar por la hialinización, tortuosidad arteriolar, un aumento del ángulo de ramificación. Las alteraciones de los cruces arteriovenosos también se deben a esclerosis con compresión de la arteria sobre la vena (Figura 56) en tres grados clásicos:

- Signo de Bonnet: Dilatación de la porción distal de la vena en un cruce arteriovenoso.
- Signo de Gunn: Disminución del calibre de la vena a ambos lados de un cruce arteriovenoso.
- Signo de Salus: Variaciones del trayecto venoso a nivel de los cruces arteriovenosos.



Figura 56.
Microfotografía electrónica de barrido
demostrando la
compresión de la
Arteria (A) sobre la
Vena (V) en HTA.

(Tomado de
Fryczkowski y Smith
1987).

Los cambios de la fase de esclerosis se corresponden con los grados I y II de la clasificación de Keith, Wagener y Baker.

1.3. Fase exudativa.

La hipertensión mantenida conlleva un estrés mecánico, humoral y oxidativo continuo que ocasiona la rotura de la barrera hemato-retiniana con degeneración de la del músculo vascular y la necrosis de las células endoteliales. Se produce entonces la extravasación de fluidos y sangre. Otros cambios patológicos incluyen la necrosis fibrinoide de la pared arteriolar, el estrechamiento de la luz arteriolar, la afectación de flujo sanguíneo y la isquemia.

Los cambios típicos de esta fase son los microaneurismas y las hemorragias retinianas. Otros son los exudados duros, el edema macular y las manchas algodonosas.

En este estadio puede aparecer ocasionalmente un edema papilar.

La fase exudativa se corresponde con los grados III y IV de la clasificación de Keith, Wagener y Baker.



Figura 57. Exudados y hemorragias en HTA.

1.4. Fase de complicaciones.

Estas incluyen: la trombosis central de vena central de la retina o de rama venosa, la trombosis arteriolar, los macroaneurismas; el edema macular cistoide y la vitreorretinopatía proliferativa.

2. Epidemiología.

Los datos epidemiológicos disponibles indican que las anomalías microvasculares retinianas se observan entre un 2 y un 14% de la población general no diabética y son más comunes en hipertensos. El estrechamiento arteriolar focal y el cruce arteriovenoso, y no así la retinopatía, parecen ser cambios dependientes de la edad. La variación de prevalencia según el sexo no es clara pero las diferencias

interraciales sí parecen serlo (mayor prevalencia en individuos negros que en caucásicos). (Wong et al. 2001a).

3. Importancia de la afectación de la retina en la hipertensión.

La retina con su sistema arteriolar no anastomótico constituye un lugar particularmente susceptible a los cambios de presión sanguínea. Por ser el único lugar del organismo donde los vasos pueden ser observados de forma no invasiva da información valiosa acerca de la afectación microvascular general por la HTA.

3.1. La hipertensión como factor de riesgo de patología ocular.

Esto se demuestra por la alta prevalencia que la HTA presenta en paciente con ciertos trastornos oculares como obstrucciones vasculares y neuropatía óptica isquémica no arterítica (Figura 58).

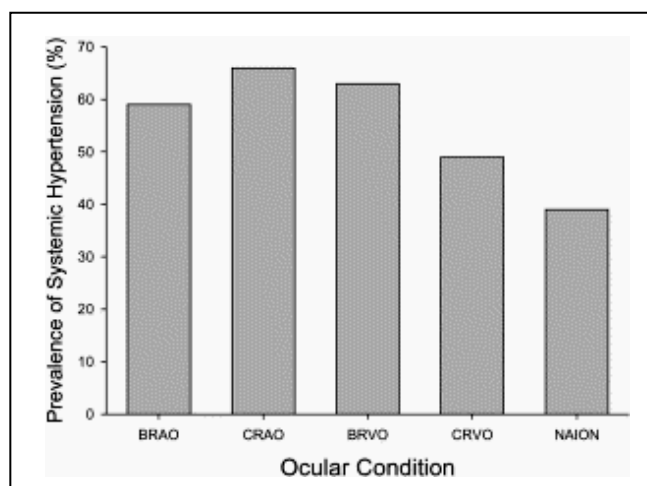


Figura 58. Prevalencia de HTA en pacientes con enfermedades retinovasculares. BRAO=Oclusión de Rama Arterial Retiniana 59%; CRAO=Oclusión de la Arteria central de la Retina 66%; BRVO=Oclusión de Rama Venosa Retiniana 63%; CRVO=Oclusión de la Vena Central de la Retina 49%; NAION=Neuropatía Óptica Anterior Isquémica No-Arterítica 39%.
(Tomado de Dodson y Kritzinger 1997)

Asimismo las hipotensiones iatrogénicas o nocturnas en la HTA dan lugar a lugar al daño de la cabeza del nervio óptico y pérdidas del campo visual por isquemia (Hayreh 1999).

3.2. Las alteraciones retinianas en HTA como factor predictivo de patología sistémica.

Los estudios epidemiológicos indican una fuerte asociación entre la presencia y severidad de anomalías microvasculares retinianas y la hipertensión (Klein et al. 1994; Yu et al. 1998). El estrechamiento arteriolar retiniano generalizado y las alteraciones de los cruces arteriovenosos (no así el estrechamiento focal y la retinopatía) se han

relacionado con los niveles de presión arterial medidos 3 y 6 años antes de la fundoscopia en el estudio ARIC (Sharrett et al. 1999). Por tanto podrían considerarse como marcadores microvasculares del daño acumulativo de la HTA. También se ha demostrado una buena correlación predictiva entre anomalías retinianas e incidencia de ictus. En un seguimiento a tres años los riesgos relativos de ictus según la lesión retiniana oscilaban entre 3.1 para microaneurismas y 1.6 para alteraciones de cruce (odds ratio general de 2.58) (Wong et al. 2001b). Esto sugiere que en el ictus podrían tener importancia los procesos microvasculares.

Sin embargo el riesgo relativo de cardiopatía isquémica, aunque presente, es menor (Wong et al. 2002; Duncan et al. 2002).

La evidencia de la asociación entre el grado de afectación retiniana en HTA y la mortalidad fue demostrada por primera vez hace más de 50 años (Keith, Wagener y Baker 1939) (Tabla 14). Estudios más recientes lo han confirmado (Svardsudd et al. 1978; Schouten 1986).

Clasificación de Keith, Wagener y Barker				
Grado I	Hipertensión benigna. Estenosis o esclerosis moderada de las arteriolas retinianas. No síntomas. Buen estado de salud.			
Grado II	Retinopatía hipertensiva más marcada. Esclerosis moderada o marcada de las arteriolas retinianas. Reflejo luminoso arterial exagerado. Compresión venosa en los cruces arteriovenosos. Tensión arterial mayor y más mantenida que en el grupo I. Asintomáticos. Buen estado de salud.			
Grado III	Retinopatía angiospástica moderada. Edema retiniano. Manchas algodinosas y hemorragias. Esclerosis y lesiones espásticas de las arteriolas retinales. Tensión arterial generalmente alta y mantenida (síntomática).			
Grado IV	Hipertensión maligna. Todo lo anterior y edema del disco óptico. Las funciones renal y cardiaca pueden estar afectadas. Supervivencia reducida.			

Años de seguimiento	Supervivencia de los pacientes (%)			
	Grado I	Grado II	Grado III	Grado IV
1	90	88	65	21
3	70	62	22	6
5	70	54	20	1

Tabla 14. Clasificación de Keith, Wagener y Baker. Supervivencia.

**JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS
Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.**

I. Antecedentes y estado actual del tema.

A pesar de que las enfermedades cardiovasculares son el primer problema de salud en los países occidentales, y que las manifestaciones de la arteriosclerosis constituyen una importante sobrecarga para el sistema sanitario, es evidente la coexistencia de factores de riesgo conocidos como la DM (Gaede et al. 2003), hipertensión arterial (HTA) (Flack et al. 2003) en la población general, ya que la incidencia de estos es paralela al incremento de las complicaciones derivadas en órganos diana como el riñón, el cerebro y los ojos (Van Leiden et al. 2002).

Los mecanismos patogénicos que pueden explicar la aparición de complicaciones oculares en el curso de la DM y de la HTA son múltiples y en parte desconocidos.

La retinopatía diabética (RD) lleva intrínseca una elevada morbilidad (Van Leiden et al. 2003) que puede inducir pérdidas importantes de visión y la ceguera irreversible, en ausencia y/o a pesar de un tratamiento médico-quirúrgico adecuado y fotocoagulación láser retino-coroidea precoz.

El número de diabéticos se duplica cada 15 años, siendo la prevalencia de las complicaciones vítreo-retinianas del 17% cuando la metabolopatía tiene menos de 5 años de evolución, aunque esta cifra aumenta espectacularmente con el tiempo, ya que cuando la enfermedad dura más de 15 años la RD se presenta en el 90% de los casos. Hay datos que demuestran que en la Comunidad Valenciana (datos del G.A.T., Valencia) un 6% de la población padece la DM y otro 6% presenta una DM latente. Si comparamos estas cifras a nivel nacional, la prevalencia de ceguera por RD en España es del 7% oscilando entre el 4% y el 9% (datos del I.N.E., Madrid), representando el 20-30% de todos los casos de ceguera en nuestro país. Datos propios reflejan que el 20% de los pacientes visitados diariamente en las consultas de oftalmología del Centro de Especialidades Monteolivete de la ciudad de Valencia (aproximadamente 300/día) padecen DM y un 7-9% de estas visitas diarias corresponden a pacientes que presentan una RD moderada-severa. Las variaciones existentes entre los diversos estudios epidemiológicos acerca de la incidencia de la DM y la RD, dependen principalmente de la procedencia de los sujetos y la duración del proceso nosológico. Todos estos

pacientes requieren un control de su estado general, del proceso metabólico y la vigilancia de las complicaciones. Ha sido demostrado que cualquier actuación que indujera la sensibilización de la población, junto a la puesta en marcha de los programas médicos de despistaje de la RD resultaría rotundamente efectivo, evitando hasta un 40-50% de los casos de ceguera legal en diabéticos. Es muy probable que en nuestro propio sistema sanitario no se le otorgue a la atención primaria la importancia y el protagonismo que debería, ya que este nivel de asistencia es básico y al contar con recursos muy limitados es en gran parte el generador voluntario e involuntario de las consultas de especialidad y de los servicios de urgencia, lo que repercute en una disminución de su efectividad.

Por otra parte, la hipertensión arterial constituye una de las patologías con una mayor morbimortalidad, “per sé” y por las complicaciones subsecuentes. Afecta a un 31% de la población general. Un 90% de los hipertensos corresponden a la forma clínica denominada "HTA esencial o primaria", cuyo origen plurifactorial explica lo impreciso de su etiopatogenia y de aquí se puede deducir que el 10% de los hipertensos padecen la " HTA secundaria" de etiología concreta (estenosis de la arteria renal, nefropatías parenquimatosas, coartación aórtica, feocromocitoma, hiperaldosteronismo, etc).

La repercusión de la HTA sobre el árbol vascular es la responsable de la afectación de tejidos y órganos, siendo particularmente susceptibles el tejido nervioso (cerebro, retina y nervio óptico) y el riñón. Se ha descrito que cualquier hipertenso tiene entre 3 y 4 veces más riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares que los individuos controles sanos de la misma edad y características personales (Ball 2002; Uemura y Pisa 1998; Lombera et al. 2000). Datos recientes indican que del total de hipertensos de Europa, el 40% nunca se ha sometido a una exploración de fondo de ojo en relación con su proceso (Carmena et al. 1989; The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group 1976; Guidelines Subcommittee WHO. 1999). Si a este colectivo unimos los sujetos que aún no han sido diagnosticados las cifras se elevan de forma alarmante, lo que nos indica por una parte que el verdadero valor diagnóstico del examen fundoscópico llevado a cabo por especialistas en oftalmología está subestimado para estos procesos, y por otra parte que el riesgo de desarrollar complicaciones oftalmológicas que no puedan ser paliadas en una fase aún viable para los hipertensos, dada la elevada incidencia de la HTA en la población española como

indican las guías de la Sociedad Española de Cardiología para la práctica clínica de la hipertensión arterial en España (Lombera et al. 2000), es mucho mayor que en los pacientes que puedan acceder a controles oftalmológicos periódicos.

Sería interesante poder contar de forma sistematizada con la exploración especializada del fondo ocular y si a esto le añadimos un protocolo patrón para poder identificar factores de riesgo y un marcador bioquímico o un grupo de parámetros analíticos que nos informase acerca de la posibilidad de desarrollar complicaciones oftalmológicas, este conjunto sin duda favorecería la identificación de pacientes con mayor riesgo. Sin embargo aún no han sido identificados todos los factores que pueden contribuir a la presentación de complicaciones oftalmológicas como reflejo del proceso macro y microvascular generalizado.

II. Justificación del Estudio.

Según el criterio de los estudios epidemiológicos y experimentales y nuestros trabajos preliminares en esta línea de investigación, existe evidencia de que el análisis pormenorizado de los factores de riesgo clásicos y emergentes es esencial para realizar una intervención efectiva precoz en los pacientes con mayor riesgo de padecer las complicaciones oftalmológicas de la enfermedad subyacente (Pinazo-Durán et al. 2001; Pinazo-Durán et al. 2003). En este sentido, la hiperglucemia y la hipertensión son las bases que condicionan el desarrollo de las complicaciones oftalmológicas.

Publicaciones más recientes de otros autores y trabajos de nuestro grupo investigador sugieren que la progresión de la retinopatía depende de variaciones homeostáticas locales y factores endógenos en gran parte desconocidos (Van Leiden et al. 2003; Pinazo-Durán et al. 2001; Pinazo-Durán et al. 2003; Klein et al. 2002), entre los que puede considerarse los desequilibrios electrolíticos, dislipemias, alteración de los polioles y la presencia de ciertas citoquinas, chemoquinas, péptidos y otras señales intercelulares que favorecerían la creación de un ambiente idóneo para el desarrollo del proceso patológico retiniano. Por lo tanto, si deseamos investigar los factores de riesgo emergentes debemos tener en cuenta que se ha propuesto como causa del daño vascular el estrés oxidativo, es decir aquellas situaciones patológicas que se presentan cuando los

pro-oxidantes sobrepasan la actividad de las defensas antioxidantes y ejercen sus efectos nocivos sobre células, tejidos y órganos.

Como hemos indicado, la formación de especies reactivas del oxígeno (EROX), tanto los radicales libres como el anión superóxido y el radical hidroxilo, y especies no radicales como el peróxido de hidrógeno, junto al estado de las defensas antioxidantes (AOXT) han sido involucradas en la patogenia de diversas enfermedades (Demopoulos et al. 1980; Halliwell y Gutteridge 1984; Bielski et al. 1985; Watson et al. 1993).

Habiéndose descrito ampliamente la especial vulnerabilidad de la retina al ataque oxidativo por la vía de la peroxidación lipídica (PL), lo que ha llevado a relacionar la formación de EROX en oftalmología, entre otros, con la retinopatía del prematuro, la DMAE, las cataratas y más recientemente con las vítreorretinopatías proliferativas (Verdejo et al. 1997; Verdejo et al. 1998; Verdejo et al. 1999), intuimos una fuerte relación de los procesos de peroxidación lipídica y las retinopatías, por lo que pretendemos relacionarlas con la presentación y la evolución de la retinopatía diabética y retinopatía hipertensiva. En este sentido, nuestros últimos estudios demuestran que los vítreos procedentes de pacientes que habían sido operados por padecer una vítreo-retinopatía diabética proliferativa avanzada presentaban niveles de aldehídos peroxídicos significativamente superiores a los vítreos procedentes de pacientes no diabéticos (Verdejo et al. 1997; Verdejo et al. 1998; Verdejo et al. 1999) en relación a los procesos subyacentes de hipoxia-reperfusión. Además hemos descrito la disminución de actividad de los enzimas antioxidantes en vítreos de pacientes diabéticos que habían tenido que someterse a cirugía mediante vitrectomía por empeoramiento de su proceso ocular (*Tesis Doctoral "Mecanismos de daño celular por radicales libres en las vítreo-retinopatías", C Verdejo, Valencia 2002*). Por otra parte, en otros estudios hemos demostrado la presencia en la retina y coroides de la rata de los enzimas del sistema aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Pinazo-Durán et al. 2000) y hemos propuesto un nuevo concepto para comprender las bases bioquímicas y celulares de la RD, ya que en el caso de que aquellos pacientes con la tasa más elevada de aldehídos peroxídicos sufrieran una alteración en la disponibilidad o en la actividad de los enzimas encargados de metabolizarlos (ALDH), el acúmulo de dichos aldehídos y el fallo de los mecanismos reparadores resultaría en la reactivación del proceso tisular mediante un mecanismo mixto de tipo citotóxico y/o mutagénico.

También han aparecido en los últimos años estudios epidemiológicos y experimentales que demuestran que muchas enfermedades oftalmológicas tienen una base nutricional importante (AREDS, WISCONSIN, LATS, etc). En este sentido se ha considerado a la degeneración macular y las cataratas entre los principales procesos que están hoy en día el ángulo de mira de la administración preventiva de los suplementos nutricionales con vitaminas y minerales, entre otras moléculas de micronutrientes.

III. Hipótesis.

Considerando lo anteriormente expuesto, es muy posible que el estrés oxidativo desempeñe una función importante tanto en el desarrollo de enfermedades como la diabetes y la hipertensión como de sus complicaciones vasculares consideradas (retinopatía), ya que ambas conllevan procesos de isquemia-reperfusión e inflamación que son fuente de especies reactivas del oxígeno (radicales y no radicales).

Hay que tener en cuenta, que en todo proceso de peroxidación lipídica se generan aldehídos que pueden ser determinados en los fluidos corporales, y cuyo aumento en ellos viene determinado por la actividad pro-oxidante de las células y tejidos implicados. Si el estrés oxidativo es el desequilibrio entre las fuerzas oxidantes y las defensas antioxidantes, es probable que la determinación de ambas pueda ayudarnos a valorar el índice de estrés oxidativo y su influencia sobre el proceso patológico subyacente, en nuestro caso la DM y HTA.

Además, nos planteamos la posibilidad de que el estado oxidativo/antioxidante en plasma puede estar relacionado con las complicaciones vasculares oftalmológicas, es decir con la retinopatía. Por ello sería interesante valorar el hecho de que si existieran diferencias plasmáticas en la actividad oxidativa y antioxidante de los pacientes diabéticos y los hipertensos, estas podrían medirse de forma integrada en el conjunto de análisis bioquímicos en la clínica diaria y emplearse como marcadores biológicos del curso de la enfermedad y sus complicaciones vasculares, aplicándolo a la presentación y evolución de la retinopatía. Por ello es necesario valorar estos cambios en el tiempo,

proponiendo un seguimiento de todos y cada uno de los participantes en el estudio a lo largo de un periodo de cinco años.

A su vez se ha considerado la conveniencia de intervenir en el balance oxidativo/antioxidante como mecanismo etiopatogénico de la retinopatía mediante un suplemento con micronutrientes que, teóricamente, podría ser efectivo en el proceso de estabilización o neutralización de las fuerzas pro-oxidantes, de manera que si estas intervinieran en los mecanismos patogénicos de la retinopatía, su control podría hipotéticamente evitar el avance o incluso ayudar a revertir los daños en la retinopatía. La valoración de los efectos de administración de un suplemento oral de micronutrientes con propiedades antioxidantes tendría que realizarse a lo largo de un seguimiento de cinco años a todos los participantes del estudio, comparando los resultados con los que no ingirieran la dosis prescrita del suplemento.

IV. Objetivos.

Así pues, aceptando todo lo expuesto con anterioridad, nos propusimos llevar a cabo los puntos siguientes, mediante los exámenes y pruebas necesarios y durante el tiempo previsto para alcanzar los objetivos de este estudio:

1) Identificación de factores de riesgo vascular retiniano en una población oftalmológica de pacientes diabéticos, pacientes hipertensos y sujetos sanos, mediante la realización de una anamnesis general, exploración oftalmológica y análisis bioquímicos clásicos incluyendo la glucemia basal, hemoglobina glicosilada, colesterol total y sus fracciones LDL y HDL, urea y creatinina. El procesamiento de todos estos parámetros nos indicaría el paciente o grupo de pacientes de mayor riesgo para el desarrollo de la retinopatía y su curso a lo largo de 5 años.

2) Valoración del estado oxidativo en plasma de los participantes en el estudio, mediante pruebas enzimático-colorimétricas para la determinación plasmática de los aldehídos peroxídicos (malonildialdehído:MDA) mediante el test del ácido tiobarbitúrico y sus metabolitos reactivos (TBARS). Estudiar sus diferencias en relación a la presentación o no de la retinopatía. Estudiar diferencias entre las determinaciones iniciales y al final del seguimiento a 5 años.

3) Valoración del estado antioxidante de los participantes en el estudio, mediante la determinación de actividad antioxidante total en plasma, con la prueba del antioxidante total (AOXT) y mediante la determinación de la actividad antioxidante del enzima superóxido dismutasa (SOD) en el concentrado eritrocitario. Estudiar sus diferencias en relación a la presentación o no de la retinopatía. Estudiar diferencias entre las determinaciones iniciales y finales, en el seguimiento a 5 años.

4) Estudiar los efectos de la administración durante 5 años, de un suplemento micronutricional con propiedades antioxidantes disponible en el mercado de la industria farmacéutica nacional (Vitalux Forte ®), en el estado oxidativo y antioxidante del 50% de los participantes de cada grupo escogidos al azar, y valorar los resultados en relación a la presentación y curso de la retinopatía en pacientes diabéticos y pacientes hipertensos.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Para nuestro estudio utilizamos pacientes que fueron entrevistados y seleccionados entre el 1 de septiembre de 1999 y el 31 de marzo de 2000.

El número de la muestra fue de 604 participantes, de los cuales 259 eran varones y 345 mujeres. La edad media de todos los sujetos seleccionados para el estudio fue de $48'46 \pm 11'06$ años (rango 30-65 años).

Los participantes se dividieron en tres grupos principales, atendiendo a su patología:

Grupo 1: Pacientes con DM (n= 220); Grupo 2: Pacientes con HTA esencial (n= 191); Grupo 3: Sujetos sanos o grupo control (n= 193).

	Diabeticos (n=220)		Hipertensos (n=191)		Controles (n=193)
	Con RD (n=105)	Sin RD (n=115)	Con RH (n=102)	Sin RH (n=89)	
Con Supl. Oral	62	50	55	49	97
Sin Supl. Oral	43	65	47	40	96

Tabla 15. Distribución inicial de los sujetos en el estudio (1999).

Además, los pacientes de dos primeros grupos se subclasificaron según padecieran o no retinopatía diabética [subgrupo 1a de pacientes diabéticos con retinopatía (n=105) y subgrupo 1b de pacientes diabéticos sin retinopatía (n=115)] o retinopatía hipertensiva [subgrupo 1a de pacientes hipertensos con retinopatía (n=102) y subgrupo 1b de pacientes hipertensos sin retinopatía (n=89)] . Se escogieron de forma aleatoria los que recibirían el suplemento vitamínico-mineral y los que no lo recibirían en ambos grupos, como se refleja en la tabla 15.

El estadio de la retinopatías en diabéticos e hipertensos se clasificó atendiendo a las características del fondo ocular en leve, moderado y severo. Se estudiaron las características generales y los hábitos de los sujetos. Estos datos quedan resumidos en la tabla 16.

	<i>Edad</i> (años)	<i>Sexo</i>		<i>Anteced.</i> <i>Familiares</i>	<i>Fumador</i>	<i>Bebedor</i>	<i>Ejercicio</i> <i>Físico</i>	<i>Control</i> <i>Dieta</i>	<i>Control</i> <i>Trat^a</i>	<i>Duración</i> (años)
		<i>V</i>	<i>M</i>							
GRD (n=105)	54,8 ± 11,7	52,3 %	47,7 %	62,6%	44,1%	15,8%	36,4%	60,7%	89,7%	11,5 ± 7,3
G no RD (n=115)	54,7 ± 10,7	59,3 %	40,7 %	60,7%	42,2%	16,1%	38,1%	68,1%	84,9%	8,4 ± 6,1
GRH (n=102)	56,7 ± 8,6	34,3 %	65,7 %	45,1%	27,5%	12,8%	49,1%	61,7%	89,2%	6,8 ± 5,3
G no RH (n=89)	54,1 ± 9,2	38,2 %	61,8 %	53,9%	26,9%	9,8%	29,2%	56,2%	86,5%	6,2 ± 5,9
GC (n=193)	46,8 ± 10,6	33,6 %	66,4 %	25,7%	30,4%	9,1%	52,1%	-	-	-

Tabla 16. Distribución por grupos y características personales y familiares de los participantes.

I. DISEÑO DEL ESTUDIO.

El diseño del trabajo y los protocolos correspondientes a las pruebas bioquímicas fueron aprobados por los comités de investigación de los cinco centros incluidos en el estudio. Todos los ensayos se ajustaron a la normativa de la Comunidad Europea para la investigación humana (Declaración de Helsinki) y los pacientes fueron informados del tipo de trabajo científico en el que iban a participar y dieron su consentimiento para la realización de las pruebas correspondientes.

Se planteó un estudio prospectivo, de cohortes, en pacientes de ambos sexos y edades comprendidas entre los 30 y 65 años.

Por las características de todos los participantes no existía motivo alguno para sospechar que la inclusión o no a este subgrupo de administración del suplemento micronutricional pudiera perjudicar su evolución o aumentar el riesgo de progresión de su retinopatía. Cada participante fue aleccionado convenientemente para ingerir de forma disciplinada la dosis diaria total requerida. El fabricante especifica en cada producto que los componentes del suplemento se mantienen de forma constante durante toda la vida del producto.

II. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.

1. Criterios de inclusión.

Los criterios de inclusión que se aplicaron fueron los siguientes:

- Edad: 30-65 años.
- Ambos sexos.
- Diabetes mellitus (tipo 1 y tipo 2) (DM-1, DM-2):
- Presentar retinopatía o no presentar retinopatía diabética leve o moderada.
- Hipertensos (HTA esencial)
- Sujetos sanos, sin patología oftalmológica.
- Capacidad para entender el estudio y colaborar con el mismo.
- Que no cumpla ninguno de los criterios de exclusión.

2. Criterios de exclusión.

Para la selección de pacientes se consideraron los siguientes datos excluyentes:

- Enfermedad cardiovascular grave (infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, vasculopatía periférica severa).
- Discrasias sanguíneas.
- Padeecer o haber padecido cáncer u otra enfermedad grave o proceso caquetizante.
- Proceso neurodegenerativo.
- Nefropatía o litiasis renal.
- Hepatopatía o ictericia.
- Dislipemia.
- Tratamiento agresivo administrado el último año (antimitóticos, etc)
- Contraindicación absoluta para el fármaco a estudio.
- Embarazo, lactancia, uso inadecuado de contracepción.
- Sospecha o confirmación de consumo de drogas ilegales.
- Lesiones avanzadas o severas de RD, que hayan requerido o requieran tratamiento específico (láser, vitrectomía, inoculación corticoides intravítreos, intraseptales, subtenonianos).
- Lesiones avanzadas de RHTA, que hubieran requerido o no actuación terapeutica específica intra- o periocular
- Tratamiento previo con láser argón, láser YAG o láser EXCIMER realizado 12 meses antes o menos.
- Cirugía oftalmológica realizada durante el último año.
- Patología ocular asociada (glaucoma, cataratas, distrofia corneal).
- Participación en otro estudio clínico.
- Hábito de multivitaminosis.
- Sospechas acerca de la capacidad de colaboración o seguimiento del estudio.

A todos los pacientes se les realizó una anamnesis pormenorizada, una exploración oftalmológica estandarizada y una determinación en sangre de parámetros bioquímicos clásicos y parámetros del estado oxidativo/antioxidante.

III. EXPLORACIÓN CLÍNICA.

1. Anamnesis.

Se realizó una anamnesis que incluyó:

- Edad al diagnóstico y tiempo de evolución de la enfermedad (DM, HTA).
- Tratamiento al que está sometido el paciente.
- Hábitos tóxicos, fundamentalmente alcoholismo y tabaquismo.
- Cumplimentación del régimen dietético.
- Ejercicio físico realizado.
- Antecedentes personales y tratamientos asociados.
- Antecedentes familiares de su proceso (padres, hermanos, abuelos y tíos).
- Cifras de su presión sanguínea (registrando la presión diastólica de tres determinaciones tomadas en la semana previa a la exploración oftalmológica, lo que se le había indicado a cada paciente telefónicamente con la suficiente antelación).

2. Exploración Oftalmológica.

Se realizó a todos los pacientes una exploración oftalmológica completa en ambos ojos, según protocolos estandarizados, incluyendo:

- Agudeza visual media con la mejor corrección (AVMMC) . Se estimó la agudeza visual de cada ojo con la notación decimal calculando posteriormente la media aritmética de ambos ojos para cada paciente.
- Biomicroscopía de polo anterior, descartando patología ocular asociada.
- Tonometría ocular, mediante tonómetro de aplanación de Goldmann, estimada en milímetros de mercurio (mmHg).
- Oftalmoscopia. La dilatación pupilar se realizó mediante la instilación de colirios de Tropicamida y Fenilefrina, en dos dosis, con intervalos entre ellas de 10 minutos y exploración a los 30 minutos tras la primera dosis. La valoración del fondo de ojo se llevó a cabo con lámpara de hendidura y lente de 78 Dioptrías. Además se tomaron retinografías de cada paciente con retinógrafo (TOPCON ImageNet TRC 50 JA Retinal).

Para valorar los hallazgos del fondo de ojo se siguieron criterios unificados:

- a) Para la retinopatía diabética se siguió la clasificación de la ETDRS modificada (Bonafonte S, García CA, 1996) (Tabla 17).

Grados de Retinopatía diabética no proliferante (RDNP)
RDNP leve: Microaneurismas (Ma) con Hemorragias retinianas leves (H), Exudados duros, Exudados blandos
RDNP moderada: Ma con cualquiera de los siguientes: <ul style="list-style-type: none">• Ma/H moderadas en 4 cuadrantes (C) o severas en menos de 4.• Anomalías microvasculares intrarretinianas (AMIR) leves en 1-4 C.• Arrosariamiento venoso (ArV) leve en 1 C.
RDNP severa: Ma asociados con signos de RDNP moderada y/o cualquiera de los siguientes: <ul style="list-style-type: none">• Ma/H severas en 4 C• ArV en al menos 2C• AMIR moderado o extenso en al menos 1 C

Tabla 17. Clasificación de la ETDRS modificada.

- b) Para la retinopatía hipertensiva se tomó la clasificación de Scheie modificada (Scheie 1953) (Tabla 18).

Al grado de retinopatía de cada ojo se le asignó un valor numérico según la siguiente correspondencia:

- Sin retinopatía: 0 puntos
- Con retinopatía leve: 1 punto
- Con retinopatía Moderada: 2 puntos
- Con retinopatía severa: 3 puntos

El grado de retinopatía para cada paciente se obtuvo considerando el ojo que más afectación tuviese de ambos.

El resultado de la exploración oftalmológica se registró en una ficha personal y el fondo de ojo se incluyó en un esquema de diseño propio acompañando a la retinografía correspondiente (Apéndice 1, al final del capítulo de Material y Métodos).

Retinopatía Hipertensiva						
Hipertensión					Arteriosclerosis	
Grado de retinopatía	Relación del estrechamiento AV general	Espasmo focal	Hemorragias	Exudados	Reflejo luminoso arteriolar	Cruces AV
Normal	3:4	1:1	0	0	Columna sanguínea roja, línea amarilla fina	Normales
Leve	1:2	1:1	0	0	Línea amarilla ensanchada, columna sanguínea roja	Depresión venosa leve
Moderada	1:3	2:3	0	0	Línea amarilla ensanchada, "alambre de cobre", columna sanguínea invisible	Dilatación de la vena (signo de Salus)
Severa	1:4	1:3	+	+	Línea blanca ancha, "alambre de plata", columna sanguínea invisible	Desviación de ángulo derecho, puntas afiladas y desaparición de la vena debajo de la arteriola (signos de Gunn y Bonnet).

Tabla 18. Clasificación de Scheie modificada.

3. Suplementación micronutricional.

El tratamiento al que se sometieron los individuos elegidos fue un suplemento vitamínico-mineral (Vitalux Forte, Novartis Pharma AG Ophthalmics, Basilea, Suiza) con la siguiente composición:

	Por cápsula	Por 100 gr.
Vitaminas antioxidantes		
Ácido ascórbico	60 mg	9,19 g
α -tocoferol	10 mg	1,53 g
Niacina	10 mg	1,53 g
Carotenoides		
β -caroteno	3 mg	0,46 g
Luteína	3 mg	0,46 g
Minerales cofactores enzimáticos		
Zinc	13,5 mg	2,07 g
Cobre	1 mg	0,15 g
Selenio	10 μ g	0,0015 g
Manganeso	1 mg	0,15 g
Otros componentes		
Proteínas	130 mg	19,91 g
Hidratos de carbono	60 mg	9,19 g
Grasas	230 mg	35,22 g

Los comprimidos se han administrado junto con los alimentos para evitar posibles reacciones gastroentéricas y facilitar su tolerancia. La vía de administración del fármaco ha sido oral y la dosis empleada de 2 cápsulas diarias, durante los primeros 20 días de cada mes, descansando el resto del mes, y así durante el transcurso de todo el estudio. De esta forma se han ingerido por individuo y día de tratamiento: 120 mg de ácido ascórbico, 20 mg de α -tocoferol, 20 mg de niacina, 6 mg de β -caroteno y 6 mg de luteína, lo que se ajusta a nuestros objetivos y a las cantidades diarias recomendadas internacionalmente (CDR) en relación a la edad y el sexo de la población.

El suplemento utilizado en el presente estudio fue idéntico para los tres grupos principales de estudio. Se solicitó a los participantes que comunicaran en cada revisión las molestias o efectos indeseables del producto ingerido (gastrointestinales, dérmicas, cardiovasculares o neurológicas, entre otras).

IV. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

A los individuos seleccionados aleatoriamente de los tres grupos de pacientes se les realizaron dos tipos de determinaciones bioquímicas en sangre periférica.

- a) Determinaciones convencionales para la valoración del estado metabólico llevadas a cabo en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia) y demás centros participantes y supervisadas diariamente.

Determinaciones Bioquímicas
Determinaciones Convencionales
Glucosa Hemoglobina Glicosilada (A1c) Colesterol total Colesterol HDL (High Density Lipoprotein: HDL) Colesterol LDL (Low Density Lipoprotein:LDL) Triglicéridos Urea Creatinina

Tabla 19. Bateria de las determinaciones clásicas realizadas a los sujetos.

- b) Determinaciones emergentes para la valoración del estado oxidativo. Estas pruebas bioquímicas se realizan mediante técnicas especiales que en la actualidad sólo se utilizan con fines experimentales. Fueron protocolizadas, puestas a punto y realizadas personalmente por nosotros (Figura 60) en el laboratorio de bioquímica de la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” de Valencia (Figura 59) , que posee el equipamiento necesario para todos estos experimentos.

Determinaciones Bioquímicas
Determinaciones Emergentes
Ácido Malonildialdehído (MDA) Antioxidante Total (AOT) Superóxido Dismutasa en eritrocitos (SOD)

Tabla 20. Determinaciones emergentes realizadas a los sujetos.



Figura 59. Instalaciones Generales de la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” (Valencia).



Figura 60. El doctorando durante la determinación de los niveles de MDA de las muestras en la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” (Valencia).

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena antecubital a las 8:00 horas por enfermeras especializadas en los centros de referencia, mediante tubos Vacuum con EDTA, estando los enfermos en condiciones de ayuno de un mínimo de 8 horas y sin haber tomado AAS, AINES ni vitaminas al menos 48 horas antes.

Los tubos fueron manipulados cuidadosamente y una parte de las muestra de cada participante fueron procesados de forma inmediata en los laboratorios de análisis clínicos de los centros participantes, para determinar en suero la glucemia, hemoglobina glicosilada, colesterol total y sus fracciones HDL y LDL, la urea y la creatinina.

El resto de la muestra individualizada fue almacenada a 4°C para ser transportada en nevera portátil para muestras biológicas hasta el laboratorio de investigación donde fueron procesadas dentro de las dos horas siguientes a su extracción, centrifugándose 10 minutos a 3.000 rpm, para separar el plasma y los eritrocitos, que se depositaron en criotubos identificados individualmente para cada paciente, y éstos a su vez en cajas especiales para almacenamiento a -70°, hasta realizar los ensayos del estado oxidativo y antioxidante.

V. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS CLÁSICOS.

Las determinaciones de la glucosa, colesterol total, HDL (High Density Lipoprotein) colesterol, LDL (Low Density Lipoprotein) colesterol, triglicéridos, creatinina y urea se realizaron con el sistema Multicalibrador SYNCHRON LX (Beckman Coulters's, Fullerton CA, USA).



Figura 61. Multicalibrador SYNCHRON LX.
Unidad de Análisis Clínicos Hospital Univ. Doctor Peset (Valencia)

1. Glucemia basal.

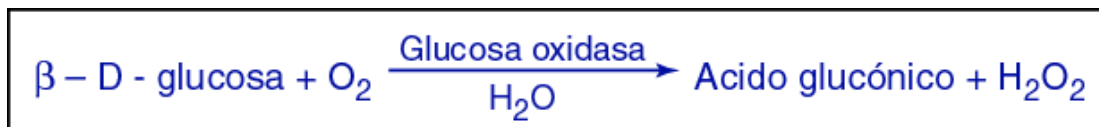
Metodología

El Sistema SYNCHRON LX determinó la concentración de glucosa mediante un método cinético de oxígeno que utiliza un electrodo de oxígeno Beckman (Kadish y Hall, 1965; Kandilsh et al, 1968).

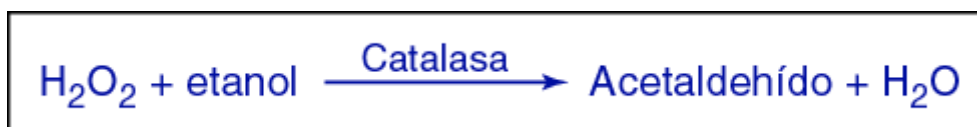
Un volumen preciso de muestra (10 microlitros) se inyecta en una copa de reacción que contiene una solución de glucosa oxidasa. La proporción utilizada es de una parte de muestra a 76 partes de reactivo. La velocidad máxima de consumo de oxígeno es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra (Morrison, 1972).

Esquema de la reacción química

El oxígeno se consume a la misma velocidad en la que la glucosa reacciona para formar ácido glucónico.



Debido a que se mide el consumo de oxígeno en vez de la formación de peróxido, el único requisito es que el peróxido debe ser destruido de tal forma que no vuelva a formar oxígeno. Según la siguiente reacción, la adición de etanol al reactivo hace que el peróxido, en presencia de la catalasa, se destruya sin producir oxígeno.



Para asegurar la destrucción completa del peróxido, se agrega yoduro y molibdato al reactivo enzimático, lo que produce la siguiente reacción.



La reacción tiene lugar aún después que la actividad de la catalasa haya disminuido debido a su tiempo de almacenamiento.

2. Hemoglobina glicosilada (HbA_{1C}).

Metodología

La HbA_{1C} se determinó mediante Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Estas técnicas fueron descritas por primera vez en 1979 (Gruber CA y Koets MD, 1979; Dunn PJ, Cole RA, Soeldner JS, 1979).

Se realizaron con un sistema automático computadorizado que integra la realización de cromatografía de alta presión como método de separación de los compuestos de la muestra y de colorimetría a doble longitud de onda (415-500 nm) como método de detección (MENARINI ADAMS A1C-HA-8160, ARKRAY, Kyoto,

Japón). En un estudio multicéntrico, esta técnica se ha demostrado rápida (2 minutos) y altamente efectiva (John et al, 1997).



Figura 62. Menarini Adams A1C-HA-8160.

Unidad de Análisis Clínicos Hospital Doctor Peset.

3. Perfil lipídico.

3.1. Colesterol total.

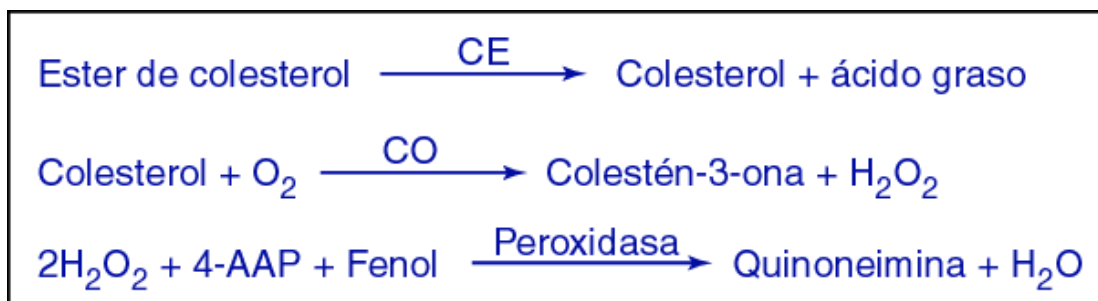
Metodología

El Reactivo Colesterol se utilizó para medir la concentración de colesterol con un método Cinético de punto final en un intervalo de tiempo fijo (Allain et al, 1974; Roeschlau et al, 1974; Trinder, 1979).

En la reacción, la colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre se oxida a colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno mediante la colesterol oxidasa (CO). La peroxidasa cataliza la reacción de peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina (4-AAP) y fenol para producir un producto de quinoneimina coloreado. El Sistema SYNCHRON LX automáticamente suministra los volúmenes correctos de muestra y reactivo en una cubeta. La proporción utilizada es de una parte de muestra a 100 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 520 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la

muestra y es usado por el Sistema SYNCHRON LX para calcular y expresar la concentración del colesterol.

Esquema de la reacción química



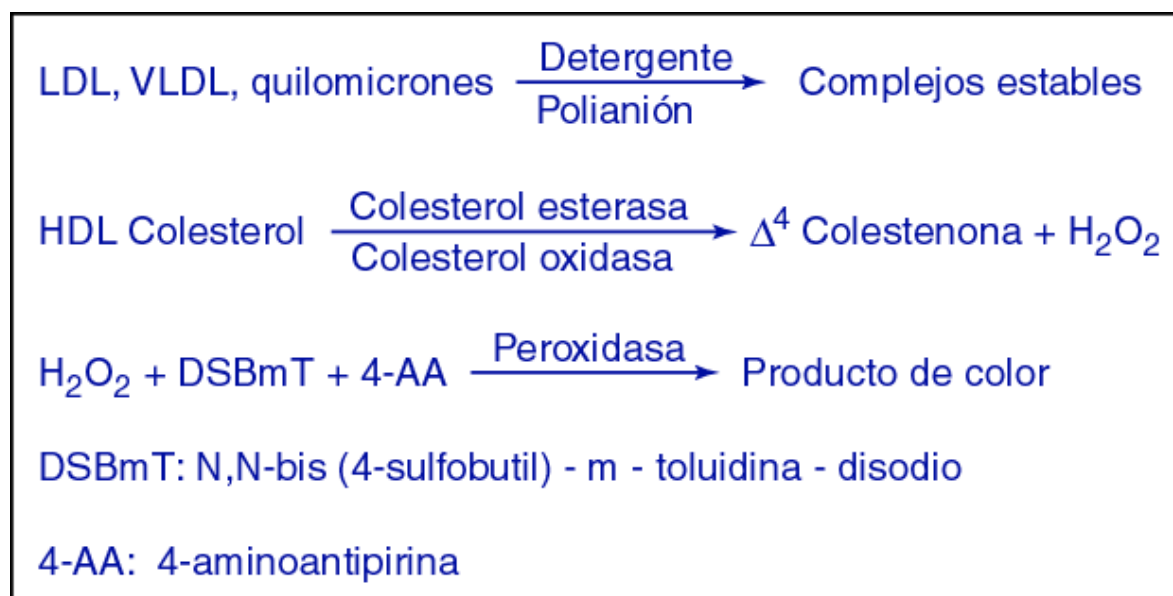
3.2. HDL colesterol.

Metodología.

El colesterol HDL es inversamente proporcional al riesgo de desarrollar enfermedades vasculares. Una proporción de HDL/LDL colesterol baja es directamente proporcional al riesgo de desarrollar enfermedades de las arterias coronarias. Un valor de colesterol HDL alto se asocia con el síndrome de "longevidad".

Este método directo para HDL colesterol es un ensayo homogéneo que no requiere centrifugación ni ningún tratamiento previo. El método depende de un detergente especial que solubiliza únicamente las partículas de lipoproteína HDL y libera HDL colesterol para que reaccione con la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa en presencia de cromógenos para producir un producto de color. El mismo detergente también inhibe la reacción de las enzimas de colesterol con las lipoproteínas LDL, VLDL y los quilomicrones mediante la adsorción a sus superficies. Un polianión contenido en el reactivo mejora la selectividad del ensayo de HDL colesterol estableciendo enlaces con LDL, VLDL y quilomicrones. El Reactivo HDL Colesterol se usa para medir la concentración de colesterol mediante un método de punto final cronometrado (Allain et al, 1974; Roeschlau et al, 1974). El Sistema SYNCHRON LX dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra de HDL colesterol y de reactivo en una cubera. La proporción usada es una parte de muestra a 93 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 560 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra y es usado por el Sistema SYNCHRON LX para calcular y expresar la concentración de HDL colesterol.

Esquema de la reacción química



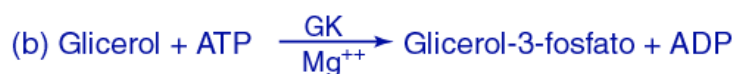
3.3. Triglicéridos.

Metodología

El Reactivo Triglicéridos GPO se utilizó para medir la concentración de triglicéridos mediante un método de punto final en un intervalo de tiempo fijo (Bucco y David, 1973; Pinter et al, 1975). Los triglicéridos en la muestra se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos libres en virtud de la acción de la lipasa. Una secuencia de tres pasos enzimáticos acoplados que utilizan glicerol cinasa (GK) glicerofosfato oxidasa (IGPO) y peroxidasa de rábano picante (HPO) provoca acoplamiento oxidativo del ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfónico (DHBS) con 4-aminoantipirina para formar un colorante rojo de quinona (quinoneína).

El Sistema SYNCHRON LX automáticamente suministra los volúmenes correctos de muestra y reactivos en una cubeta. La proporción utilizada es una parte de muestra a 100 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 520 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra y es usado por el Sistema SYNCHRON LX para calcular y expresar la concentración de triglicéridos.

Esquema de la reacción química



3.4. LDL colesterol.

La concentración de LDL colesterol se calcula conociendo el colesterol total, HDL colesterol y triglicéridos de forma automática por el Sistema SYNCHRON LX según la siguiente fórmula (Friedewald, 1972):

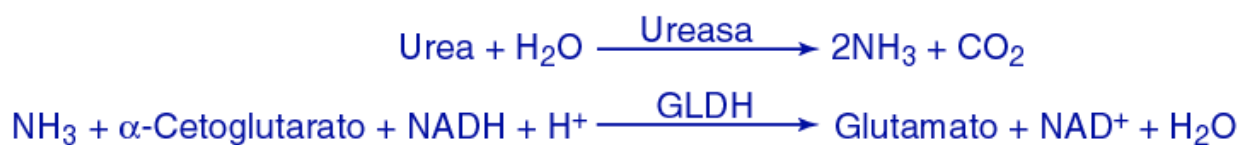
$$\text{LDL colesterol} = \text{Colesterol total} - \text{HDL colesterol} - \frac{\text{Triglicéridos plasmáticos}}{2,175}$$

4. Urea.

Metodología

El Reactivo Urea se utilizó para medir la concentración de urea con un método cinético enzimático (Talke y Schubert, 1965; Tiffany, 1972). En la reacción, la urea es hidrolizada por la ureasa, formando amoniaco y dióxido de carbono. La glutamato deshidrogenasa (GLDH) cataliza la condensación de amoniaco y α -cetoglutarato a glutamato, con la oxidación concomitante de b-dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (NADH) a b-dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD). El Sistema SYNCHRON LX automáticamente diluye las muestras y suministra los volúmenes correctos de muestra y reactivo en una cubeta. La proporción utilizada es de una parte de muestra a 100 partes de reactivo para suero. El sistema controla el cambio de absorbancia a 340 nanómetros. Este cambio en absorbancia es directamente proporcional a la concentración de urea en la muestra y es usado por el Sistema SYNCHRON LX para calcular y expresar la concentración de urea.

Esquema de la reacción química



5. Creatinina.

Metodología

El método SYNCHRON LX determinó la concentración de creatinina mediante el método cinético de Jaffé (Jaffé 1886).

Un volumen preciso de muestra (16,5 microlitros de suero) se inyecta en una copa de reacción que contiene una solución de picrato alcalino. La proporción utilizada para suero es de una parte de muestra a 35 partes de reactivo. La creatinina de la muestra se combina con el reactivo para producir un complejo de color rojo. Las lecturas de absorbancia se estiman a 520 nanómetros entre 19 y 25 segundos después de la inyección de la muestra. Se ha demostrado que la cinética de absorbancia es una medida directa de la concentración de creatinina en la muestra (Bartels y Cikes, 1969; Fabiny y Ertingshausen, 1971; Heinegard y Tiderstrom, 1973).

Esquema de la reacción química



IV. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EMERGENTES: ANÁLISIS DEL ESTADO OXIDATIVO- ANTIOXIDANTE.

Como se expuso anteriormente las muestras de sangre de cada paciente fueron sometidas a centrifugación 10 minutos a 3.000 rpm, para separar el plasma y los eritrocitos. En plasma se determinó el Malonildialdehido (MDA) y el Antioxidante total (AOT), y en el concentrado de eritrocitos la Superóxido dismutasa (SOD).

1. Malonildialdehido (MDA).

El MDA se determinó mediante la prueba del ácido tiobarbitúrico y sus metabolitos reactivos (TBARS) (Yagi K, 1976).

Los grupos aldehídicos de los TBARS (que incluyen el MDA) reaccionan con dos moléculas del ácido tiobarbitúrico (TBA) a pH ácido y temperatura elevada (aproximadamente 100°) para formar un complejo de color rosado que se extrae con butanol. La fluorescencia de este complejo se mide en relación a la fluorescencia de muestras patrón de concentraciones conocidas (curva estándar) y posteriormente se extrapola la concentración de la muestra problema (Hendriks et al. 1988; Conti et al. 1991; Richard et al, 1992).

Para evitar la autooxidación de las muestras se añade el hidroxibutil tolueno antes de empezar el protocolo. También se añade el sulfato sódico, que inhibe la unión del TBA con el ácido siálico cuyo pico corresponde con el del MDA (532nm de longitud de onda (γ) de excitación y 553 nm de γ de emisión) pero no interfiere con la reacción total, para evitar sobreestimaciones.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- - MDA estándar 2 μ M; 20 μ M. Se calcula a partir de solución stock del MDA Sigma T9889.
- - PBS pH 7.4 (tampón).
- - Sulfato sódico (SDS) al 7%. En polvo y se diluyen 7 gramos en 100 ml de agua.
- - HCl 0.1 normal. Líquido.
- - Ácido fosfotúngstico al 1%. En polvo. Se diluye 1 gramo en 100 ml de agua.
- - Ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67%. Polvo. Se diluyen 0.67 gramos en 100 ml de agua, debiendo calentarse un poco para que se disuelva.
- - n-butanol. Líquido.

Procedimiento:

a) Preparación mediante dilución del MDA estándar de la curva estándar obteniendo patrones de concentración conocida de MDA progresivamente creciente. Serán usadas por el fluorímetro para comparar su fluorescencia con la fluorescencia de la muestra problema. Las concentraciones de la curva estándar se detallan a continuación.

Concentración MDA	Tampón (PBS)	Volumen MDA
0 μM	250 μl	-
1 μM	125 μl	125 μl (2 μM)
2 μM	225 μl	25 μl (20 μM)
3 μM	212.5 μl	37.5 μl (20 μM)
6 μM	175 μl	75 μl (20 μM)

b) Elaboración de las muestras y de la curva estándar, mediante el siguiente protocolo:

- Se añadió 125 μl de la muestra.
- Se añadió 125 μl del tampón PBS sólo a las muestras.
- Se añadió 100 μl de BTH.
- Se añadió 100 μl de SDS.
- Se añadió 1 ml de HCl 0.1 N.
- Se añadió 150 μl de ácido fosfotúngstico.
- Se añadió 500 μl de TBA.
- Se agitaron los tubos y se pusieron a hervir durante una hora a 98°C, tapados de la luz con papel de aluminio.
- Se Enfriaron con hielo y se añadió 1 ml de n-butanol.
- Se centrifugaron a 2.800 rpm 10 minutos a 25°C.

c) Medición: Se colocaron 200 μl de la fase superior de cada tubo en una placa de microtiter y se midieron en el fluorímetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) con 544 nm de excitación y 590 nm de emisión. Se midió la fluorescencia emitida por la muestra procesada frente a la de la curva estándar, que contiene los reactivos pero no la muestra de plasma.



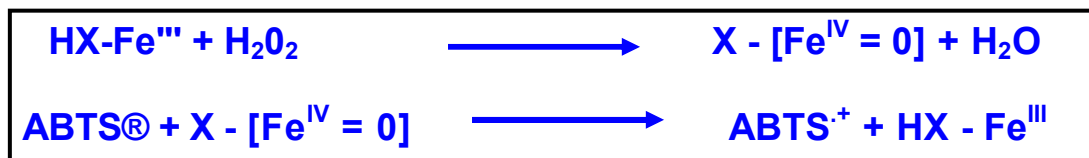
Figura 63. Fluorímetro Fluoroskan Ascent. Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” (Valencia).

Se calculó entonces la concentración de las muestras extrapolando los datos a la curva estándar y los valores fueron expresados como media \pm desviación estándar de dos o tres medidas por muestra.

2. Antioxidante total (AOT).

La actividad AOT se midió mediante la prueba comercial NX2332 Total Antioxidant Status (Randox Laboratories Ltd, County Antrim, UK).

El ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato]) se incubó con peroxidasa (metamioglobina) y H_2O_2 para dar el radical catión $ABTS^{\cdot+}$. Este radical presenta una coloración verde-azulada relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo esta supresión, proporcional a la concentración de antioxidantes (Miller et al, 1993).



**HX-Fe^{III} = Metamioglobina; X - [Fe^{IV} = O] = Ferrilmioglobina
 ABTS = 2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato]**

Los antioxidantes presentes en el plasma causan la interrupción de la absorbancia a 600 nm de γ hasta un grado en proporción directa a la concentración de los mismos en la muestra, lo que nos proporciona el índice de actividad AOT presente

en cada uno de los plasmas ensayados, tomando la media \pm desviación estándar de 3 determinaciones. La absorbancia (A) se midió mediante un Espectrofotómetro Dynatech MR7000 (Dynatech, Billingham, UK).



Figura 64. Espectrofotómetro Dynatech. Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” (Valencia)

Los reactivos utilizados se recogen en la siguiente tabla.

Componentes	Concentraciones en la prueba
1. Tampón Tampón Fosfato Salino	80 mmol/l, pH 7,4
2. Cromógeno Metamioglobina ABTS	6,1 μ mol/l 610 pmol/l
3. Sustrato Peróxido de hidrógeno(forma estabilizada)	250 pmol/l
Patrón 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán -2-ácido carboxílico	Lote específico

La preparación de los reactivos se realizó según sigue:

1. Tampón

Listo para usar.

2. Cromógeno

Se reconstituyó un vial de cromógeno 2 con 10 ml de Tampón.

3. Sustrato

Se diluyó 1 ml de sustrato con 1.5 ml de Tampón.

4. Patrón

Se reconstituyó un vial de Patrón con 1 ml de agua destilada

El procedimiento utilizado para cada muestra se recoge en la siguiente tabla:

Longitud de onda: 600 nm Cubeta: 1 cm espesor Temperatura: 37°C			
Se pipetearon en cubeta las siguientes preparaciones:			
Preparaciones	Reactivo	Patrón	Muestra
Agua Bidestilada	10 µl		
Patrón		10 µl	
Muestra			10 µl
Cromógeno	250 µl	250 µl	250 µl

Se mezcló convenientemente y se leyó la absorbancia inicial (A_1) de cada preparación. Posteriormente se añadió la misma cantidad de sustrato (50µl) a las tres preparaciones (reactivo blanco, patrón y muestra). Se mezcló y se empezó a cronometrar simultáneamente. Se leyó entonces la absorbancia (A_2) al cabo de exactamente 3 minutos. Entonces se obtuvieron las diferencias (Δ) entre la absorbancia después y antes de la adición de sustrato a cada una de las preparaciones:

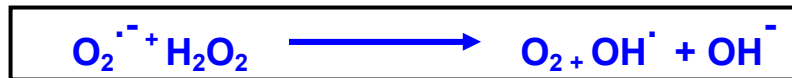
$$A_2 - A_1 = \Delta A \text{ de muestra/patrón/blanco}$$

Para el cálculo de la concentración del antioxidante total (mmol/l) se utilizó la siguiente fórmula:

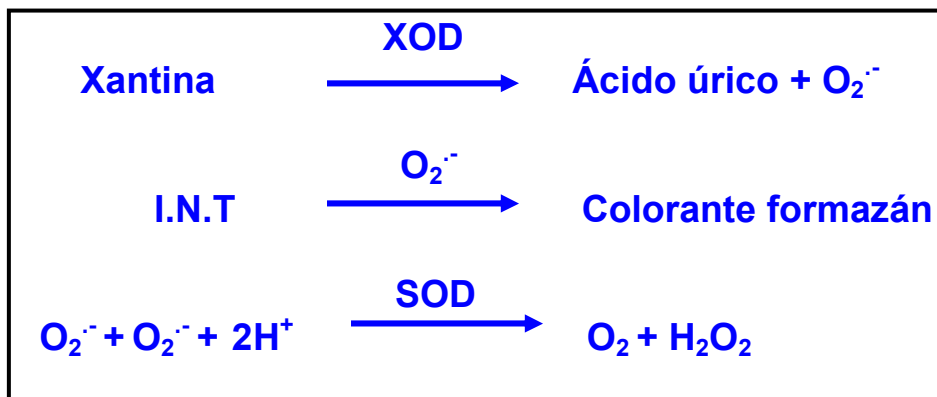
$$\text{Factor} = \text{concentración del patrón} / (\Delta A \text{ blanco} - \Delta A \text{ patrón})$$
$$\text{Antioxidante total (mmol/L)} = \text{Factor} \times (\Delta A \text{ Blanco} - \Delta A \text{ Muestra})$$

3. Superóxido Dismutasa (SOD).

La actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD) se midió mediante la prueba comercial SD125 Superóxido dismutasa (Randox Laboratories Ltd, County Antrim, UK). La función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), producido durante un proceso oxidativo energético, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.



Este método emplea Xantina y Xantín-oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa por el grado de inhibición de esta reacción (Woolliams et al, 1983; Arthur y Boyne, 1985).



La absorbancia (A) se midió mediante un Espectrofotómetro Dynatech MR7000 (Dynatech, Billingham, UK).

Preparación de la cada muestra

Se utilizó el concentrado de hematíes resultante de la centrifugación durante 10 min a 3000 rpm de 0,5 ml de sangre entera. Se lavaron 4 veces los eritrocitos con 3 ml de solución de NaCl al 0,9 %, centrifugando durante 10 min a 3000 rpm después de cada lavado.

El centrifugado lavado de eritrocitos se completó con 2,0 ml de agua bidestilada fría. Se mezcló y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. El lisado se diluyó con 0,01 mmol/l de Tampón Fosfato pH 7,0, de forma que el porcentaje de inhibición caiga entre el 30 y el 60%. Para muestras humanas se recomienda 25 partes de dilución de lisado (Factor de dilución final = 100) .

Los reactivos utilizados y sus concentraciones se resumen en la siguiente tabla:

REACTIVOS	
<u>Componentes</u>	Concentraciones iniciales de las Soluciones
1. Sustrato mixto	
Xantina	0,05 mmol/l
I.N.T.	0,025 mmol/l
2. Tampón	
CAPS	40 mmol/l, pH 10,2
EDTA	0,94 mmol/l
3. Xantín Oxidasa	80 U/l
4. Patrón	valor asignado en el vial

Reactivos adicionales requeridos pero no suministrados:

Muestra Diluyente Ransod Cat. No. SD 124 (0,01 mol/l Tampón Fosfato, pH 7,0)

La preparación de las soluciones se realizó de la siguiente manera:

1. Sustrato Mixto

Se reconstituyó un vial de Sustrato Mixto 1 con 20 ml de Tampón.

2. Tampón

Listo para usar.

3. Xantín Oxidasa

Se reconstituyó el contenido de un vial de Xantín Oxidasa con 10 ml de agua bidestilada.

4. Patrones

Se reconstituyó el contenido de un vial de Patrón con 10 ml de agua bidestilada. Posteriormente las diluciones de este patrón se prepararon con muestra diluyente Ransod. Se hicieron las siguientes diluciones del patrón para construir la curva patrón, según la tabla siguiente:

	Vol. de Soluciones Patrón	Vol. de Muestra Diluyente
S6	Patrón neto	-
S5	5 ml de S6	5 ml
S4	5 ml de S6	5 ml
S3	5 ml de S4	5 ml
S2	3 ml de S3	5 ml
S1 = Muestra Diluyente		

El procedimiento utilizado para cada muestra se recoge en la siguiente tabla:

Longitud de onda 505nm			
Cubeta: 1 cm espesor			
Temperatura: 37°C			
Se pipetearon en cubeta las siguientes preparaciones:			
	<u>Diluyente</u>	<u>Patrones S2-S6</u>	<u>Muestra (Diluida)</u>
Muestra diluida			
Patrón		0,05 ml	0,05 ml
Muestra diluyente			
Ransod	0,05 ml		
Sustrato Mixto	1,7 ml	1,7 ml	1,7 ml
Mezclar bien			
Xantina Oxidasa	0,25 ml	0,25 ml	0,25 ml

Se mezcló bien y se leyó la absorbancia inicial (A_1) al cabo de 30 segundos y se empezó a cronometrar el tiempo simultáneamente. Posteriormente se leyó la absorbancia final (A_2) al cabo de 3 minutos.

En este momento se realizaron los cálculos según las siguiente fórmulas:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \Delta A / \text{min de patrón o de muestra}$$

Índice de muestra diluyente (Índice S1) = Índice de reacción sin inhibir = 100%

Todos los índices tanto de los patrones como de las muestras diluidas hubieron de ser convertidos en porcentajes del índice del blanco y sustraídos del 100% para obtener un porcentaje de inhibición:

$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{patron}}/\text{min} \times 100)}{(\Delta A_{S1}/\text{min})} = \% \text{ inhibición}$$
$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{muestra}}/\text{min} \times 100)}{(\Delta A_{S1}/\text{min})} = \% \text{ inhibición}$$

Se representó el porcentaje de inhibición para cada patrón frente a Log_{10} (concentración de patrón en unidades SOD/ml).

Se utilizó el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades de SOD de la curva patrón.

$$\text{Unidades de SOD/ml de sangre entera} = \text{Unidades de SOD en la curva patrón/ml} \times \text{factor de dilución}$$

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos del estudio se sometieron a tabulación (Apéndice 2, al final del capítulo de Material y Métodos) y procesamiento estadístico mediante el programa Excel para Windows (versiones 2000 y XP) y el programa SPSS (versión 12.0)

Los valores expresados son la media \pm desviación estándar para todos los parámetros y los valores plasmáticos de TBARS fueron transformados logarítmicamente para normalizar su distribución.

La comparación entre los distintos grupos se ha realizado mediante el test “t” de Student para datos independientes, mientras que los resultados de cada subgrupo al principio y al final del estudio se realizaron mediante el test “t” de Student para datos pareados, tomándose los intervalos de confianza al 95%. Las asociaciones entre los parámetros se establecieron mediante la prueba de correlación bivalente de Pearson.

Apéndice 1. Hoja de trabajo para la recogida de datos clínicos.

Nombre.....Edad.....Sexo.....
Nº identificación.....
Nº historia.....Telefono1.....
Telefono 2.....
Dirección.....
.....
e-mail.....

Historia Clínica

HTA filiada: si no Edad de diagnostico.....años

DM tipo.....Edad de diagnóstico.....años

Antecedente de enfermedad vascular sintomática (cardiaca, SNC, Periferica): si no

-Tratamiento dietético: si no

-Restricción de sal: si no

-Antidiabéticos orales.....duración.....años (duranteaños –si actualmente esta con insulina-).

-Tipos: sulfonilureas biguanidas inh.alfaglucosidasas

-Insulina.....-duracion.....años

-Tipo tto con insulina : convencional (1 o 2 inyecciones/día) intensificado (3 o mas; infusión continua)

-Tto con hipotensores: - tipo: IECAs-ARAI Alfaago Betabloq Antag.calcio

-duracion.....años

-Tto con diureticos -tipo Tiacidicos DeAsa AhorradoresK Proximales

-duración.....años

-Sigue tto con Vitalux :

-Tto con algun otro complejo vitamínico: si no

-Otros Ttos actuales: Anticonceptivos orales Esteroides AINES Antiagr Anticoag
Antidepresivos

-embarazada? si no

-Fumador activo decigarrillos /día desde hace.....años

-Fumador pasivo de horas al día =cigarrillos/día (estudio Universidad de Minessota: cada 2 horas en ambiente cargado equivale a 4 cigarrillos) cigarrillos

-Exfumador desde hace.....años Duracion del periodo fumador.....años Cuantia media de consumo durante ese periodo.....cigarrillos/día

-Habito enólico (de 1 a 4) (1 abstemio; 2 bebedor esporadico ; 3 bebedor social habitual; 4 bebedor diario).....

-Consumo de Estimulantes simpaticomiméticos (café, te, cocaína, anfetaminas): si no

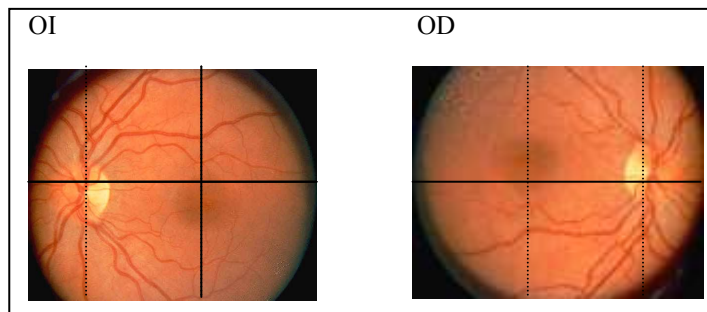
-Actividad laboral habitual conlleva esfuerzo fisico : si no

- Actividad física extra (actividad deportiva) si no
- Individuos con diabetes (nº) (familiares de 1ª línea).....
- Individuos con hipertensión (nº) (familiares de 1ª línea).....
- Nivel cultural del individuo (1 sin estudios 2 primaria 3 secundaria 4 universitarios).....
- Autovaloración del paciente sobre el control de su propia enfermedad (1 malo; 2 regular; 3 bueno; 4 excelente).....

Exploración clínica

- Peso.....kg
- Talla.....metros
- Índice de masa corporal.....
- Tensión arterial diastolica; medida 1.....2.....3.....mmHg.
Media aritmética de las tres medidas (TAD)=
- AV (con la mejor corrección) OD.....OI
- PIO OD.....OI.....
- BIOMICROSCOPIA
- Profundidad Camara OD.....OI.....
- Esclerosis cristalino (+a 4+) OD.....OI.....(constatar si afaquia o pseudofaquia u opacificacion caps post)
- Pigmentación iris: marrón gris verde azul
- Tamaño pupilar al haz de luz OD.....mm OI.....mm
- Respuesta a la dilatación OD.....mm OI.....mm
(con pauta preestablecida midriatica)

-Fondo ojo



Estadio del fondo del ojo

OI

OD

Apéndice 2. Desglose de la base de datos (Excel) para el procesamiento informático de los datos.

Identificación del individuo	Grupo: 1 DM; 2 HTA; 3 C	Sexo: 1 hombre 2 mujer	Edad	Suplemento 1 si; 2 no
-------------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------	-------------	---------------------------------

Glucemia	Hb Glicosilada	Colesterol	HDL	LDL	Triglicéridos	Urea	Creatinina
-----------------	-----------------------	-------------------	------------	------------	----------------------	-------------	-------------------

MDA ($\mu\text{mol/l}$)	ANTX (mmol/l)	SOD (U/ml)
-------------------------------------	------------------------------------	----------------------

Duracion Enf.	Seguir trat°: 1 si; 2 no	Seguir Dieta: 1si; 2 no	Fuma: 1 si; 2 no	Bebe: 1 si; 2 no	Hace Ejercicio 1 si; 2 no	Antec Familiares 1 si ; 2 no
----------------------	------------------------------------	-----------------------------------	----------------------------	----------------------------	-------------------------------------	--

AVOD AVOS AVMMC PIO OD PIO OI

FOOD NORMAL 0 RETINOPATÍA LEVE 1 RETINOPATÍA MODERADA 2 RETINOPATÍA SEVERA OD 3	FOOS NORMAL 0 RETINOPATÍA LEVE 1 RETINOPATÍA MODERADA 2 RETINOPATÍA SEVERA 3	Grado de Retinopatía (empeora:1 no emp.: 2)	TA Diastolica
--	---	--	----------------------

RESULTADOS.

Hemos llevado a cabo este estudio a lo largo de cinco años con los participantes seleccionados distribuidos en tres grupos principales. Según la metodología expuesta en el capítulo anterior se han obtenido los siguientes resultados.

I. RESULTADOS DE LOS GRUPOS Y SUBGRUPOS AL COMIENZO DEL ESTUDIO (1999)

La necesidad de valorar los efectos de la administración de un suplemento de micronutrientes con propiedades antioxidantes (Vitalux forte ®) precisó la clasificación de cada uno de los grupos y subgrupos en relación a la administración o no de este suplemento, tal como se describió en material y métodos.

	Diabéticos (n=220)		Hipertensos (n=191)		Controles (n=193)
	Con RD (n=105)	Sin RD (n=115)	Con RH (n=102)	Sin RH (n=89)	
Con Supl. Oral	62	50	55	49	97
Sin Supl. Oral	43	65	47	40	96

Tabla 21. Distribución de los pacientes al comienzo del estudio.

Las características y hábitos de dichos participantes al principio del estudio asignados en sus respectivos grupos se exponen en la siguiente tabla.

	Edad (años)	Sexo		Anteced. Familiares	Fumador	Bebedor	Ejercicio Físico	Control Dieta	Control Trat ^a	Duración (años)
		V	M							
GRD (n=105)	54,8 ± 11,7	52,3 %	47,7 %	62,6%	44,1%	15,8%	36,4%	60,7%	89,7%	11,5 ± 7,3
G no RD (n=115)	54,7 ± 10,7	59,3 %	40,7 %	60,7%	42,2%	16,1%	38,1%	68,1%	84,9%	8,4 ± 6,1
GRH (n=102)	56,7 ± 8,6	34,3 %	65,7 %	45,1%	27,5%	12,8%	49,1%	61,7%	89,2%	6,8 ± 5,3
G no RH (n=89)	54,1 ± 9,2	38,2 %	61,8 %	53,9%	26,9%	9,8%	29,2%	56,2%	86,5%	6,2 ± 5,9
GC (n=193)	46,8 ± 10,6	33,6 %	66,4 %	25,7%	30,4%	9,1%	52,1%	-	-	-

Tabla 22. Distribución de los pacientes sin considerar la asignación o no al grupo de suplementación con micronutrientes.

Aunque aún no había comenzado la administración de suplemento oral, las características de los subgrupos asignados se muestran en la tabla 23.

1999										
	Edad (años)	Sexo		Anteced. Familiares	Fumador	Bebedor	Ejercicio Físico	Control Dieta	Control Trat ^a	Duración (años)
		V	M							
GRD + S (n=62)	53,3 ± 11,9	50,0%	50,0%	69,3%	48,4%	16,1%	38,7%	61,3%	91,9%	11,2 ± 7,9
GRD sin S (n=45)	57,0 ± 11,4	55,5%	44,5%	48,9%	33,3%	15,5%	33,3%	62,2%	86,6%	11,9 ± 6,3
G no RD + S (n=50)	54,1 ± 9,9	58,0%	42,0%	80,0%	52,0%	20,1%	34,1%	74,0%	76,0%	7,5 ± 5,7
G no RD sin S (n=63)	55,2 ± 11,4	60,3%	39,7%	82%	38,1%	12,7%	41,2%	63,5%	92,1%	9,1 ± 6,3
GRH + S (n=55)	56,9 ± 8,7	27,3%	72,7%	51%	25,5%	14,5%	60%	63,6%	91%	6,2 ± 5,2
GRH sin S (n=47)	56,6 ± 8,6	42,5%	57,5%	38,3%	29,8%	6,4%	36,2%	59,6%	87,2%	5,5 ± 5,3
G no RH + S (n=50)	54,8 ± 9,2	34,0%	66,0%	62,1%	27,3%	6,0%	38,1%	58,2%	92,5%	6,4 ± 5,7
G no RH sin S (n=42)	53,0 ± 9,1	21,4%	78,6%	47,6%	21,4%	11,4%	21,5%	54,7%	80,9%	5,9 ± 6,3
GC + S (n=97)	48,1 ± 10,1	31,9%	68,1%	24,7%	26,8%	11,3%	59,8%	-	-	-
GC sin S (n=96)	45,6 ± 10,9	35,4%	64,6%	27,1%	32,3%	8,3%	43,7%	-	-	-

Tabla 23. Hábitos de vida de los pacientes del estudio al principio del mismo divididos en los correspondientes subgrupos. Media ± Desviación Estándar

A todos los participantes en el estudio se les realizó el examen oftalmológico estandarizado, según la descripción detallada anteriormente. Los resultados para los tres grupos principales se expresan como media ± Desviación estándar de la agudeza visual para el ojo derecho y ojo izquierdo y la tensión ocular del ojo derecho y ojo izquierdo, en milímetros de Hg y quedan reflejados en la tabla 24.

1999				
	AVOD	AVOI	PIO OD	PIO OI
GDM (n=220)	0,90 ± 0,22	0,91 ± 0,19	16,07 ± 2,66	16,66 ± 2,82
GHTA (n=191)	0,95 ± 0,14	0,98 ± 0,55	15,37 ± 2,35	15,54 ± 2,31
GC (n=193)	1,02 ± 0,87	1,03 ± 0,95	15,24 ± 1,99	15,35 ± 2,40

Tabla 24. Agudeza visual y Presión intraocular (PIO) al comienzo del estudio en los grupos principales.

A partir de aquí se considerarán las agudezas visuales medias (de ambos ojos) con la mejor corrección. Los datos comparativos correspondientes a la agudeza visual media de cada uno de los grupos, respecto a la presencia o no de retinopatía se muestran en la figura 65.

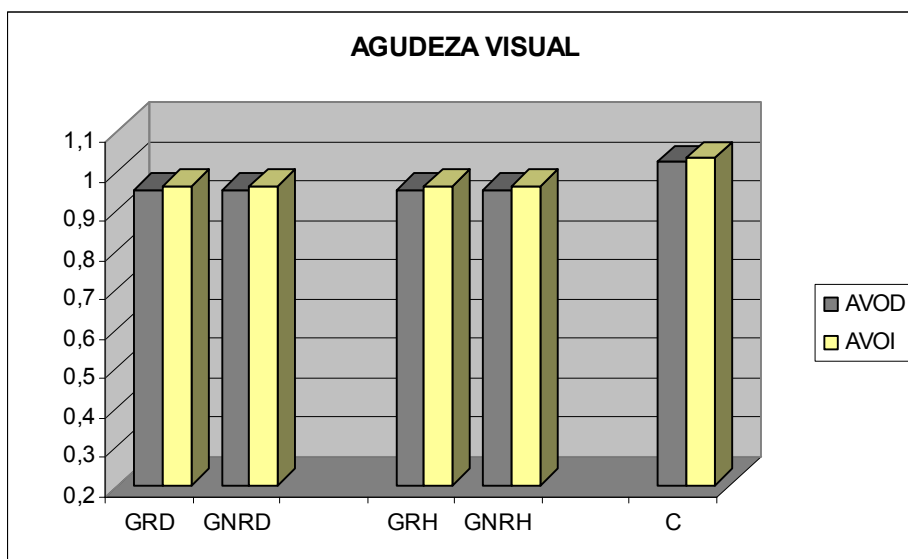


Figura 65. Agudeza visual individuos al comienzo del estudio. GRD=Grupo con retinopatía diabética. GNRD=Grupo sin retinopatía diabética. GRH= Grupo con retinopatía hipertensiva. GNRH= Grupo sin retinopatía hipertensiva. C =Controles.

La AVMMC no fue diferente en de los tres grandes grupos al inicio del estudio.

1999						
	GDM	GHTA	GC	GDM vs GHTA	GDM vs GC	HTA vs GC
AVMMC	0,91 ± 0,19	0,98 ± 0,56	1,03 ± 0,94	0,11	0,09	0,57

Tabla 25. Comparación de la AVMMC de individuos diabéticos, hipertensos y controles. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

Asimismo tampoco existieron diferencias entre las agudezas visuales mejor corregidas de los pacientes diabéticos e hipertensos según padecieran o no retinopatías.

1999						
	GRD	G no RD	GRD vs G no RD	GRH	G no RH	GRH vs G no RH
AVMMC	0,89 ± 0,21	0,92 ± 0,18	0,31	0,95 ± 0,16	1,01 ± 0,76	0,48

Tabla 26. Comparación de la AVMMC de individuos diabéticos (con y sin retinopatía) e hipertensos (con y sin retinopatía). Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

De forma similar el grupo de individuos controles a los que se les administraría el suplemento no tenían una Agudeza Visual Media con la Mejor Corrección diferente al grupo de controles a los que no se les administraría.

1999			
	GC + S	GC sin S	GC + S vs GC sin S
AVMMC	0,96 ± 0,13	1,06 ± 0,38	0,42

Tabla 27. Comparación de la AVMMC de individuos diabéticos (con y sin retinopatía) e hipertensos (con y sin retinopatía). Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

Por otro lado a todos los pacientes se les interrogó acerca de sus cifras de presión diastólica. Los resultados de base mostraron que los pacientes hipertensos tenían valores medios de tensión arterial diastólica significativamente mayores que los diabéticos y los controles, no existiendo diferencia entre las TAD de los grupos diabéticos y controles (tabla 28).

1999						
	GDM	GHTA	GC	GDM vs GHTA	GDM vs GC	GHA vs GC
TAD (mm Hg)	77,22 ± 11,19	82,19 ± 12,17	78,43 ± 11,21	p<0.01	0,52	p<0.01

Tabla 28. Comparación de la TAD de individuos diabéticos, hipertensos y controles. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

De la misma forma, las cifras de tensión arterial diastólica al comienzo del estudio no presentaron diferencias significativas en los grupos de diabéticos con y sin retinopatía y de hipertensos con y sin retinopatía (Tabla 29).

1999						
	GRD	G no RD	p	GRH	G no RH	p
TAD (mm Hg)	76,11 ± 12,70	76,11 ± 11,78	0,99	80,33 ± 12,47	80,29 ± 12,32	0,98

Tabla 29. Comparación de la TAD de individuos diabéticos, hipertensos y controles. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Tampoco se mostraron diferencias en las tensiones diastólicas de los pacientes del grupo control que iban a recibir el suplemento respecto de los que no lo iban a recibir.

1999			
	GC + S	GC sin S	P
TAD	79,17 ± 12,63	77,9 ± 11,94	0,42

Tabla 30. Comparación de la TAD de individuos controles que recibirían posteriormente el suplemento (GC+S) y los que no (GC sin S). Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Al comienzo del estudio se realizó un estudio bioquímico en sangre periférica a una muestra de 323 participantes escogidos al azar de entre los 604 individuos reclutados entre los individuos de los 3 grupos principales [(GDM; n=110); (GHTA; n=106); (GC; n=107)]. Se determinaron dos tipos de parámetros, los considerados como clásicos o convencionales, de uso en la clínica diaria (glucemia

basal, hemoglobina glicosilada, colesterol total, fracción HDL, fracción LDL, triglicéridos, urea, creatinina) y los parámetros emergentes, que consideramos potencialmente interesantes en la práctica oftalmológica, ya que determinan la actividad oxidativa y antioxidante de muestras biológicas, en este caso la sangre.

1999								
	Glucemia	HbA1c	Colesterol Total	HDL col	LDL col	Triglicer.	Urea	Creatina
GRD (n=59)	205,60 ± 74,75	8,34 ± 1,6 %	196,45 ± 38,50	55,80 ± 11,27	113,11 ± 35,21	94,50±61, 42	37,65 ± 8,89	1,01 ± 0,18
G no RD (n=51)	176,56 ± 94,47	7,95 ± 1,6 %	189,31 ± 36,12	58,88 ± 10,37	117,39 ± 35,97	72,31±30, 87	36,75 ± 8,32	0,91 ± 0,097
GRH (n=50)	111,03 ± 36,24	8,40 ± 1,24%	208,92 ± 29,83	55,51 ± 14,69	130,62 ± 26,34	120,3±61, 1	38,95 ± 9,12	0,99 ± 0,22
G no RH (n=56)	102,15 ± 13,87	4,91 ± 0,61%	210,47 ± 32,26	57,67 ± 14,65	128,93 ± 29,1	111,7 ± 53,7	38,66 ± 7,67	0,95 ± 0,17
GC (n=107)	95,58 ± 10,45	4,98 ± 0,74%	193,00 ± 40,01	58,54 ± 14,18	128,22 ± 34,36	102,5 ± 65,6	37,65 ± 8,89	0,95 ± 0,11

Tabla 31. Resultados de los parámetros bioquímicos clásicos en los pacientes al comienzo del estudio. Expresados como media ± desviación estándar.

Como hemos mencionado, a 323 individuos de los 3 grupos principales [(GDM; n=110); (GHTA; n=106); (GC; n=107)] y se les realizó la determinación de las actividades oxidativa (malonildialdehído) y antioxidante total en el plasma y la actividad enzimática superóxido dismutasa en concentrado de eritrocitos, al inicio del estudio. Se consideró paralelamente el grado de retinopatía según lo expuesto en material y métodos.

1999						
	GDM	GHTA	GC	GDM vs GHTA	GDM vs GC	GHTA vs GC
AOXT	1,19 ± 0,25	1,15 ± 0,30	1,22 ± 0,39	0,34	0,62	0,21
MDA	2,10 ± 0,42	2,06 ± 0,32	1,96 ± 0,35	0,54	<0,01	0,04
SOD	209,60 ± 59,61	199,62 ± 48,18	212 ± 63,71	0,23	0,73	0,12
RETINOPATIA	1,56 ± 0,71	1,57 ± 0,60	-	-	-	-

Tabla 32. Comparación al inicio del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos separados en los grupos principales. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

Los resultados indican que el grupo de pacientes diabéticos e hipertensos presentaban una actividad oxidativa (MDA) significativamente mayor que los controles durante todo el seguimiento. Es destacable observar como entre los dos grandes grupos patológicos (diabéticos e hipertensos) no se observaron diferencias significativas en cuanto a su actividad oxidante (Figura 65).

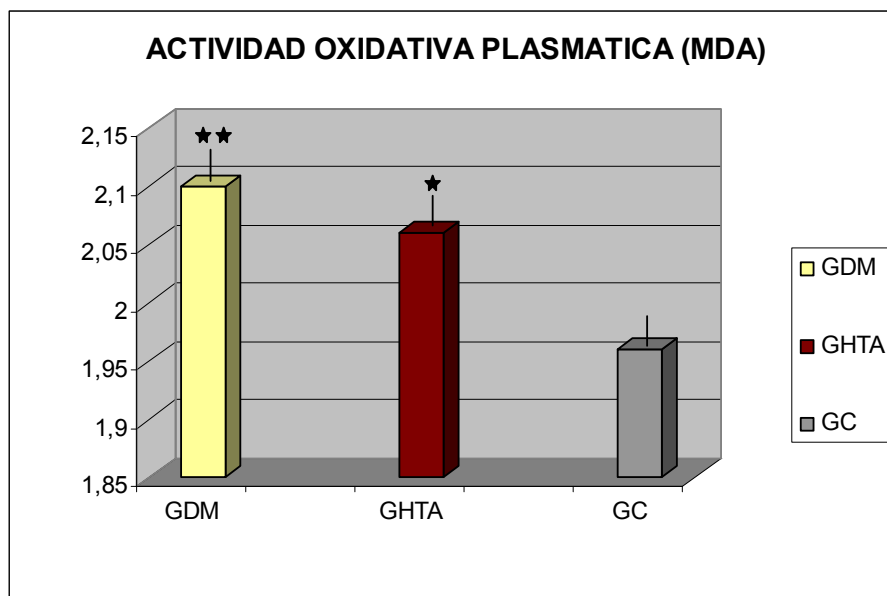


Figura 65. Actividades oxidativas en plasma humano de los 3 grupos de participantes al inicio del estudio (del estudio).

Los resultados son la media \pm desviación estándar de 2-3 medidas por cada individuo.

* indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades: $\mu\text{mol/l}$

Se separaron los individuos con patología (diabéticos e hipertensos) en retinópatas y no retinópatas. No existieron diferencias estadísticamente significativas al principio del estudio entre el estado oxidativo (MDA) y antioxidante (AOXT, SOD) de los pacientes diabéticos e hipertensos tuvieran o no retinopatía, teniendo en cuenta que la duración media del proceso patológico era en ese momento de los pacientes entonces era de $9,8 \pm 6,7$ años en diabéticos y de $6,1 \pm 5,7$ años en los hipertensos. Nótese sin embargo como las medias del estado antioxidantes son mayores en grupos con retinopatía que sin retinopatía y como el MDA es mayor en el grupo de diabéticos retinópatas que en el grupo de diabéticos no retinópatas. Esta tendencia no se cumple en el grupo de hipertensos donde el MDA es mayor en pacientes sin retinopatía. (TABLA)

1999						
	GRD	G no RD	GRD vs G no RD	GRH	G no RH	GRH vs G no RH
AOXT	1,18 ± 0,23	1,21 ± 0,28	0,60	1,18 ± 0,30	1,13 ± 0,29	0,45
MDA	2,13 ± 0,45	2,06 ± 0,37	0,42	2,03 ± 0,32	2,09 ± 0,32	0,44
SOD	214,69 ± 60,71	203,14 ± 58,35	0,38	207,69 ± 60,71	192,14 ± 58,35	0,15
RET	2,27 ± 0,49	-	-	2,11 ± 0,49	-	-

Tabla 33. Comparación al inicio del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos patológicos separados según padecieran o no retinopatía. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Resultados significativos en rojo.

También el grupo de sujetos sanos se subdividió aleatoriamente entre los que tomarían o no el suplemento micronutricional con características antioxidantes. En el análisis estadístico mediante el test “t” de Student no se encontraron diferencias entre la actividad oxidativa y antioxidante al comienzo del estudio (año 1999). Nótese que las medias de los parámetros del estado oxidativo-antioxidante (tabla 34)

1999			
	GC + S	GC sin S	GC + S vs GC sin S
AOXT	1,18 ± 0,23	1,21 ± 0,28	0,09
MDA	2,13 ± 0,45	2,06 ± 0,37	0,28
SOD	214,69 ± 60,71	203,14 ± 58,35	0,69

Tabla 34. Comparación al inicio del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) de los individuos controles según su asignación al grupo que tomaría suplemento vitamínico o no.

Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Por tanto, los subgrupos en los que no se encontró diferencia significativa eran similares al inicio del estudio debiéndose analizar las razones de cualquier posible diferencia al final del mismo en cuanto a la agudeza visual, la tensión arterial diastólica, el grado de retinopatía y los parámetros oxidativos y antioxidantes considerados. Para ver de que forma se podían asociar los parámetros de la bioquímica básica con los niveles oxidativos-antioxidantes y el grado de la retinopatía se realizó un estudio de correlación múltiple entre las distintas variables consideradas, obteniéndose los siguientes resultados en el 1999.

		1999							
		GLUC	HBA1c	COL	HDL	LDL	TRIGL	UREA	CREAT
AOXT	Correlación de Pearson	0,024	-0,023	-0,052	-0,023	-0,17(*)	-0,096	-0,159	0,162
	Sign. (2-colas)	0,692	0,697	0,388	0,788	0,049	0,253	0,061	0,055
MDA	Correlación de Pearson	0,132(*)	0,091	0,254 (**)	-0,009	-0,148	-0,015	0,020	-0,061
	Sign. (2-colas)	0,028	0,133	0,000	0,921	0,088	0,860	0,812	0,478
SOD	Correlación de Pearson	0,007	0,001	-0,072	0,047	-0,059	-0,073	-0,088	0,053
	Sign. (2-colas)	0,912	0,987	0,234	0,589	0,495	0,393	0,304	0,534
RETIN	Correlación de Pearson	0,030	0,000	-0,020	-0,147	0,157	0,061	-0,077	0,044
	Sign. (2-colas)	0,598	0,997	0,727	0,052	0,495	0,284	0,179	0,445

Tabla 35. Correlaciones de Pearson entre los parámetros bioquímicas clásicas y emergentes al comienzo del estudio. * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Grado de retinopatía.

Asimismo se planteó el estudio de correlación entre el grado de retinopatía y los valores de TAD con los niveles de parámetros oxidativos-antioxidantes considerados en el estudio no existiendo resultados significativos, excepto una asociación negativa entre la TAD y la SOD (Tabla 36).

1999		Grado de RETINOPATÍA	TAD
AOXT	Correlación de Pearson	-0,032	-0,009
	Sign. (2-colas)	0,589	0,886
MDA	Correlación de Pearson	0,027	0,079
	Sign. (2-colas)	0,658	0,188
SOD	Correlación de Pearson	-0,051	-0,162**
	Sign. (2-colas)	0,392	0,007

Tabla 36. Correlaciones de Pearson entre los parámetros oxidativos-antioxidantes y el grado de retinopatía y niveles de TAD al comienzo del estudio . * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Resultados significativos en rojo.

No se encontró relación al comienzo del estudio entre el grado de retinopatía y la TAD.

1999		
		Grado de Retinopatía
TAD	Correlación de Pearson	0,026
	Sig. (2-colas)	0,613

Tabla 37. Correlación entre la TAD y el grado de retinopatía al comienzo del estudio. . * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Resultados significativos en rojo.

El cálculo de la correlación al inicio del estudio entre los parámetros del estilo de vida y el grado de retinopatía mostró sólo asociación positiva con la duración de la patología y negativa con el seguimiento del tratamiento médico.

1999			
		SEXO	EDAD
RETINOPATÍA	Correlación de Pearson	0,012	0,047
	Sig. (2-colas)	0,779	0,252

1999								
		DURACION	TTO	DIETA	FUMAR	BEBER	EJERCICIO	ANTECFAM
RETINOPAT	Correlación de Pearson	0,167(**)	-0,11(**)	-0,030	-0,057	0,069	-0,002	0,034
	Sig. (2-colas)	0,001	0,007	0,470	0,170	0,095	0,952	,412

Tablas 38 y 39. Correlación entre parámetros intrínsecos y de estilos de vida de los pacientes al comienzo del estudio. * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Los parámetros considerados son: Retinopatía (RETINOPAT), Duración filiada de la enfermedad de fondo (HTA o DM), Seguimiento de Tratamiento Médico (TTO), Ser fumador (FUMAR) o bebedor (BEBER), realizar ejercicio o poseer antecedentes familiares de DM o HTA. Para consultar el modo de puntuación de los parámetros diríjase a Apéndice 2 de Material y Métodos. Resultados significativos en rojo.

II. RESULTADOS DE LOS GRUPOS Y SUBGRUPOS AL FINAL DEL ESTUDIO (2004)

A partir del momento de su inclusión en este estudio, los participantes fueron revisados anualmente y los datos se supervisaron durante todo el periodo de seguimiento, que ha sido de 5 años. Al final del estudio el total de participantes fue de 490, de los cuales 226 eran varones y 264 mujeres. La edad media de la muestra, considerando el remanente de participantes al final del estudio fue de $53,5 \pm 11,1$ años (rango 30-65 años).

Atendiendo a su patología, los pacientes quedaron distribuidos de la siguiente forma: pacientes con Diabetes Mellitus (n= 179); Grupo 2: Pacientes con Hipertensión Arterial Esencial (n= 157); Grupo 3: Sujetos sanos o grupo control (n= 154). Las características y hábitos de los participantes al final del estudio han sido reflejadas en la tabla 25.

2004										
	Edad (años)	Sexo		Anteced. Familiares	Fumador	Bebedor	Ejercicio Físico	Control Dieta	Control Trat ^a	Duración (años)
		V	M							
GDM (n=179)	58,9 ± 9,5	55,9%	44,1%	62,1%	37,9%	22,9%	37,9%	51,4%	72,1%	13,8 ± 6,0
GHTA (n=157)	58,7 ± 9,6	39,5%	60,5%	41,4%	21,0%	15,3%	36,3%	49,1%	69,4%	10,1 ± 5,7
GC (n=154)	47,2 ± 9,7	41,5%	58,5%	18,2%	26,6%	10,4%	44,2%	-	-	-

Tabla 40. Características generales y hábitos de los individuos al final del seguimiento separados en los tres grupos principales.

Estas características generales (edad, sexo, antecedentes familiares, hábitos de vida, duración del proceso, etc), se presentan a su vez desglosadas en subgrupo, como puede apreciarse en la tabla siguiente.

2004										
	Edad (años)	Sexo		Anteced.	Fumador	Bebedor	Ejercicio Físico	Control Dieta	Control Trat ^a	Duración (años)
		V	M	Familiares						
GRD (n=103)	58,6 ± 10,3	49,5%	50,5%	57,2%	39,8%	26,2%	37,8%	45,6%	66,0%	15,2 ± 8,3
G no RD (n=76)	57,3 ± 8,9	64,4%	35,6%	68,4%	35,5%	18,4%	38,2%	59,2%	80,3%	12,5 ± 5,1
GRH (n=87)	58,6 ± 9,2	41,4%	58,6%	42,5%	21,8%	16,1%	43,7%	52,9%	67,8%	10,6 ± 4,3
G no RH (n=70)	56,5 ± 9,8	37,1%	62,9%	38,5%	20,0%	14,3%	27,1%	44,3%	71,4%	10,5 ± 6,9
GC (n=154)	47,2 ± 9,7	41,5%	58,5%	18,2%	26,6%	10,4%	44,2%	-	-	-

Tabla 41. Características generales y hábitos de los individuos al final del seguimiento separados en los tres grupos principales, separando los patológicos (diabéticos e hipertensos) en retinópatas y no retinópatas.

Por otra parte, los pacientes de dos primeros grupos quedaron según padecieran o no retinopatía diabética [subgrupo 1a de pacientes diabéticos con retinopatía (n=103) y subgrupo 1b de pacientes diabéticos sin retinopatía (n=76)] o retinopatía hipertensiva [subgrupo 1a de pacientes hipertensos con retinopatía (n=87) y subgrupo 1b de pacientes hipertensos sin retinopatía (n=70)].

Se efectuaron las determinaciones bioquímicas al final del estudio, siguiendo la misma pauta de los análisis basales, como se refleja en la tabla 42.

2004								
	Glucemia	HbA1c	Colesterol Total	HDL col	LDL col	Triglicer.	Urea	Creatina
GRD (n=103)	169,34 ± 66,74	7,11 ± 1,83 %	210,87 ± 35,35	55,83 ± 11,98	132,29 ± 35,52	123,66± 82,28	38,39 ± 9,27	0,90 ± 0,20
G no RD (n=76)	180,31 ± 81,46	7,12 ± 1,78 %	201,59 ± 39,95	52,69 ± 13,66	127, 23 ± 27,59	128,31± 65,48	35,44 ± 9,92	0,81 ± 0,09
GRH (n=87)	107,13 ± 40,88	5,19 ± 1,05%	211,15 ± 34,01	53,38 ± 13,26	134,15 ± 23,95	127,50 ± 69,71	38,00 ± 10,15	0,96 ± 0,21
G no RH (n=70)	107,60 ± 23,50	5,16 ± 0,99%	211,70 ± 31,85	58,43 ± 26,74	134,40 ± 32,15	113,89 ± 50,28	37,98 ± 8,12	0,95 ± 0,17
GC (n=154)	116,67 ± 55,59	5,30 ± 1,55%	201,20 ± 33,03	57,70 ± 15,07	123,37 ± 30,79	104,64 ± 62,02	36,44 ± 10,92	0,97 ± 0,19

Tabla 42. Parámetros bioquímicos clásicos de los grupos al final del estudio. Media ± Desviación estándar.

Para evaluar los efectos de la administración del suplemento la distribución de los grupos quedó de la siguiente forma según padecieran o no retinopatía diabética [subgrupo 1a de pacientes diabéticos con retinopatía (n=103) y subgrupo 1b de pacientes diabéticos sin retinopatía (n=76)] o retinopatía hipertensiva [subgrupo 1a de pacientes hipertensos con retinopatía (n=87) y subgrupo 1b de pacientes hipertensos sin retinopatía (n=70)].

	Diabéticos (n=179)		Hipertensos (n=157)		Controles (n=154)
	Con RD (n=103)	Sin RD (n=76)	Con RH (n=87)	Sin RH (n=70)	
Con Supl. Oral	56	36	37	35	66
Sin Supl. Oral	47	40	50	35	88

Tabla 43. Distribución de los paciente según su grupo y según recibiesen el suplemento.

Las características y hábitos de los sujetos que permanecieron hasta el final del estudio, en relación a la presencia o no de retinopatía y a la toma o no de suplementos con micronutrientes, se muestran en la tabla 44.

2004										
	Edad (años)	Sexo		Anteced. Familiares	Fumador	Bebedor	Ejercicio Físico	Control Dieta	Control Trat ^a	Duración (años)
		V	M							
GRD + S (n=56)	58,5 ± 9,7	50,9%	49,1%	71,4%	44,6%	30,3%	46,4%	50,0%	71,4%	14,4 ± 6,3
GRD sin S (n=47)	57,2 ± 11,3	48,9%	51,1%	87,3%	28,6%	17,8%	23,2%	33,9%	50,0%	15,0 ± 7,3
G noRD+S (n=36)	58,6 ± 7,4	66,6%	33,4%	75,7%	41,6%	25,0%	33,3%	69,4%	75,0%	10,8 ± 6,6
G noRD sin S (n=40)	57,7 ± 9,6	62,5%	37,5%	60,0%	30,0%	12,5%	42,5%	50,0%	85,0%	13,2 ± 5,6
GRH + S (n=37)	58,8 ± 9,3	43,2%	56,8%	48,6%	29,7%	21,6%	51,3%	67,5%	70,3%	10,3 ± 5,9
GRH sin S (n=50)	58,2 ± 9,2	42,0%	58,0%	40,0%	22,5%	12,0%	40,0%	46,0%	70,0%	8,9 ± 5,1
G noRH + S (n=35)	56,2 ± 10,1	28,6%	71,4%	57,1%	20,0%	11,4%	40,0%	54,3%	82,8%	9,4 ± 5,2
G noRHsin S (n=35)	55,7 ± 9,7	45,7%	54,3%	22,8%	20,0%	17,1%	14,3%	34,3%	60,0%	9,5 ± 5,8
GC + S (n=66)	49,1 ± 10,9	37,8%	82,2%	22,7%	27,3%	12,1%	62,1%	-	-	-
GC sin S (n=88)	46,5 ± 10,5	44,3%	55,7%	14,7%	26,1%	9,1%	31,8%			

Tabla 44. Hábitos de vida de los pacientes del estudio al principio del mismo divididos en los correspondientes subgrupos. Media ± Desviación Estándar

A la muestra de participantes que concluyeron el estudio se les realizó el examen oftalmológico estandarizado, según la descripción del apartado material y métodos y en las mismas condiciones que se realizó al comienzo del trabajo. Los resultados para los tres grupos principales se expresan como media ± DE de la agudeza visual para el ojo derecho y ojo izquierdo y la tensión ocular del ojo derecho y ojo izquierdo, en mm de Hg y quedan reflejados en la tabla 45.

2004				
	AVOD	AVOI	PIO OD	PIO OI
GDM (n=179)	0,92 ± 0,21	0,91 ± 0,18	16,33 ± 2,65	16,60 ± 2,61
GHTA (n=157)	0,91 ± 0,17	0,95 ± 0,61	15,54 ± 2,20	15,66 ± 2,22
GC (n=154)	1,03 ± 1,01	1,08 ± 1,23	15,14 ± 1,78	15,17 ± 2,18

Tabla 45. Agudeza visual y Presión intraocular (PIO) al final del estudio en los grupos principales.

En la Figura 66 se muestran las agudezas visuales entre grupos en relación a la retinopatía, al final del estudio, lo que muestra el seguimiento de los participantes durante 5 años.

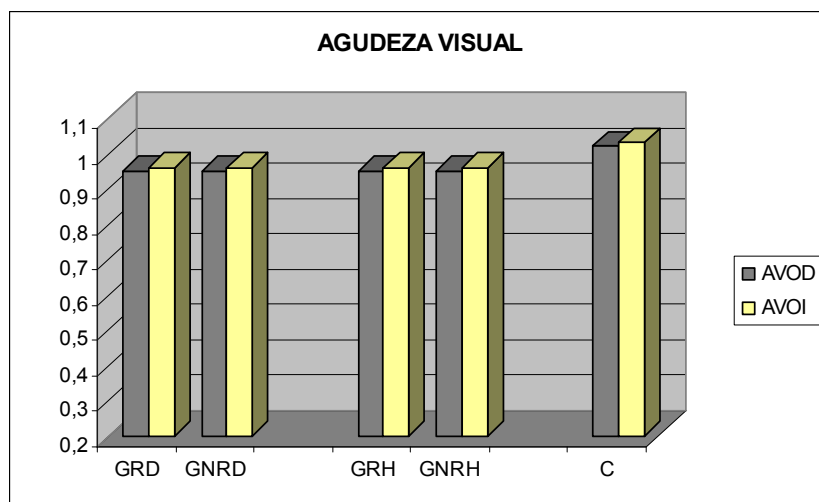


Figura 66. Agudeza visual individuos al comienzo del estudio. GRD=Grupo con retinopatía diabética. GNRD=Grupo sin retinopatía diabética. GRH= Grupo con retinopatía hipertensiva. GNRH= Grupo sin retinopatía hipertensiva. C =Controles.

La Agudeza Visual Media con la Mejor Corrección (AVMMC) no fue diferente entre ninguno de los tres grandes grupos al final del estudio, pero la significación está próxima en la comparación del Grupo de diabéticos y control.

2004						
	GDM	GHTA	GC	GDM vs GHTA	GDM vs GC	GHTA vs GC
AVMMC	0,90 ± 0,20	0,91 ± 0,18	1,03 ± 0,99	0,51	0,09	0,23

Tabla 46. Comparación de la AVMMC de individuos diabéticos, hipertensos y controles. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

Llama la atención, sin embargo, que el grupo afectado de retinopatía diabética presenta una AVMMC menor que el grupo de diabéticos sin retinopatía tras los cinco años de seguimiento. Esta diferencia de agudeza visual no se observa, sin embargo, entre individuos hipertensos con y sin retinopatía.

2004						
	GRD	G no RD	GRD vs G no RD	GRH	G no RH	GRH vs G no RH
AVMMC	0,87 ± 0,21	0,93 ± 0,19	0,04	0,91 ± 0,20	0,93 ± 0,14	0,51

Tabla 47. Comparación de la AVMMC de individuos diabéticos (con y sin retinopatía) e hipertensos (con y sin retinopatía) al final del estudio. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

En los diabéticos con retinopatía al final del estudio no varió la AVMMC según se administrara o no el suplemento. Igual sucedió en el subgrupo de diabéticos sin retinopatía.

2004						
	GRD+S	GRD sin S	GRD+S vs GRD sin S	G no RD + S	G no RD sin S	GnoRD+S vs GnoRD sin S
AVMMC	0,87± 0,10	0,87 ± 0,21	0,89	0,96 ± 0,17	0,94 ± 0,21	0,80

Tabla 48. Comparación de la AVMMC de individuos diabéticos (con y sin retinopatía) al final del estudio según se les administrara o no el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

De forma similar los individuos con hipertensión arterial con y sin retinopatía no mostraron cambios de agudeza visual según se les administrara o no el suplemento, aunque la tendencia es que los pacientes con suplemento tenían mejor AVMMC que los que no la tenían de forma aproximada a la significación.

2004						
	GRH+S	GRH sin S	GRH+S vs GRH sin S	G no RH + S	G no RH sin S	GnoRH+S vs GnoRH sin S
AVMMC	1.12 ± 1,20	0,86 ± 0,23	0,15	0,93± 0,15	0,92 ± 0,14	0,13

Tabla 49. Comparación de la AVMMC de individuos hipertensos (con y sin retinopatía) al final del estudio según se les administrara o no el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

En los individuos del grupo control tampoco se observaron diferencias de la AVMMC según se les administrase o no el suplemento. Se aprecia una tendencia similar a los pacientes hipertensos, con mejor AVMMC en el grupo con suplementación.

2004			
	GC + S	GC sin S	GC + S vs GC sin S
AVMMC	1,08 ± 1,21	0,96± 0,14	0,29

Tabla 50. Comparación de la AVMMC de individuos controles al final del estudio según se les administrara o no el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

En cuanto a las cifras de la presión sanguínea diastólica se mantuvieron las diferencias entre los grupos de hipertensos (mayor presión diastólica) y los otros dos grupos. Entre los grupos diabéticos y controles no se observaron diferencias significativas.

2004						
	GDM	GHTA	GC	GDM vs GHTA	GDM vs GC	GHTA vs GC
TAD (mm Hg)	77,22 ± 11,19	82,19 ± 12,17	78,43 ± 11,21	<0,01	0,52	<0,01

Tabla 51. Comparación de la TAD de individuos diabéticos, hipertensos y controles al final del estudio. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Resultados significativos en rojo.

Llama especialmente la atención que la TAD se encontró mayor en pacientes diabéticos con retinopatía que sin retinopatía al final del estudio. Recuérdese, como se expuso anteriormente, que la AVMMC también era menor en el grupo de diabéticos con retinopatía que sin retinopatía al final del estudio.

En cambio, los pacientes hipertensos con retinopatía presentaban una TAD más alta que los no retinópatas de forma no estadísticamente significativa.

2004						
	GRD	G no RD	p	GRH	G no RH	p
TAD (mm Hg)	0,87 ± 0,21	0,93 ± 0,19	0,04	0,91 ± 0,20	0,93 ± 0,14	0,51

Tabla 52. Comparación de la TAD de individuos diabéticos, hipertensos y controles. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Al desglosar los individuos hipertensos entre aquellos que padecían o no retinopatía, se observó que no existió diferencia entre los grupos a los que se administró el tratamiento y a los que no.

2004						
	GRD+S	GRD sin S	P	G no RD + S	G no RD sin S	P
TAD	78,27± 12,64	79,29±36,58	0,47	76,03 ± 10,29	74,74 ± 10,57	0,94

Tabla 53. Comparación al final del estudio de la TAD de individuos diabéticos con y sin retinopatía según recibieran o no el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

De modo similar se comportaron los pacientes hipertensos subdivididos en los subgrupos pertinentes (Tabla 54).

2004						
	GRH + S	GRH sin S	P	G no RH + S	G no RH sin S	P
TAD	80,89 ± 9,96	85,38 ± 12,92	0,94	79 ± 11,26	83,75± 10,62	0,80

Tabla 54. Comparación al final del estudio de la TAD de individuos hipertenso con y sin retinopatía según recibieran o no el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Los pacientes del grupo control tampoco mostraron diferencias en TAD según recibieran o no el suplemento.

2004			
	GC + S	GC sin S	P
TAD	77,93± 10,80	78,12 ± 11,78	0,43

Tabla 55. Comparación al final del estudio de la TAD de individuos controles que recibieron el suplemento (GC+S) y los que no (GC sin S).

Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo al final del estudio no se apreciaron diferencias significativas entre los tres grupos principales.

2004						
	GDM	GHTA	GC	GDM vs GHTA	GDM vs GC	GHTA vs GC
AOXT	1,12 ± 0,25	1,04 ± 0,33	1,09 ± 0,39	0,19	0,66	0,40
MDA	1,18 ± 0,42	1,15 ± 0,32	1,15 ± 0,35	0,67	0,61	0,94
SOD	126,83 ± 29,65	126,77 ± 25,57	124,59 ± 31,15	0,98	0,65	0,68
RETINO-PATÍA	2,58 ± 0,71	2,18 ± 0,60	-	-	-	-

Tabla 56. Comparación al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos patológicos separados según padecieran o no retinopatía.

Considerando los grupos patológicos en pacientes con y sin retinopatía no aparecieron diferencias significativas en los parámetros emergentes considerados.

2004						
	GRD	G no RD	GRD vs G no RD	GRH	GH no R	GRH vs GH no R
AOXT	1,11 ± 0,41	1,12 ± 0,30	0,76	1,07 ± 0,34	1,03 ± 0,29	0,60
MDA	1,19 ± 0,48	1,17 ± 0,80	0,90	1,12 ± 0,28	1,30 ± 0,46	0,06
SOD	128,42 ± 44,80	123,85 ± 14,84	0,51	125,42 ± 23,79	135,85 ± 58,35	0,17
RETINO PATÍA	2,58 ± 0,74	-	-	2,18 ± 0,44	-	-

Tabla 57. Comparación al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos diabéticos e hipertensos separados según padecieran o no retinopatía. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Sin embargo, en una nueva subdivisión teniendo en cuenta la suplementación con micronutrientes en el grupo de diabéticos con retinopatía, la actividad oxidativa (MDA) es significativamente menor y la actividad antioxidante (AOXT) es significativamente mayor que en el grupo que recibió la suplementación. A su vez los

pacientes diabéticos sin retinopatía mostraban un nivel antioxidante (AOXT) mayor en el grupo con suplementación. (Tabla 58).

2004						
	GRD+S	GRD sin S	p	G no RD + S	G no RD sin S	p
AOXT	1,17 ± 0,47	1,04 ± 0,32	<0,01	1,17± 0,29	1,12 ± 0,31	0,04
MDA	1,30 ± 0,57	2,25± 0, 0,30	<0,01	1,21 ± 0,30	1,25 ± 0,17	0,78
SOD	133,21 ± 43,43	122,63 ± 20,56	0,83	122,05 ± 16,61	125,65 ± 13,20	0,38
RETINO PATIA	2,53 ± 0,73	2,65 ± 0,76	0,33	-	-	-

Tabla 58. Comparación al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos diabéticos (retinópatas y no retinópatas) separados según recibieran o no el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Significación estadística en rojo.

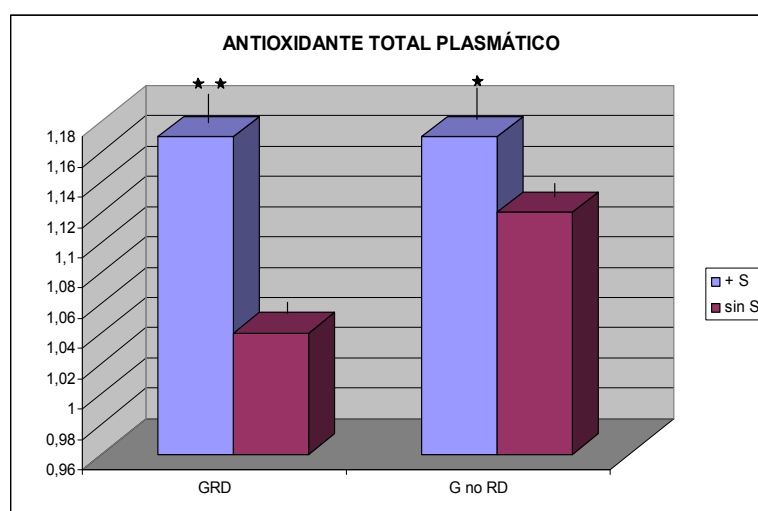


Figura 67. Antioxidante total plasmático en diabéticos con y sin retinopatía según recibiesen o no suplemento. Los resultados son la media ± desviación estándar de 2-3 medidas por cada individuo. *indica nivel de significación ≤ al 0,05 y ** indica nivel de significación ≤ al 0,01. Unidades mmol/l.

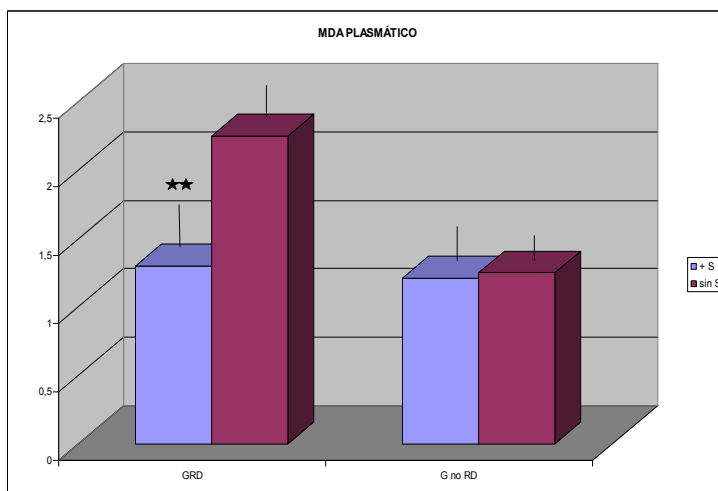


Figura 68. MDA plasmático en diabéticos con y sin retinopatía según recibiesen o no suplemento. Los resultados son la media \pm desviación estándar de 2-3 medidas por cada individuo. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01.

Unidades: $\mu\text{mol/l}$. Unidades $\mu\text{mol/l}$

Los grupos de individuos hipertensos con retinopatía y sin retinopatía no muestran diferencias al final del estudio en cuanto a la actividad oxidativa y antioxidante, aunque tomen o no tomen el suplemento.

2004						
	GRH + S	GRH sin S	P	G no RH + S	G no RH sin S	P
AOXT	1,01 \pm 0,80	1,14 \pm 0,36	0,85	0,94 \pm 0,29	1,26 \pm 0,35	0,42
MDA	1,13 \pm 0,30	1,11 \pm 0,27	0,28	1,25 \pm 0,51	1,43 \pm 0,30	0,24
SOD	121,35 \pm 24,20	129,31 \pm 23,31	0,12	130,21 \pm 33,29	150,89 \pm 43,83	0,08
RETINO PATÍA	2,18 \pm 0,66	2,18 \pm 0,44	0,98	-	-	-

Tabla 59. Comparación al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos hipertensos (retinópatas y no retinópatas) separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes.

Por otra parte, los sujetos sanos que ingieren el suplemento micronutricional presentaron una actividad antioxidante mayor que los sujetos sanos que no lo toman (objetivable en la analítica en plasma).

2004			
	GC + S	GC sin S	p
AOX	1,11± 0,40	1,07± 0,35	0,04
MDA	1,17 ± 0,36	1,13 ± 0,36	0,60
SOD	126,42 ± 37,37	122,14 ± 1,92	0,92

Tabla 60. Comparación al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos controles separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras independientes. Significación estadística en rojo.

Al igual que en el momento inicial del estudio se realizó un análisis de correlación múltiple para ver si existía asociación entre parámetros bioquímicos clásicos, grado de retinopatía y parámetros emergentes.

		2004							
		GLUC	HBA1c	COL	HDL	LDL	TRIGL	UREA	CREAT
AOXT	Correlación de Pearson	0,177(*)	0,114	0,185(*)	-0,071	0,231 (**)	0,131	0,083	-0,076
	Sign. (2-colas)	0,015	0,117	0,011	0,339	0,002	0,072	0,256	0,298
MDA	Correlación de Pearson	0,097	0,008	0,123	0,128	0,057	0,030	-0,055	0,016
	Sign. (2-colas)	0,185	0,907	0,093	0,087	0,448	0,686	0,452	0,824
SOD	Correlación de Pearson	0,091	0,030	0,149(*)	,257(**)	0,044	0,026	-0,010	0,046
	Sign. (2-colas)	0,210	0,677	0,041	0,000	0,558	0,719	0,892	0,527
RET	Correlación de Pearson	0,172(**)	0,274 (**)	0,034	-0,053	0,062	0,036	0,034	-0,046
	Sign. (2-colas)	0,001	0,000	0,531	0,339	0,256	0,510	0,536	0,400

Tabla 61. Correlaciones de Pearson entre los parámetros bioquímicos clásicas y emergentes al final del estudio. * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Resultados significativos en rojo. RETIN = Grado de retinopatía.

Como se aprecia en tablas de 1999 y 2004 las correlaciones significativas son escasas, de baja cuantía (todos los coeficientes de correlación fueron $< 0,3$) e inconstantes (las correlaciones no se repetían al principio -1999- y al final del estudio -2004).

Por otro lado se valoró la posible asociación de los niveles de parámetros oxidativos-antioxidantes y el grado de retinopatía y los niveles de TAD en 2004 , no apareciendo una asociación significativa de importancia como sucedió en los resultados de 1999.

2004		Grado de RETINOPATÍA	TAD
AOXT	Correlación de Pearson	-0,042	-0,080
	Sign. (2-colas)	0,543	0,273
MDA	Correlación de Pearson	0,054	-0,057
	Sign. (2-colas)	0,439	0,428
SOD	Correlación de Pearson	-0,057	-0,102
	Sign. (2-colas)	0,408	0,159

Tabla 62. Correlaciones de Pearson entre los parámetros oxidativos-antioxidantes con el grado de retinopatía y los valores de TAD al final del estudio del estudio . * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Resultados significativos en rojo.

A diferencia de los resultados del 1999-2000, al final del estudio se encontró una correlación positiva al final del estudio entre el grado de retinopatía y la Tensión arterial diastólica.

2004		
		Grado de Retinopatía
TAD	Correlación de Pearson	0,136 (*)
	Sign. (2-colas)	0,033

Tabla 63. Correlación entre la TAD y el grado de retinopatía al comienzo del estudio. . * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Resultados significativos en rojo.

Al final del estudio, el cálculo de la correlación entre los parámetros del estilo de vida y el grado de retinopatía mostró asociación positiva con la duración de la patología y con la edad del sujeto.

2004			
		SEXO	EDAD
RETINOPAT	Correlación de Pearson	0,012	0,238(**)
	Sig. (2-colas)	0,794	0,000

2004								
		DURACION	TTO	DIETA	FUMAR	BEBER	EJERCICIO	ANTECFAM
RETINOPAT	Correlación de Pearson	0,157(**)	0,378	0,220	-0,047	-0,052	0,028	0,096
	Sig. (2-colas)	0,006	0,543	0,234	0,337	0,291	0,562	0,056

Tablas 64 y 65. Correlación entre parámetros intrínsecos y de estilos de vida de los pacientes al final del estudio. * La correlación es significativa al nivel de 0.05 (2-colas). ** La correlación es significativa al nivel de 0.01 level (2-colas). Los parámetros considerados son: Retinopatía (RETINOPAT), Duración filiada de la enfermedad de fondo (HTA o DM), Seguimiento de Tratamiento Médico (TTO), Ser fumador (FUMAR) o bebedor (BEBER), realizar ejercicio o poseer antecedentes familiares de DM o HTA. Para consultar el modo de puntuación de los parámetros diríjase a Apéndice 2 de Material y Métodos. Resultados significativos en rojo.

III. COMPARACIÓN DE RESULTADOS CLÍNICO-ANALÍTICOS AL INICIO Y FINAL DEL ESTUDIO.

Los resultados de la analítica convencional subdivididos en subgrupos se pueden observar en la tabla siguiente

1999-2004										
Grupo	Año		Glucemia	HbA1c	Colesterol	HDL	LDL	Triglicéridos	Urea	Creatinina
GRD+S	1999	M	180,95	7,51	201,71	54,68	128,98	122,50	37,07	0,89
		DS	70,99	1,87	36,20	10,93	34,58	83,33	8,90	0,20
	2004	M	166,63	7,06	211,70	55,49	132,85	123,72	36,96	0,87
		DS	64,30	1,75	33,06	11,78	28,50	70,92	8,41	0,19
GnoRD sin S	1999	M	197,09	8,06	198,59	50,57	122,60	116,86	41,86	1,43
		DS	69,72	1,85	40,51	10,21	33,43	65,93	9,74	2,14
	2004	M	170,62	7,09	209,40	56,35	131,14	122,26	39,90	0,93
		DS	70,13	1,96	37,83	12,22	42,01	93,56	9,90	0,20
GnoRD +S	1999	M	188,08	7,43	202,54	54,79	123,87	140,83	37,79	0,95
		DS	60,35	1,62	44,47	19,24	37,54	98,77	9,78	0,20
	2004	M	174,79	6,85	196,79	52,25	129,18	144,08	35,88	0,96
		DS	82,27	1,78	40,75	11,66	31,07	74,32	9,69	0,20
GnoRD sin S	1999	M	158,13	7,06	206,87	51,74	131,98	110,78	40,30	0,95
		DS	70,67	1,24	40,20	13,22	28,55	62,45	7,15	0,14
	2004	M	185,60	7,39	206,20	53,12	125,36	112,56	35,03	2,79
		DS	81,98	1,76	39,43	15,56	24,27	52,67	10,32	9,62
GRH+S	1999	M	112,29	5,94	206,86	53,56	133,62	119,60	38,34	0,96
		DS	47,46	4,41	31,59	15,35	22,06	49,21	8,06	0,20
	2004	M	105,52	5,16	208,67	52,31	132,96	132,26	37,78	0,99
		DS	34,13	0,93	31,98	13,59	19,57	58,40	11,33	0,19
GRH sin S	1999	M	108,42	5,04	211,00	51,13	132,69	139,79	38,29	0,97
		DS	24,68	0,82	42,81	10,89	31,13	85,90	10,41	0,22
	2004	M	111,68	5,23	212,32	54,36	134,19	123,32	37,76	0,94
		DS	51,07	1,14	35,74	13,63	27,13	77,07	9,47	0,20
GnoRH +S	1999	M	104,94	4,99	207,42	56,56	124,94	100,64	38,33	0,94
		DS	22,54	0,77	30,62	15,32	33,95	44,50	7,56	0,16
	2004	M	101,46	5,01	200,33	54,39	126,19	106,58	36,83	0,90
		DS	13,33	0,74	22,95	14,83	21,27	41,04	8,67	0,17
GnoRH sin S	1999	M	110,36	5,19	212,43	70,00	129,17	126,57	41,43	1,00
		DS	31,69	1,19	37,57	44,37	36,50	57,08	6,73	0,16
	2004	M	114,00	5,30	223,57	62,86	143,38	121,52	39,17	1,03
		DS	29,74	1,18	35,81	35,43	39,51	58,35	7,49	0,17
C+S	1999	M	95,00	4,91	206,56	60,06	130,15	98,11	37,59	0,91
		DS	10,72	1,20	45,91	15,28	36,41	61,17	8,80	0,14
	2004	M	118,88	5,51	208,92	59,50	127,53	111,30	37,08	0,93
		DS	61,62	1,62	32,45	15,27	30,31	66,23	8,98	0,13
C sin S	1999	M	96,51	4,64	195,24	56,90	122,63	110,14	35,00	0,90
		DS	9,88	0,58	38,79	12,26	34,55	71,61	8,83	0,15
	2004	M	114,26	5,06	192,80	55,63	118,60	97,39	35,66	0,88
		DS	48,75	1,43	31,89	14,75	31,00	56,93	12,96	0,15

Tabla 66. Tabla resumen de bioquímica en 1999 y 2004 (M=media; DS= desviación estándar)

Realizando la comparación entre los resultados del año 1999 y 2004 por subgrupos prestando especial atención al efecto de la suplementación con micronutrientes obtenemos los siguientes resultados:

1. Diabéticos con retinopatía.

Tras los 5 años de seguimiento en pacientes diabéticos retinópatas con suplementación se conserva el nivel de antioxidante total mientras que en el grupo sin suplementación desciende de forma significativa. Respecto al MDA, el grupo de pacientes diabéticos retinópatas con suplementación muestran un descenso de los niveles oxidativos (MDA). En cambio, en individuos diabéticos retinópatas no sometidos a suplementación no solamente no desciende sino que aumenta el estado oxidativo (MDA).

Por otro lado los niveles de SOD disminuyen en ambos subgrupos, pero el descenso es más del doble en pacientes sin suplementación (diferencia de SOD entre 1999 y 2004 de 51,58 unidades/ml en el grupo de diabéticos retinópatas con suplementación y de 112,13 unidades/ml en el grupo de diabéticos retinópatas sin suplementación).

Es importante resaltar que el grado de retinopatía no varía en el grupo de individuos diabéticos retinópatas sometidos a administración de suplemento mientras que sí evoluciona en el grupo de pacientes diabéticos retinópatas que no recibieron suplementación (Figuras 69 y 70).

1999- 2004						
DIABETICOS CON RETINOPATIA						
	GRD + S		P	GRD sin S		P
	1999	2004		1999	2004	
AOXT	1,15 ± 0,26	1,17± 0,47	0,79	1,24 ± 0,19	1,04 ± 0,32	0,02
MDA	2,21± 0,49	1,30± 0,57	<0,01	2,03 ± 0,28	2,25± 0, 0,30	<0,01
SOD	184,79 ± 45,68	133,21± 43,43	<0,01	234,76 ± 73,02	122,63 ± 20,56	<0,01
RETINO PATÍA	2,29± 0,54	2,53 ± 0,73	0,08	2,26 ± 0,44	2,65 ± 0,76	<0,01

Tabla 67. Comparación al principio y al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos diabéticos con retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.



Figura 69. Retinopatía diabética no proliferante leve en paciente sometido a suplementación micronutricional que no cambia en el seguimiento a 5 años. La agudeza visual del paciente es de 1 al principio y al final del estudio en ojo izquierdo. Los niveles de MDA/TBARS pasaron de 1,79 a 1,05 $\mu\text{mol/l}$. El AOXT cambió de 1,21 a 1,26 mmol/l y la SOD de 196 a 157 U/ml al final del seguimiento. La hemoglobina glicosilada era de 7,3% en la determinación de 1999 y de 7,6% en la

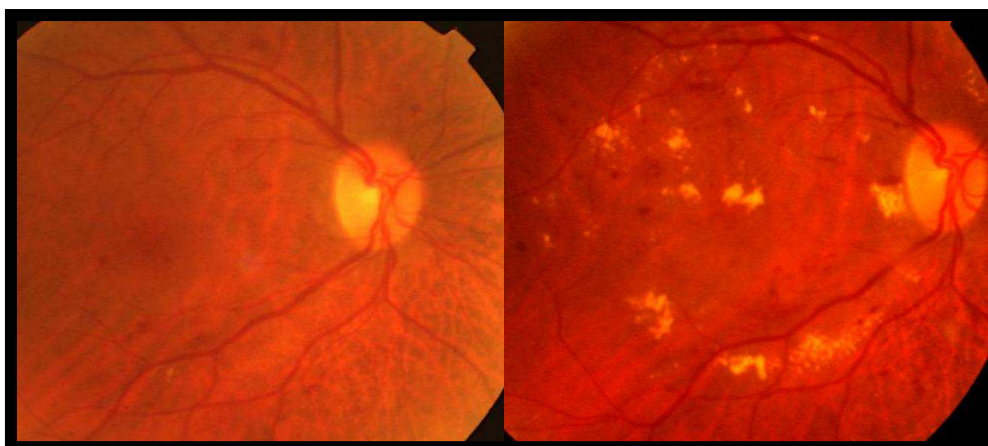


Figura 70. Retinopatía diabética no proliferante moderada en paciente no sometido a suplementación micronutricional que pasó a forma severa a los 5 años. La agudeza visual del paciente en el ojo derecho pasó de 1 a 0,5. Los niveles de MDA/TBARS pasaron de 1,76 a 3,25 $\mu\text{mol/l}$. El AOXT cambió de 1,31 a 1,12 mmol/l y la SOD de 199 a 126 U/ml al final del seguimiento. La hemoglobina glicosilada era de 7,8% en la determinación de 1999 y de 8,9% en la de 2004.

Respecto a la agudeza visual no existió variación en los subgrupos (suplementación o no) entre el principio y el final del estudio.

1999- 2004						
DIABETICOS CON RETINOPATIA						
	GRD+S			GRD sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
AVMMC	0,91 \pm 0,20	0,87 \pm 0,10	0,15	0,88 \pm 0,23	0,87 \pm 0,21	0,90

Tabla 68. Comparación al principio y al final del estudio de la agudeza visual media con la mejor corrección (AVMMC) de los individuos diabéticos con retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

Asimismo tampoco se observó cambio en la Tensión arterial diastólica al principio y final del estudio en este subgrupo.

1999- 2004						
DIABETICOS CON RETINOPATIA						
	GRD+S			GRD sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
TAD	75,83 ± 2,77	78,27± 2,64	0,34	76,49± 12,79	79,29± 6,58	0,29

Tabla 69. Comparación al principio y al final del estudio de la Tensión Arterial Diastólica (TAD) de los individuos diabéticos con retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

2. Diabéticos sin retinopatía.

En los pacientes diabéticos sin retinopatía, tanto si consumieron o no el suplemento, se observa un mantenimiento de los niveles de antioxidante total aunque en los que no recibieron el suplemento disminuyó sin alcanzar significación estadística.

El nivel oxidante descendió en los dos subgrupos considerados pero aproximadamente un descendió un 30% más en el grupo al que se le administró el suplemento (diferencia de MDA entre 1999 y 2004 de 0,94 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de diabéticos no retinópatas con suplementación y de 0,68 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de diabéticos no retinópatas sin suplementación).

El nivel de SOD también descendió en ambos subgrupos pero algo más de un 25% menos en individuos con suplementación (diferencia de SOD entre 1999 y 2004 de 69,82 unidades/ml en el grupo de diabéticos no retinópatas con suplementación y de 94,03 unidades/ml en el grupo de diabéticos no retinópatas sin suplementación).

1999- 2004						
DIABETICOS sin RETINOPATIA						
	GDnoRD+S			GD noR sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
AOXT	1,15 ± 0,24	1,17± 0,29	0,84	1,31± 0,32	1,12 ± 0,31	0,10
MDA	2,15± 0,30	1,21 ± 0,30	<0,01	1,93± 0,43	1,25 ± 0,17	<0,01
SOD	191,87 ± 63,55	122,05 ± 16,61	<0,01	219,68± 46,97	125,65 ± 13,20	<0,01

Tabla 70. Comparación al principio y al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) individuos diabéticos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

De forma similar a lo que ocurre en diabéticos con retinopatía en los subgrupos de diabéticos sin retinopatía no existe cambio entre la agudeza visual al inicio y al final del estudio.

1999- 2004						
DIABETICOS sin RETINOPATIA						
	GDnoRD+S			GD noR sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
AVMMC	0,91± 0,20	0,96 ± 0,17	0,73	0,91± 0,19	0,92 ± 0,20	0,78

Tabla 71. Comparación al principio y al final del estudio de la AVMMC en individuos diabéticos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

Tampoco existió diferencia entre la TAD al principio y al final del estudio en diabéticos sin retinopatía.

1999- 2004						
DIABETICOS sin RETINOPATIA						
	GDnoRD+S			GD noR sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
TAD	76,86± 3,07	76,03 ± 0,29	0,75	75,44± 0,57	74,74 ± 0,57	0,75

Tabla 72. Comparación al principio y al final del estudio de la AVMMC en individuos diabéticos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

3. Comparación Global en pacientes diabéticos (con y sin retinopatía).

Resumiendo se observa una conservación de los niveles de antioxidante plasmático en diabéticos con y sin retinopatía que recibieron suplemento. Igualmente los pacientes diabéticos sin retinopatía no mostraron un cambio significativo en sus niveles de antioxidante. Por el contrario los diabéticos con retinopatía y sin retinopatía sometidos a suplementación mostraron una disminución de los niveles antioxidantes plasmáticos.

Además en el grupo de pacientes diabéticos con retinopatía y que no ingirieron el suplemento hay una disminución significativa de la actividad antioxidante total entre los años 1999 y 2004, a diferencia del grupo con suplemento.

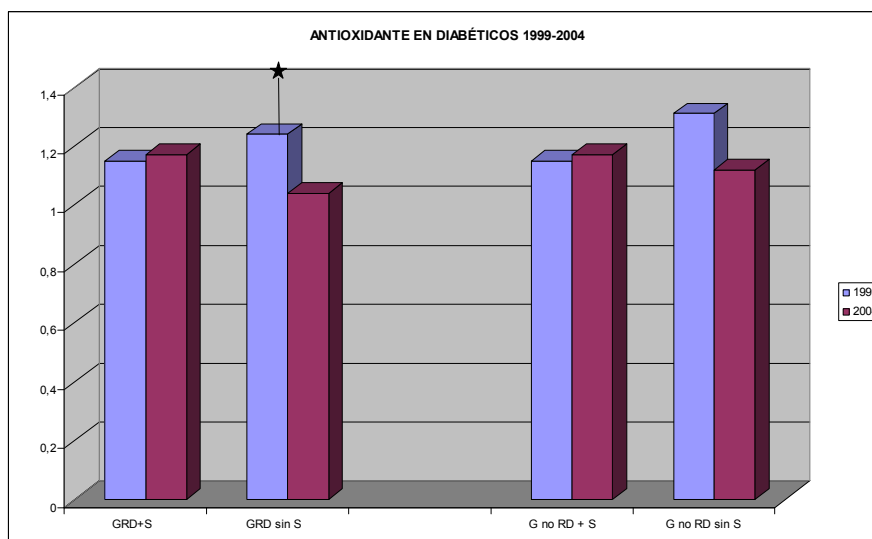


Figura 71. Comparación al inicio y al final del estudio del estado antioxidante(AOXT) de los individuos diabéticos separados en subgrupos según padeciesen o no retinopatía y según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades mmol/l

Podemos observar también como disminuye la actividad oxidativa en los grupos de diabéticos con suplementación, fueran o no retinópatas. En pacientes diabéticos retinópatas que no recibieron suplementación se aprecia un aumento significativo de MDA plasmático. El MDA disminuye de forma significativa a los 5 años en los diabéticos que no padecen retinopatía y tomando o no tomando el Suplemento. Sin embargo el descenso es notablemente mayor en el subgrupo que toma el suplemento.

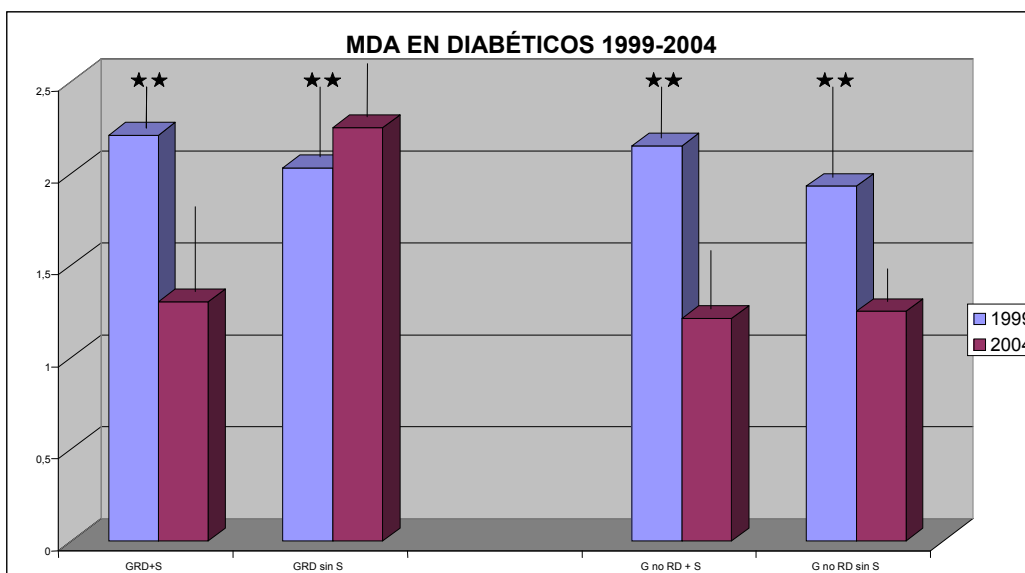


Figura 72. Comparación al inicio y al final del estudio del estado oxidativo (MDA) de los individuos diabéticos separados en subgrupos según padeciesen o no retinopatía y según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades μ mol/l

La actividad SOD disminuyó en todos los grupos pero en mayor grado en los pacientes que no tomaban el suplemento.

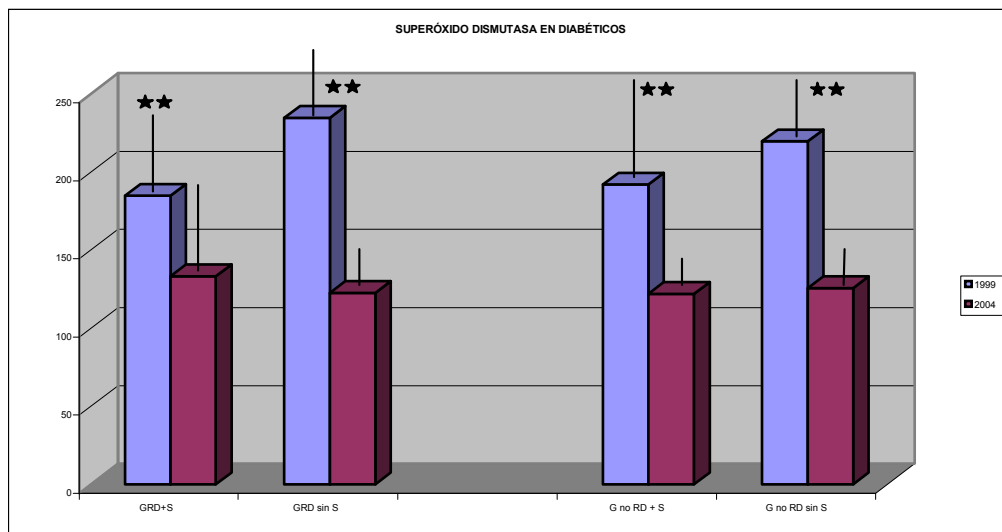


Figura 73. Comparación al inicio y al final del estudio de la Superóxido dismutasa de los individuos diabéticos separados en subgrupos según padeciesen o no retinopatía y según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades /ml.

Por otra parte cabe destacar que ni en el grupo de diabéticos con retinopatía ni en el grupo de diabéticos sin retinopatía el hecho de la suplementación cambió la agudeza visual media mejor corregida ni la tensión arterial diastólica.

4. Hipertensos con retinopatía.

Respecto al antioxidante total se mantuvo tanto en el grupo de hipertensos retinópatas que tomó suplementación como en el que no.

El estado oxidativo (MDA) descendió en hipertensos retinópatas recibieran o no la suplementación, pero descendió algo más en los que recibieron suplemento que los que no lo recibieron (diferencia de MDA entre 1999 y 2004 de 1,06 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de hipertensos retinópatas con suplementación y de 0,99 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de hipertensos retinópatas sin suplementación).

Asimismo la SOD disminuyó en ambos grupos considerados de forma similar. Cabe destacar la progresión de la retinopatía en pacientes que no tomaron el suplemento, mientras que no progresó en pacientes que sí lo tomaron (Figura 74).

1999- 2004						
HIPERTENSOS CON RETINOPATIA						
	GRH + S		P	GRH sin S		P
	1999	2004		1999	2004	
AOXT	1,17± 0,34	1,01 ± 0,80	0,12	1,20±0,24	1,14 ± 0,36	0,61
MDA	2,19± 0,29	1,13 ± 0,30	<0,01	2,10± 0,43	1,11 ± 0,27	<0,01
SOD	204,63± 52,23	121,35 ± 24,20	<0,01	211,49± 41,56	129,31 ± 23,31	<0,01
RETINO-PATÍA	2,17 ±0,48	2,18 ± 0,66	0,86	2,05 ± 0,21	2,18 ± 0,44	0,04

Tabla 73. Comparación al principio y al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante (AOXT, SOD) y grado de retinopatía de los individuos hipertensos con retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.



Figura 74. Retinopatía hipertensiva al principio (leve) y al final del seguimiento (severa) en un individuo no sometido a suplementación micronutricional. La agudeza visual del paciente en el ojo derecho pasó de 1 a 0,7. Los niveles de MDA/TBARS pasaron de 1,38 a 2,76 $\mu\text{mol/l}$. El AOXT cambió de 1,27 a 1,19 mmol/l y la SOD de 216 a 114 U/ml al final del seguimiento. La TAD era de 85 mmHg en la determinación de 1999 y de 93 mmHg en la de 2004.

Llama especialmente la atención que en los hipertensos con retinopatía que la agudeza visual media mejor corregida se mantuvo (incluso aumentó de forma estadísticamente no significativa) en el subgrupo sometido a suplementación mientras disminuyó en el subgrupo no sometido a la misma.

1999- 2004						
HIPERTENSOS CON RETINOPATIA						
	GRH + S		P	GRH sin S		P
	1999	2004		1999	2004	
AVMMC	1,08± 1,06	1.12 ± 1,20	0,73	0,95± 0,12	0,86 ± 0,23	0,04

Tabla 74. Comparación al principio y al final del estudio de la AVMMC en individuos hipertensos con retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

Sin embargo los valores de tensión arterial diastólica no presentaron diferencias entre el principio y el final del seguimiento ni en el subgrupo con suplementación ni en el subgrupo sin ella. A pesar de ello nótese que la TAD en individuos no suplementados aumentó considerablemente (casi 5 mmHg) aproximándose el resultado a la significación estadística ($p=0,11$) mientras en individuos suplementados la TAD se mantuvo..

1999- 2004						
HIPERTENSOS CON RETINOPATIA						
	GRH + S				GRH sin S	
	1999	2004	P	1999	2004	P
TAD	80,00± 10,93	80,89 ± 9,96	0,70	80,71±14,12	85,38± 12,92	0,11

Tabla 75. Comparación al principio y al final del estudio de la TAD en individuos hipertensos con retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

5. Hipertensos sin retinopatía.

El antioxidante total disminuyó en el grupo de individuos hipertensos sin retinopatía al que se les administró el suplemento, permaneciendo estable en el grupo al que no se le administró.

Por otro lado, el estado oxidativo (MDA) disminuyó en ambos grupos un 20% más en el grupo que se sometió al consumo del suplemento (diferencia de MDA entre 1999 y 2004 de 0,94 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de hipertensos no retinópatas con suplementación y de 0,78 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de hipertensos no retinópatas sin suplementación).

La SOD disminuyó sólo en el grupo de hipertensos sin con suplementación, permaneciendo estable en el grupo de hipertensos sin retinopatía sin suplementación.

1999- 2004						
HIPERTENSOS sin RETINOPATIA						
	GnRH + S			GnRH sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
AOXT	1,12± 0,26	0,94 ± 0,29	0,04	1,17± 0,37	1,26 ± 0,35	0,59
MDA	2,19± 0,32	1,25 ± 0,51	<0,01	2,08± 0,43	1,43± 0,30	<0,01
SOD	197,77± 53,07	130,21 ± 33,29	<0,01	177,99± 28,08	150,89 ± 43,83	0,12

Tabla 76. Comparación al principio y al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) hipertensos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

La agudeza visual media mejor corregida presentó un aumento en el subgrupo suplementado y una disminución en el no suplementado, siendo ambos resultados no significativos.

1999- 2004						
HIPERTENSOS sin RETINOPATIA						
	GnRH + S			GnRH sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
AVMMC	0,93± 0,17	0,93±0,15	0,95	0,98± 0,15	0,92 ± 0,14	0,17

Tabla 77. Comparación al principio y al final del estudio de la AVMMC en individuos hipertensos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

Por otra parte la TAD se mantuvo en individuos suplementados y aumentó en aquellos que no recibían suplemento, de forma no estadísticamente significativa.

1999- 2004						
HIPERTENSOS sin RETINOPATIA						
	GnRH + S			GnRH sin S		
	1999	2004	P	1999	2004	P
TAD	79,36± 12,09	79 ± 11,26	0,89	81,49± 2,68	83,75± 10,62	0,42

Tabla 78. Comparación al principio y al final del estudio de la TAD en individuos hipertensos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

6. Comparación Global en pacientes hipertensos (con y sin retinopatía).

Los niveles de antioxidante total sólo descendieron en el grupo sin retinopatía y con suplemento, permaneciendo estables en el resto.

La actividad oxidativa disminuyó de forma muy significativa en los hipertensos con retinopatía al final del estudio, en ambos grupos (pero la disminución es mayor en el grupo que tomaba suplemento, como se aprecia en la figura 75).

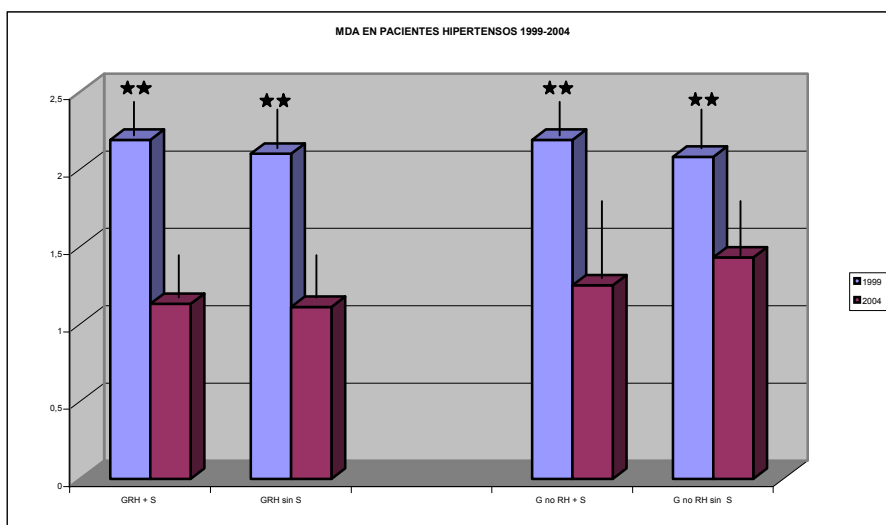


Figura 75. Comparación al inicio y al final del estudio del estado oxidativo (MDA) de los individuos hipertensos separados en subgrupos según padeciesen o no retinopatía y según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades $\mu\text{mol/l}$

Como en el grupo de los diabéticos la SOD disminuye en todos los subgrupos, pero sensiblemente menos en los pacientes con suplemento excepto en el grupo de pacientes sin retinopatía y sin tratamiento (aunque la $p=0,12$ es baja).

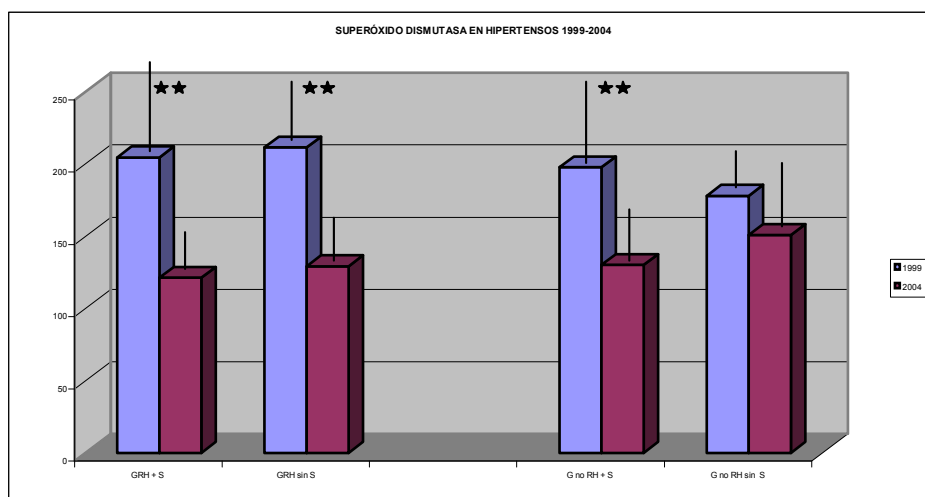


Figura 76. Comparación al inicio y al final del estudio de la Superóxido dismutasa de los individuos diabéticos separados en subgrupos según padeciesen o no retinopatía y según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades /ml.

En cuanto a la agudeza visual mejor corregida se mantuvo en individuos hipertensos con retinopatía suplementados y descendió en los no suplementados. Por otra parte aunque la tendencia es hacia el mantenimiento de la AVMMC en hipertensos sin retinopatía con suplemento y la disminución en aquellos sin suplemento, no existe diferencia estadísticamente significativa.

Atendiendonos a los valores de TAD ocurre algo similar. La tendencia es hacia el mantenimiento de los valores de TAD en pacientes hipertensos suplementados y hacia el aumento en no suplementados no existe significación estadística.

7. Controles.

Los resultados de los individuos controles del estudio separados según en los subgrupos que siguieron o no la suplementación se muestran en la tabla siguiente:

1999- 2004						
CONTROLES						
	CON SUPLEMENTO		P	SIN SUPLEMENTO		P
	1999	2004		1999	2004	
AOXT	1,17± 0,21	1,11± 0,40	0,31	1,32± 0,58	1,07± 0,35	0,04
MDA	1,99± 0,36	1,17 ± 0,36	<0,01	1,64± 0,35	1,13 ± 0,36	<0,01
SOD	212,62± 65,59	126,42± 37,37	<0,01	212,97± 60,58	122,14 ± 21,92	<0,01

Tabla 79. Comparación al principio y al final del estudio del estado oxidante (MDA)-antioxidante(AOXT, SOD) en controles separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

Se observó una disminución natural del estado antioxidante con el transcurso de los años (lo que se objetiva en los 5 años del seguimiento) en los controles sin suplemento. El grupo que tomó el suplemento, sin embargo, mantuvo sus niveles de actividad antioxidante.

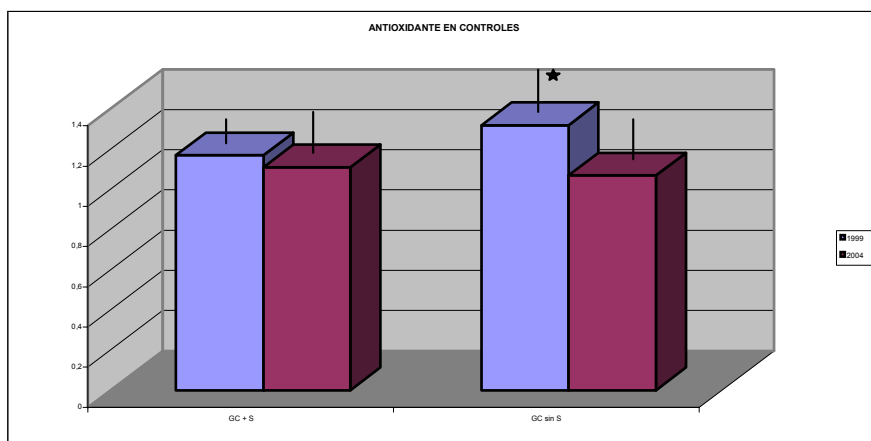


Figura 77. Comparación al inicio y al final del estudio del estado antioxidante(AOXT) de los individuos controles separados en subgrupos según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media + Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades mmol/l

Además el estado oxidativo fue significativamente mayor al principio del estudio que al final del mismo en ambos grupos, descendiendo casi un 40% más en el grupo control con administración de suplemento respecto al grupo control sin suplementación (diferencia de MDA entre 1999 y 2004 de 0,82 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de controles con suplementación y de 0,51 $\mu\text{mol/l}$ en el grupo de controles sin suplementación).

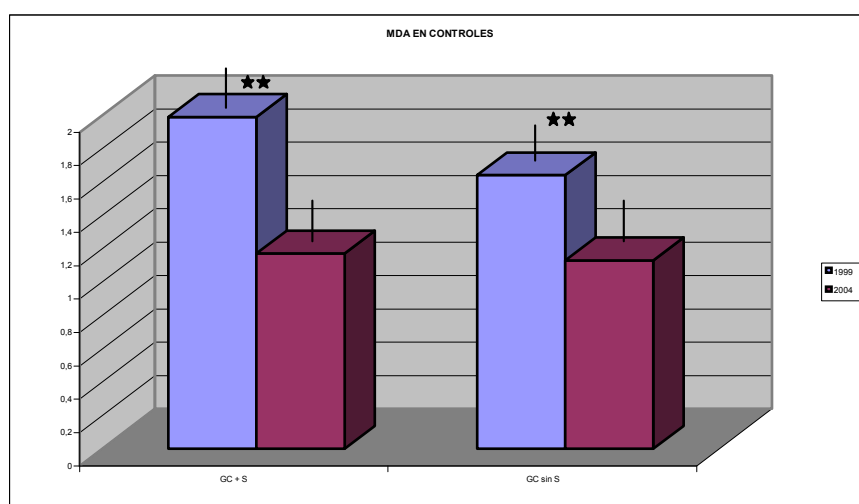


Figura 78. Comparación al inicio y al final del estudio del estado oxidativo (MDA) de los controles separados en subgrupos según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades $\mu\text{mol/l}$

Por otro lado la SOD disminuyó en ambos grupos, ligeramente más en el grupo sin suplementación.

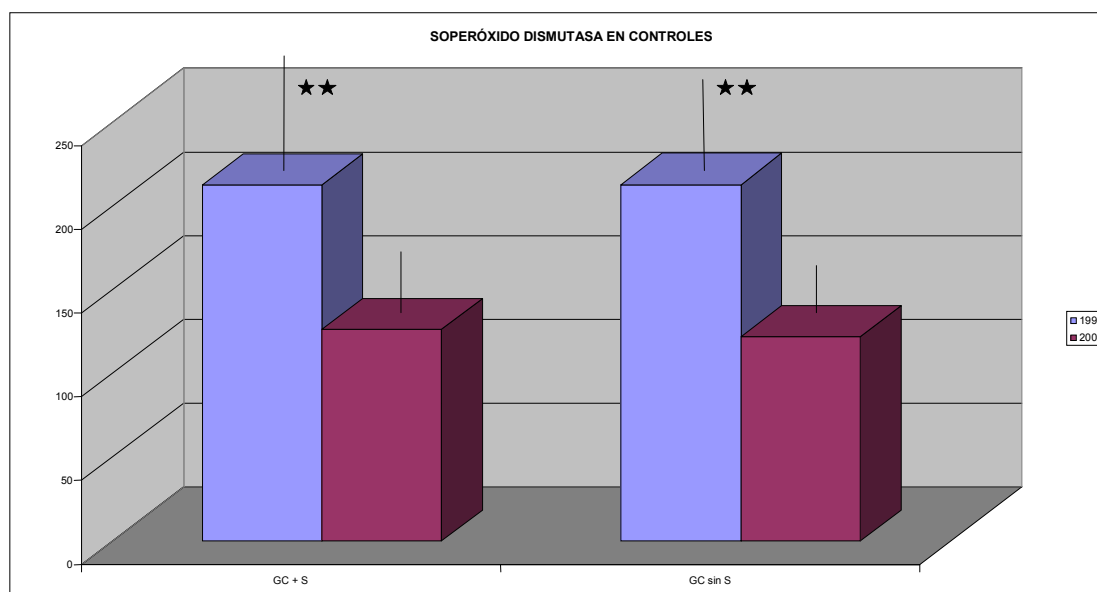


Figura 79. Comparación al inicio y al final del estudio de la Superóxido dismutasa de los individuos diabéticos separados en subgrupos según padeciesen o no retinopatía y según la asignación al grupo que tomó el suplemento vitamínico o no. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. * indica nivel de significación \leq al 0,05 y ** indica nivel de significación \leq al 0,01. Unidades /ml.

En cuanto a los resultados de AVMMC ésta aumentó en individuos controles con suplementación mientras disminuyó en aquellos controles que no recibieron el suplemento, pero de forma estadísticamente no significativa.

1999- 2004						
CONTROLES						
	CON SUPLEMENTO		P	SIN SUPLEMENTO		P
	1999	2004		1999	2004	
AVMMC	0,96 \pm 0,13	1,08 \pm 1,21	0,85	1,10 \pm 1,33	0,96 \pm 0,14	0,96

Tabla 80. Comparación al principio y al final del estudio de la AVMMC en individuos hipertensos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media \pm Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

Asimismo aunque la tendencia en cuanto a TAD fue al descenso en controles con suplemento y al aumento en pacientes controles sin suplemento, los resultados no muestran significación estadística.

1999- 2004						
CONTROLES						
	CON SUPLEMENTO			SIN SUPLEMENTO		
	1999	2004	P	1999	2004	P
TAD	79,18± 12,09	77,93± 10,80	0,52	76,70± 2,30	78,12 ± 1,78	0,43

Tabla 81. Comparación al principio y al final del estudio de la AVMMC en individuos hipertensos sin retinopatía separados según hubieran o no tomado el suplemento. Media ± Desviación Estándar. Test t de Student para muestras apareadas. Significación estadística en rojo.

DISCUSIÓN.

I. EVALUACIÓN CRÍTICA DEL DISEÑO GENERAL DEL ESTUDIO.

El presente estudio tiene un diseño de cohortes, prospectivo, con un seguimiento a lo largo de 5 años (1999-2004), realizado formando parte de los estudios de un grupo multicéntrico de estudio sobre las retinopatías vasculares, en el que colaboran (entre otros centros de la Comunidad Valenciana), el Departamento de Oftalmología del Hospital Universitario Dr. Peset y Centro de Especialidades Monteolivete y la Unidad de Investigación Oftalmológica “Santiago Grisolia” de Valencia.

En la parte que concierne al estudio que se presenta en este proyecto de tesis doctoral, se eligieron inicialmente 604 participantes (259 varones y 345 mujeres). La muestra se seleccionó entre los meses de Septiembre de 1999 a Marzo de 2000 entre los asistentes a la consulta de oftalmología.

Los sujetos se asignaron a uno u otro grupo por el oftalmólogo que los visitó. Este hecho podría parecer carente de objetividad, pero se ha subsanado en lo posible al ajustarse de forma estricta a los criterios de inclusión-exclusión diseñados específicamente para este estudio. Se asume el hecho de no haber realizado una selección de forma aleatoria, ya que los individuos han sido incluidos de forma consecutiva en el tiempo y en el espacio, según el diseño del estudio. Los participantes se dividieron en tres grupos principales, atendiendo a las patologías que deseábamos estudiar: Grupo 1: Pacientes con Diabetes Mellitus (GDM; n= 220); Grupo 2: Pacientes con Hipertensión Arterial Esencial (GHTA; n= 191); Grupo 3: Sujetos sanos o grupo control (GC; n= 193). La muestra ha sido homogénea y el tamaño de la misma adecuado a las características de este estudio. En este sentido, la edad media de los sujetos ($48'46 \pm 11'06$ años y rango 30-65 años) también fue similar entre los tres grupos principales de pacientes diabéticos e hipertensos y sujetos controles.

Se efectuaron visitas anuales durante los 5 años del estudio, realizando las encuestas para la recogida de datos, la exploración oftalmológica y los análisis de sangre, aunque para el presente trabajo sólo se consideraron los resultados iniciales y finales, por considerarlos representativos de todo el estudio y reflejo del curso de la diabetes mellitus y de la hipertensión arterial y suficientes para valorar los efectos diferidos de la administración oral del suplemento con micronutrientes.

Las visitas anuales tuvieron también como objetivo el mantenimiento de los individuos en el estudio, registrando cambios de dirección y teléfono, y el reforzamiento de la motivación en la participación mediante el recuerdo periódico de la toma diaria de los suplementos en el grupo que recibía la administración oral de micronutrientes.

Todos los datos fueron introducidos en una hoja diseñada en el programa Excel para Windows, de forma particular para este trabajo. Al final de los cinco años de estudio el número de sujetos fue de 490, y de ellos 226 eran varones y 264 mujeres. La edad media de la muestra, considerando el remanente de participantes al final del estudio fue de $53,5 \pm 11,1$ años (rango 30-65 años). Atendiendo a su patología, los pacientes se agruparon en: el último año de seguimiento en pacientes con Diabetes Mellitus (n= 179); Grupo 2: Pacientes con Hipertensión Arterial Esencial (n= 157); Grupo 3: Sujetos sanos o grupo control (n= 154). Si observamos el número de participantes al inicio y final del estudio, el porcentaje de permanencia fue del 81,12 % . Los participantes que abandonaron el estudio (n=114) lo hicieron por “exitus”, rechazo en la participación, imposibilidad de localización, ausencia o equívoco en la asistencia a las citas o exploraciones, curso insidioso de su enfermedad, exclusión según criterios diseño estudio, etc. Dentro de los participantes que causaron baja en el estudio, un 21% fueron desestimados por anomalías en la extracción, manipulación o procesamiento de las muestras entre el comienzo y final del propio seguimiento. Otros estudios similares han descrito porcentajes similares y razones semejantes de no participación (The AREDS Research Group 1999; The AREDS Research Group 2001a; The AREDS Research Group 2001b; Treatment Diabetic Retinopathy Study 1985) Todos los protocolos utilizados en este estudio han sido diseñados para evaluar factores de riesgo vascular retiniano endógenos y exógenos en el curso de la diabetes mellitus y de la hipertensión arterial esencial, similares a los métodos descritos para evaluación de las anomalías microvasculares asociadas a hipertensión, arteriosclerosis y diabetes en ciertas comunidades (The AREDS Research Group 1999; The AREDS Research Group 2001a; Beatty et al. 2000; Desmettre et al. 2004; Treatment Diabetic Retinopathy Study 1985; Goldberg et al. 1988; Hubbard et al. 1999; Klein et al., 1998; Moss et al. 1995; O'Neill et al. 2001; Sjolie et al. 1997; Vitale et al. 1998).

Además se ha ensayado la administración oral de un suplemento de micronutrientes con propiedades antioxidantes en las retinopatías vasculares con el fin de valorar sus efectos sobre el sistema visual y sobre los datos del análisis bioquímico. Para ello se ha tenido en cuenta, esencialmente, la administración precoz ya que la

mayoría de pacientes diabéticos o hipertensos no padecían retinopatía al inicio del estudio, así como ninguno de los controles. Además, hay que tener en cuenta que cuando comenzó este trabajo (año 1999) el uso de suplementos antioxidantes era poco popular en nuestro país, cuanto más origen de controversia negativa. Es importante que los pacientes, e incluso los propios médicos dispongan de datos científicos objetivos que les ayuden a valorar si la ingesta de suplementos dietéticos y vitamínicos podría ser eficaz, o no, para favorecer la salud en general, y en concreto para prevenir la progresión de las enfermedades oculares de origen vascular. Si aceptamos que existen deficiencias vitamínicas y de ciertos micronutrientes en nuestra sociedad, y que los grupos de mayor riesgo son los jóvenes (por las dietas americanizadas) y los ancianos (por la disminución de aporte y el enlentecimiento metabólico en general) es posible que la respuesta sea afirmativa, al menos para la primera cuestión.

De hecho, el estrés oxidativo es un mecanismo patogénico que se ha relacionado en el envejecimiento y con el desarrollo de múltiples enfermedades, entre ellas varios tipos de cáncer, enfermedades cardíacas, disfunción endotelial, aterosclerosis, inflamación crónica, enfermedades del tracto intestinal, enfermedades neurodegenerativas y en patologías isquémicas y postisquémicas (Fridovich 1978; Florence 1995; Halliwell y Gutteridge 1984, Mc Cord 1985, Pinazo-Duran MD et al. 1999, Kohen y Nisha 2002, Melo et al. 2005). Como se comenta en el apartado introducción, la retina presenta una elevada demanda de oxígeno, las células retinianas tienen una actividad metabólica muy importante y además están expuestas a niveles elevados de luz azul, que junto al oxígeno potencia la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, dañinos para las células y tejidos. El primer estudio clínico que demostró una conexión posible entre la ingesta de antioxidantes y una enfermedad ocular, la DMAE, se publicó en 1988 (Goldberg et al. 1988) e indicaba que los pacientes que consumían frutas y vegetales, que eran fuentes de beta caroteno (precursor de la vit A) diariamente y de forma constante, tenían una protección significativa frente al curso de la DMAE que aquellos que consumían menos de estos nutrientes. En 1994 se publicó un estudio piloto (Seddon et al. 1994) que evaluaba la relación entre la ingesta diaria de carotenoides y vitaminas A, C y E y el riesgo de DMAE encontrando que la ingesta de carotenoides se asociaba a menor riesgo de progresión de la DMAE. Sin embargo otros estudios han incidido en que podría haber una relación positiva entre la ingesta y niveles séricos de vit E y reducida incidencia de DMAE (Delcourt et al. 1999). El índice de antioxidantes en suero, también ha sido

correlacionado positivamente con la protección frente a la DMAE. Además, varios estudios han presentado la evidencia de una modesta, aunque clínicamente objetivable mejoría en el riesgo de progresión de la DMAE y disminución de pérdida visual (The AREDS Research Group 2001a; Desmettre et al. 2004; Stahl 2005; Richert et al. 2004). Por nuestra parte, este estudio se ha diseñado de forma que incluyera un grupo homogéneo de pacientes de ambos sexos, diabéticos, hipertensos y sujetos sanos, sobre los que se ha intentado determinar si la administración precoz de suplementos de micronutrientes con propiedades antioxidantes retrasaba o impedía la aparición y evolución de las complicaciones vasculares retinianas de la diabetes mellitus e hipertensión arterial esencial.

Mención aparte supone el comentario acerca de los métodos que hemos utilizado para determinar los parámetros bioquímicos. Las técnicas para medir los parámetros clásicos (glucosa, hemoglobina glicosilada, colesterol, etc.) no presentan ninguna particularidad, pues se ajustan a las normas de la clínica diaria. Sin embargo los ensayos utilizados en el presente estudio para determinar las actividades oxidativa y antioxidante en la sangre periférica son técnicas especiales que no se realizan rutinariamente en los laboratorios hospitalarios. Hay que tener en cuenta que las técnicas empleadas han sido elegidas por ser las más adecuadas a nuestras necesidades de procesamiento de un gran número de muestras. Si tenemos en cuenta que la determinación de la oxidación no enzimática de los lípidos es una técnica válida para estudiar distintas patologías relacionadas con el estrés oxidativo, las técnicas enzimático-colorimétricas utilizadas para nuestras muestras han sido validadas por otros muchos autores en trabajos similares (Buege y Aust 1978; Suematsu et al. 1981; Montoliu et al. 1994; Pinazo-Duran et al. 1995; Pinazo-Duran et al. 1999; Verdejo et al. 1997; Verdejo et al. 1999; Verdejo et al. 2000; Melo et al. 2005). Los métodos que pueden medir el nivel de peroxidación lipídica de un tejido se basan en la determinación de los metabolitos de la cadena de peroxidación lipídica, como los dienos conjugados (que se originan por la ruptura de los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados y que son detectables por espectrofotometría), o los hidroperóxidos (que son detectables por quimioluminiscencia y cromatografía). Ambos procedimientos, por una parte bastante asequibles, tienen el inconveniente de su posible falta de especificidad. Como queda reflejado en el apartado introducción, otros métodos se basan en la determinación del MDA metabolito final de la cadena de peroxidación lipídica, que también se genera durante la síntesis de prostaglandinas y la síntesis del tromboxano. Hay por tanto que

considerar muy seriamente que el MDA puede generarse durante los procesos de degradación de biomoléculas no lipídicas (que precisan condiciones extremas de pH y temperatura). Al no ser éstas características que se ofrezcan en condiciones fisiológicas se piensa que el MDA es un derivado de la peroxidación lipídica y puede ser utilizado como marcador de los proceso de peroxidación, como así han demostrado diversos autores (Esterbauer y Cheeseman 1990; Chuan J et al. 1998; Slatter, Bolton y Bailey 2000).

Cuando se determina el MDA en una muestra biológica, el metabolito presente en las mismas es la suma del ligado a proteínas y el libre (MDA total). Para determinar el MDA ligado a proteínas, éste debe ser separado del resto mediante hidrólisis y después sumarlo al MDA libre. El MDA total obtenido seria pues un compuesto higroscopico, blanco y cristalino cuya reactividad es pH dependiente. Hay que subrayar, que en todas estas reacciones se producen artefactos, además de aumentar el tiempo de realización del protocolo. Por todo ello se prefiere determinar el MDA libre. Uno de los reactivos utilizados mas comúnmente para determinar el MDA es el ácido tiobarbitúrico (TBA) que reacciona con el MDA en medio ácido fuerte y da lugar a un complejo estequiométrico MDA-2TBA que presenta una fuerte absorción a 532 nm. Este método es muy específico en el caso de utilizar microsomas, existiendo una producción muy baja de artefactos y mínima interferencia con otras sustancias que reaccionan con el TBA (BARS) como ha quedado demostrado en la práctica (Esterbauer y Cheeseman 1990). La determinación directa de MDA libre por el método de cromatografía líquida de alta resolución da los mismos valores que con el test TBA, indicando que en estos sistemas las medidas estándar del test TBA miden sola y exclusivamente el MDA libre y no las TBARS (o metabolitos MDA-like), lo que es un concepto que ha influido de forma fundamental en el diseño de nuestro trabajo, para elegir esta y no otra cualquiera de las técnica analíticas disponibles en kits comerciales o bajo protocolos de ensayos bioquímicos. No obstante hay que resaltar que en condiciones especiales en las que el tejido se somete a fraccionamiento, elevadas temperaturas, tiempos extensos de reacción uso de los otros ácidos, inducción con hierro etc, el método pierde especificidad. No hay duda de que en estos caso el test TBA es menos valido y selectivo, debido a los complejos que forma el TBA con otros compuesto no peroxídicos, pero que absorben a la misma longitud de onda que el MDA (como el ácido siálico, aminopirinas, ribosa, lípidos oxidados, MDA unidos a proteínas y otros aldehídos alifáticos y aromáticos). Sin embargo, es preciso resaltar que en el procedimiento estándar los complejos de

MDA unido a proteínas, o los lípidos oxidados son eliminados por precipitación en el frío (hielo) con el ácido, y que además los aldehídos aminoácidos, ribosa, o azúcares y hidroperóxidos de los ácidos grasos dan solamente un color muy débil en el test TBA estándar. Además desde el punto de vista de la química analítica, la absorción a 530-535 nm producida por estos compuestos es de magnitud varias veces inferior a la absorción producida por el MDA. Los componentes TBA positivos tendrían que estar presentes en la muestra en concentraciones tan elevadas y extremas que interferirían significativamente con la determinación estándar de MDA, lo cual es difícil que ocurra en la práctica. Aunque la cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography) es una de las técnicas más utilizadas para determinar el contenido en MDA de las muestras biológicas, en nuestro caso particular la no disponibilidad de esta técnica y la imposibilidad de que las muestras se transportaran en un tiempo prudencial, nos ha dirigido hacia la técnica enzimática del TBA para determinar las sustancias que reaccionan con el y que en una proporción muy importante son aldehídos peroxídicos, principalmente el MDA. A pesar de la controversia existente en cuanto a la fiabilidad de la técnica del TBA, aparecen de una forma constante en la bibliografía científica multitud de trabajos que siguen utilizando como procedimiento analítico el TBA ensayado mediante la técnica enzimática, bien es cierto que introduciendo modificaciones cada vez más puntuales, con el fin de evitar en lo posible las reacciones no específicas con otros compuestos que contengan carbonilos y usando EDTA (quelante de iones para reducir las reacciones de oxidación en las que participa el Fe). Con estas precauciones asumimos que aunque la medida de MDA por el test calorimétrico del TBA está fuertemente influida por las condiciones de la reacción, las concentraciones de MDA en las muestras sanguíneas han sido obtenidas en un rango que coincide globalmente con los resultados de otros autores en la misma línea de investigación (Coundray 1997).

La determinación del estado antioxidante total mediante el kit comercial del Antioxidante Total se ajustó a protocolos descritos con anterioridad y a nuestra práctica y experiencia personal con otros estudios (Pinazo-Duran et al. 1995; Pinazo-Duran 1999; Verdejo et al. 1997; Verdejo et al. 1998; Verdejo et al. 1999). En los últimos años varios estudios han asumido que esta prueba es óptima para determinar la actividad antioxidante en las muestras biológicas (Richer et al. 2004).

La determinación del enzima súper oxido dismutasa SOD se realizó según protocolos descritos con anterioridad (Paoletti y Mocali 1990) y publicaciones previas de nuestro

grupo investigador (Pinazo-Duran y Guerri C 1996). La SOD es un enzima que interviene como primer paso en los mecanismos de defensa contra el ataque oxidativo. Según el protocolo descrito por Paoletti y Mocali la actividad de este enzima se registra por medio de la secuencia química que genera anión superóxido a partir de oxígeno molecular en presencia de EDTA, MnCl₂ y Mercaptoetanol. Los resultados se expresaron como la media y desviación estándar de 2-3 experimentos (U/ml). Hemos atravesado varias etapas al determinar la actividad SOD. Entre ellas las de ajustar el protocolo a nuestras muestras y encontrar el filtro indicado para la medición en el espectrofotómetro. Aun así, pese a las variaciones encontradas entre unos y otros participantes y el gran número de pruebas que se realizaron hasta llegar a optimizar los datos que hemos presentado en este estudio, dicho enzima ha podido ser determinado en los tres grupos de participantes con un elevado índice de fiabilidad.

No obstante, para determinar la actividad oxidativa y antioxidante en la sangre humana fue necesario poner a punto unas normas de obtención y manipulación muy estrictas en condiciones estándar, así como la congelación inmediata y conservación de las mismas a -85°C hasta su transporte en condiciones idóneas y almacenaje en el laboratorio de bioquímica y biología molecular de la Unidad de Investigaciones Oftalmológicas “Santiago Grisolia”, de Valencia, donde se llevaron a cabo por nosotros todos los ensayos previstos.

II. EVALUACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS.

1. Estudio epidemiológico sobre las retinopatías vasculares.

La revisión de los principales factores de riesgo para la retinopatía diabética y la retinopatía hipertensiva ha sido uno de los objetivos de este estudio. Nuestra actuación ha comprendido tres tipos de protocolos, que por sus características y extensión requieren apartados individuales:

- a.- Datos personales y familiares de los participantes, características de su enfermedad y hábitos de vida.
- b.- Exploración oftalmológica.
- c.- Examen bioquímico.

1.1. Datos personales y familiares, características de la enfermedad, hábitos de vida.

La edad y distribución por sexos de los individuos fue bastante similar para los tres grupos de estudio (GDM: $54,4 \pm 11,3$; GHTA: $55,3 \pm 9,1$; GC: $46,8 + 10,6$), (GDM: 56,8% varones y 42,2% mujeres; GHTA: 30,4% varones y 69,6% mujeres; GC: 33,6% varones y 66,4% mujeres) y estas proporciones se mantuvieron hasta el final del seguimiento. Para evaluar la relativa influencia de determinadas variables en el seguimiento de los participantes se consideraron los hábitos de vida al comienzo y al final del estudio. El porcentaje de fumadores y bebedores fue mayor entre los diabéticos que en los otros dos grupos. Estudios similares reflejan cifras de diabéticos fumadores del 25% (Bonfont Rouselot, 2000; Klein et al., 1998; Mares-Perlman 2000; AREDS 2001 a,b). Además, hay que subrayar que más de la mitad de la muestra de individuos sanos realizaba ejercicio físico de manera disciplinada, frente a un tercio de los pacientes diabéticos y de los hipertensos. En cuanto a los factores de control de la dieta y la medicación prescrita, marcadores esenciales del interés por la propia salud y por el control de la enfermedad, destaca el elevado cumplimiento del tratamiento indicado en ambos grupos de pacientes de este estudio, y el seguimiento y cuidado de la alimentación en un 61,5% de los diabéticos frente al 58,5% de los hipertensos. La ingestión de alimentos y nutrientes es uno de los puntos básicos en el pronóstico de los enfermos con DM o HTA. Los resultados de diversos trabajos longitudinales describen una prevalencia menor de complicaciones oftalmológicas en los sujetos con un buen estado nutricional que se ajustan a una dieta estricta, entre otros factores de riesgo a considerar (Klein et al., 1998; Mayer-Davis EJ et al., 1998; Mares-Perlman J et al., 2000).

El antecedente de un familiar directo con respecto al padecimiento de la enfermedad ha sido un punto clave en la recogida de datos de los participantes. Existe una diferencia notable entre los diabéticos e hipertensos y los controles (2:1) a favor de los antecedentes familiares del proceso.

Es importante también valorar el parámetro relacionado con el tiempo de evolución de la enfermedad. Está demostrado que la duración del proceso es uno de los factores de riesgo a tener en cuenta en la aparición de complicaciones oftalmológicas de la diabetes

mellitus (Klein et al. 1984b; Klein et al., 1994; The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group 2000; Lee et al., 2003) o de la hipertensión arterial (Wong et al. 2001a). En los pacientes de este estudio, la duración media de la diabetes fue de $9,8 \pm 6,7$ años y de la hipertensión arterial de $6,1 \pm 5,7$ años al comienzo del trabajo. Tanto al principio del seguimiento como al final encontramos, concordando con los datos encontrados en la bibliografía, que la duración de la enfermedad de base (DM o HTA) se correlaciona positivamente con el grado de la retinopatía.

El seguimiento del tratamiento médico se asoció sorprendentemente de forma negativa al grado de retinopatía. Consideramos que no se trata de una relación causal y más bien puede quedar explicado por el hecho de que los pacientes con peor estado general (incluyendo afectación retiniana) son los más susceptibles de tratamiento con antidiabéticos o antihipertensivos.

En cuanto a la correlación positiva de la edad con el grado de la retinopatía al final del estudio parece sugerir que la mayor tasa de progresión se dio en pacientes de mayor edad, en el período de seguimiento de 5 años.

El resto de parámetros intrínsecos y de estilos de vida analizados (sexo, seguimiento de dieta, hábito de fumador, hábito de bebedor, realización de ejercicio físico diario, antecedentes familiares (de RD o HTA) no se relacionaron con el grado de retinopatía, no pareciendo factores de riesgo para la dicha patología, lo que se corresponde con lo encontrado en la bibliografía (Moss Klein y Klein ,1992; Cruickshanks et al. 1992; Moss Klein y Klein ,1996) Llama especialmente la atención que el tabaco no se asocia con el grado de afectación retiniana ni en este y ni en otros estudios (Aiello, 2001).

Uno de los datos obtenidos en el transcurso de este seguimiento y que no queda reflejado en el apartado de resultados, ha sido realmente el comprobar el interés que mostraron la mayoría de los pacientes por realizar las exploraciones oftalmológicas y conocer los resultados de sus analíticas. Esto puede ser muy favorable para la evolución de la enfermedad, ya que los propios pacientes pueden obtener información directamente del médico durante su seguimiento del estado de su enfermedad y de su retinopatía. El médico investigador, por su parte puede identificar los pacientes de mayor riesgo para evolucionar a las complicaciones oftalmológicas o de la presentación de complicaciones y la recomendación de tratamientos médico quirúrgicos o láser, o

incluso la exclusión del estudio para realizar terapias mas convenientes o actuaciones mas puntuales que el propio estudio observacional.

En los individuos participantes en el estudio se ha considerado la presión sanguínea diastólica por varias razones. De entrada por ser un importante factor de riesgo en patología vascular. Una reducción en la presión diastólica sanguínea de 5-6 mmHg se asocia a una reducción de un 35-40% de ictus y de un 20-25% de enfermedad coronaria (Hansson et al, 1998). Además por ser mejor predictor de riesgo de patología cardiovascular que la presión sistólica en pacientes menores de 60 años (The Framingham Heart Study, 2001) considerando que la mayoría de los pacientes del estudio están por debajo de los 60 años ($53,5 \pm 11,1$ años -rango 30-65 años-) al inicio del estudio.

Es destacable el hecho de que al inicio del estudio la TAD fue sólo mayor en el grupo de hipertensos, no existiendo variación entre los subgrupos según hubieran o no de recibir la suplementación con micronutrientes. Esto sucedió paralelamente con los grupos y subgrupos al final del estudio, excepto el resultado de la TAD en diabéticos con retinopatía que resultó menor que en diabéticos sin retinopatía. Este dato contrasta con los resultados del Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR) en los que se asoció la progresión de la retinopatía con una alta presión sanguínea diastólica al comienzo del estudio y un aumento de la presión sanguínea diastólica en el seguimiento de 4 años (Klein et al, 1998).

Algunos estudios han mostrado una reducción de las cifras de tensión arterial en ratas hipertensas tratadas con sustancias antioxidantes como ácido alfa lipoico, N-acetilcisteína, melatonina o aspirina (El Midaoui y Champlain 2002; Wu et al. 2002; El Midaoui et al. 2002; El Midaoui et al. 2003; Wu et al. 2004, Girouard et al. 2003). Asimismo el tratamiento con Vitamina D, presumiblemente afectando el metabolismo del calcio, parece jugar un papel importante en la regulación de la presión sanguínea como se demuestran en los estudios de intervención sobre pacientes hipertensos en los que se evidencia un descenso de la presión sanguínea, tanto sistólica como diastólica (Lind et al. 1988; Lind et al 1989).

En oposición a estos resultados no hemos encontrado en ninguno de los subgrupos sometidos a suplementación micronutricional variación de la TAD entre el principio y el final del seguimiento.

1.2. Exploración oftalmológica.

Los exámenes oftalmológicos se llevaron a cabo en el estudio basal y con periodicidad anual a lo largo de todo el seguimiento. La agudeza visual mejor corregida de cada ojo se registró en todos los participantes, de forma que las medias fueron similares para el ojo derecho (GDM: $0,90 \pm 0,22$; GHYA $0,95 \pm 0,14$; GC: $1,02 \pm 0,87$) y el ojo izquierdo (GDM: $0,91 \pm 0,19$; GHYA: $0,98 \pm 0,55$; GC: $1,03 \pm 0,95$), por lo que posteriormente se consideró la media para cada paciente como se describe en material y métodos. Estas agudezas visuales basales son excelentes, y como tales reflejan el estado de la mayoría de los participantes al comienzo del estudio, siendo esto un hecho esencial en el diseño de nuestro trabajo. Este hecho no es de extrañar, ya que entre los criterios obligados de inclusión estaban los fondos de ojo normales, o en su defecto la inclusión de pacientes con retinopatía leve. No obstante, nuestra experiencia al final del estudio ha sido muy positiva, ya que en conjunto estas visiones han variado mínimamente respecto al inicio, lo que refleja que en el transcurso de nuestro seguimiento a cinco años, ha existido una baja incidencia de progresiones y de complicaciones retinianas graves, tanto de la diabetes mellitus como de la hipertensión arterial esencial en nuestros participantes, y que esto era mucho más notable en los grupos que tomaron la suplementación oral con antioxidantes, como se puede apreciar en las tablas y gráficas correspondientes de la sección de resultados.

Hay que enfatizar que al comienzo del estudio los valores de AVMMC no eran diferentes entre los grupos (diabéticos, hipertensos y controles) ni tampoco entre los subgrupos de individuos asignados para suplementación o ausencia de la misma, con lo que resultaban comparables. Al final del estudio tampoco hubo diferencias de la agudeza visual entre grupos, aunque la comparación entre diabéticos y controles se aproxima a la significación estadística ($p=0,09$). Entre subgrupos cabe destacar que el subgrupo con retinopatía diabética presentaba una AVMMC menor que el grupo de diabéticos sin retinopatía. En el resto la AVMMC no mostró variación.

Además, la AVMMC se mantuvo en todos los subgrupos a lo largo del seguimiento excepto en el subgrupo de pacientes hipertensos con retinopatía y sin suplementación en el que descendió la agudeza visual, por lo que se puede concluir que la agudeza visual no se ve influida por la suplementación vitamínica en un seguimiento a 5 años.

Sin embargo con la exploración fundoscópica con que se valoró el estado de la retinopatía no ocurrió lo mismo. El grado de retinopatía progresó en el grupo no suplementado mientras que en el grupo suplementado no progresó de forma significativa. Este resultado sugiere que la suplementación con micronutrientes protege en un seguimiento a 5 años de la progresión de la retinopatía diabética e hipertensiva. Hipotéticamente en un seguimiento más largo pudiera prevenir la pérdida de AVMMC que la progresión espontánea de la retinopatía conlleva. Aunque no hemos encontrado ningún estudio sobre la influencia de suplementación de micronutrientes sobre la retinopatía en humanos, recientes estudios en ratas ratifican que la administración de antioxidantes, sobre todo de forma combinada, puede prevenir la progresión de la retinopatía (Miranda et al, 2004; Kowluru y Odenbach, 2004; Moustafa 2004; Dene 2005; Yatoh et al 2005).

1.3. Examen bioquímico.

1.3.1. Datos de los parámetros clásicos.

Los datos han resultado concluyentes y en lo esencial coinciden con el perfil del paciente diabético y del hipertenso. La glucemia basal y HbA1c estaban significativamente elevadas en el grupo de diabéticos respecto a los hipertensos y controles. La Asociación Americana de Diabetes apoya como cifra óptima de HbA1c los valores de un 7% y asevera que la mejora del control de glucemia en pacientes con DM tipo 2 no solo conlleva una reducción en la presentación de la retinopatía sino también una disminución en el riesgo de complicaciones microvasculares de alrededor de un 25%. Es mas, la reducción de una unidad en los valores de HbA1c conlleva una reducción del 35% en el riesgo de complicaciones microvasculares. El colesterol total y fracciones HDL y LDL presentaban en nuestro estudio unas cifras compatibles con el proceso vascular subyacente en los hipertensos. La valoración global de los datos bioquímicos clásicos del perfil lipídico sigue la distribución esperada para cada uno de los 3 grupos principales de nuestro estudio. Hay que tener en cuenta que el riesgo de edema macular e isquemia retiniana aumentan de forma exponencial con la falta de control de la glucemia y también de la presión arterial, acompañado o no de hipercolesterinemia e hipertrigliceridemia. Sin embargo también hay que considerar que

el grupo de dislipémicos constituyen “per se” un grupo mayor de riesgo, puesto que la hipercolesterolemia contribuye a la progresión y morbilidad de la retinopatía diabética (Chew et al. 1996; Klein et al, 1998), presentando predisposición a exudados duros. A pesar de estos datos no hemos encontrado asociación entre el grado de retinopatía y los parámetros de perfil lipídico ni al principio ni al final de nuestro estudio. De entre los parámetros de la bioquímica básica solamente hemos encontrado que la glucemia y la HbA1c presentaban una correlación positiva con el grado de retinopatía al final del estudio. Esto coincide con los resultados del grupo de Klein (Klein et al 1994b). El resto de los parámetros valorados en el presente estudio, no se asociaron al grado de retinopatía.

Si a la elevación de los parámetros de la glucemia y de la HbA1c, se sobreañade la HTA no controlada, el riesgo de progresión de la retinopatía es aún más elevado y posiblemente alcanza grados de irreversibilidad. (The AREDS Research Group 1999; Klein et al. 1998; Hubbard et al.1999; Diabetic Retinopathy Study Research Group 1987; Moss et al.1995; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993; Sjolie et al. 1997; Vitale 1998). Paralelamente, nosotros hemos encontrado asociación positiva entre el grado de retinopatía y los niveles de TAD al final del estudio.

Se sabe que el riesgo de enfermedad cardiovascular es tres veces superior en el caso de padecer DM. La DM e HTA son causas importantes de morbi-mortalidad en los países civilizados y el ojo es una diana ineludible de estas patologías. El cuidado y prevención derivada de una mejora de los controles bioquímicos junto a la educación sanitaria de la población y la referencia a la consulta especializada de oftalmología es esencial para optimizar el seguimiento de estos pacientes y evitar las complicaciones mas graves y la pérdida de la visión.

Por los datos de nuestro estudio podemos sugerir que en los pacientes con DM o HTA el riesgo de desarrollar una retinopatía está en relación directa con las cifras de glucemia y HbA1c y no parece correlacionarse ni con las cifras del colesterol ni con los triglicéridos.

1.3.2. Datos de los parámetros emergentes. Estrés oxidativo.

El desequilibrio entre la formación de radicales libres, especies reactivas del oxígeno no-radicales y la disminución de las defensas antioxidantes es el origen del estrés oxidativo y a partir de él del ataque a células y tejidos y la aparición de la enfermedad.

El estrés oxidativo está implicado en los procesos patológicos vasculares y más recientemente se han relacionado con la diabetes mellitus (Bonnetfont-Rousselot et al. 2000; Slatter et al. 2000) e hipertensión arterial (Hubbard 1999).

El presente estudio ha tratado de investigar la implicación del estrés oxidativo en las complicaciones oculares de la diabetes y de la hipertensión. Para ello se han realizado determinaciones plasmáticas de actividad oxidativa por la vía de la peroxidación lipídica (MDA/TBARS) y analizado la actividad antioxidante total en plasma (AOXT) y la actividad del enzima superóxido dismutasa en concentrado de hemáties (SOD). Al mismo tiempo hemos valorado la posibilidad de utilizar las pruebas del estado oxidativo y antioxidante como marcadores de estrés oxidativo en los pacientes diabéticos e hipertensos, en relación a las complicaciones oftalmológicas de la enfermedad. En este trabajo hemos investigado la relación del estrés oxidativo en las complicaciones oculares de la DM y de la HTA y nuestros resultados indicaron que la actividad pro-oxidante fue significativamente mayor en los sujetos diabéticos e hipertensos (grupos patológicos) que en el grupo control (grupo sano) al principio del estudio, 1999, antes de la intervención mediante suplementación con micronutrientes. Estos resultados coinciden con los de los trabajos encontrados en la literatura en la misma línea y que concluyen que la DM favorece los procesos de peroxidación lipídica. (Nishigaki et al. 1981; Armstrong et al. 1992; Griesmacher et al. 1995; Akkus et al. 1996; Losada y Alió 1996; Peuchant et al. 1997; Santini et al. 1997, Hartnett et al. 2000). Por el contrario, en un estudio epidemiológico francés realizado en una población pre-anciana compuesta por 1389 varones no se observaron diferencias entre las TBARS en el plasma de diabéticos y sanos (Coudray et al. 1997).

Asimismo varios estudios han demostrado evidencias de un aumento de producción de EROX y peroxidación lipídica en plasma de sujetos hipertensos (Kumar y Das 1993; Lacy et al. 1998; Dhalla et al. 2000).

Por otra parte no hemos encontrado niveles disminuidos al comienzo del estudio de antioxidante total ni de SOD en diabéticos e hipertensos respecto del grupo control, lo que está de acuerdo con los resultados de algunos estudios (Walter et al. 1991; Akkus et al. 1996; Peuchant et al. 1997) y en desacuerdo con los de otros, que encuentran un descenso de dichos niveles en los grupos patológicos (Sagar et al. 1992; Kumar y Das 1993; Rema et al. 1995; Vucić et al. 1997; Hartnett et al. 2000; Redón et al. 2003). Parece razonable más esperable, al menos desde un punto de vista teórico, que los niveles antioxidantes de aumenten o al menos no disminuyan forma compensatoria en patologías con niveles elevados de pro-oxidantes.

Nuestro grupo ha demostrado en un trabajo previo que los niveles de sustancias pro-oxidantes están aumentados y de antioxidantes están disminuidos en el vítreo de pacientes con retinopatía proliferativa (Verdejo et al. 1999). Además un trabajo más reciente reveló la existencia de correlación entre la glucemia y metabolitos pro-oxidantes en plasma y vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferante (Augustin et al. 2002). Los pacientes diabéticos retinópatas en el presente estudio han evolucionado a las formas leves o moderadas de retinopatía no proliferativa, pero nos planteamos la posible influencia del estrés oxidativo en tal complicación. Por otro lado, como veremos más adelante, se sabe muy poco de la retinopatía hipertensiva en relación al estrés oxidativo. Desafortunadamente, y por razones obvias, no tuvimos disponibilidad de muestras vítreas, como ha sido investigado en trabajos anteriores (Verdejo et al. 1999).

Analizando los subgrupos en relación a la presencia de las complicaciones microvasculares retinianas, los datos del presente estudio nos han revelado que los pacientes con retinopatía diabética o hipertensiva no presentaban niveles pro-oxidantes ni antioxidantes en plasma distintos de los diabéticos o hipertensos sin retinopatía al inicio del estudio cuando aún la intervención mediante suplementación con micronutrientes no se había comenzado, siendo en ese momento la duración media de la diabetes de $11,2 \pm 7,9$ años en el subgrupo con retinopatía y de $8,4 \pm 6,1$ años en el subgrupo con retinopatía y la duración media de la hipertensión de $6,8 \pm 5,3$ años en el grupo con retinopatía y de $6,2 \pm 5,9$ años en el grupo sin retinopatía. Tampoco había

diferencias al final del estudio, pero estos datos son menos fiables en cuanto a que podrían estar afectados por la administración del suplemento.

Estos resultados coinciden los de un trabajo reciente de Turk et al. (Turk et al. 2002) en el que se compararon 64 pacientes diabéticos tipo 2 y 36 controles no encontrándose diferencias en los niveles séricos de TBARS entre pacientes diabéticos con y sin retinopatía. Sin embargo encontraron la SOD elevada en diabéticos con retinopatía lo que interpretaron como el resultado del aumento de peroxidación lipídica en pacientes con alteraciones microangiopáticas.

Por otro lado Gurler et al. (Gurler et al. 2000) en un estudio transversal en que comparaban 25 pacientes con retinopatía diabética, 34 pacientes con diabetes no insulín dependiente sin complicaciones angiopáticas y 26 sujetos sanos encontraron diferencias entre los niveles de MDA siendo mayores en diabéticos con retinopatía que sin retinopatía y a su vez mayores en diabéticos sin retinopatía que en controles. Por otro lado no existieron diferencias significativas en los niveles de de parámetros antioxidantes (SOD y catalasa), como ocurre en nuestro estudio.

Tampoco se han encontrado correlaciones consistentes entre el grado de gravedad de la retinopatía diabética o hipertensiva y los niveles de sustancias prooxidantes ni antioxidantes en plasma, tanto al principio como al final del seguimiento en nuestros sujetos a estudio.

Paralelamente a nuestro trabajo en un estudio de Harntnett et en el que se examinaron 73 pacientes diabéticos de duración de patología mayor de 5 años encontraron niveles de MDA-TBARS mayores y niveles de SOD menores en plasma de sujetos diabéticos comparados con sujetos sanos no encontrando una asociación significativa entre los niveles de TBARS o SOD y la severidad de la retinopatía diabética (Hartnett et al. 2000).

El único trabajo en humanos que hemos encontrado en la bibliografía que considera, aunque secundariamente, la relación del estrés oxidativo y la retinopatía hipertensiva, muestra que los pacientes con cambios retinianos avanzados presentaron niveles de peroxidación mayores (medidos en términos de excreción urinaria de 8-iso-

prostaglandin (PG) F₂alpha) que aquellos que no tienen retinopatía o la tienen con cambios precoces (Minuz et al. 2004). Estos resultados contrastan con los nuestros, ya que no hemos encontrado diferencias en estrés oxidativo entre hipertensos con retinopatía y sin retinopatía. Aún más, no hemos encontrado tampoco asociación entre el grado de retinopatía hipertensiva y los niveles de sustancias pro-oxidantes ni antioxidantes.

Es un hecho que la DM induce múltiples vías metabólicas que interfieren unas con otras, lo que hace mucho más complicado comprender las bases bioquímicas y moleculares de esta enfermedad y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, más efectivas que las actuales. Por lo tanto un marcador precoz de las complicaciones microangiopáticas, incluyendo la retinopatía, sería útil, junto a la identificación de los cambios del fondo ocular, para la identificación de los pacientes de mayor riesgo de sufrir pérdida de la visión.

Nuestros resultados, en cambio, desestiman los niveles de sustancias pro-oxidantes y antioxidantes como posibles marcadores séricos indicadores o predictores de la afectación ocular en diabetes (retinopatía no proliferativa) e hipertensión. Esto no excluye que el estrés oxidativo desempeñe un papel en la patogenia de las retinopatías, actuando probablemente por daño constante y acumulativo. Nuestros resultados son compatibles con esta hipótesis.

Aunque queda bien establecido por éste y por otros estudios similares, que el MDA-TBARS está aumentado en diabéticos los datos referentes a la relación entre los niveles de TBARS y glucosa en sangre en dichos pacientes son contradictorios en la literatura. A pesar de haber trabajos en que no se ha encontrado relación entre ambos parámetros (Gallou et al. 1993; Olczyk et al. 1994), en nuestro estudio se ha apreciado una correlación positiva significativa al comienzo del estudio (1999) que no se mantuvo en 2005 posiblemente por la intervención con la suplementación. De acuerdo con nuestros resultados otros autores han encontrado una asociación independiente entre glucemia y TBARS (Niskanen et al. 1995; Fijiwara et al. 1997). Aunque estudios previos han postulado que la asociación entre los niveles de peroxidación lipídica y la glucemia podrían ser una consecuencia de los triglicéridos elevados (Mooradian 1991; Haffner et al. 1995) nuestros resultados muestran que no existe asociación entre la

trigliceridemia y los niveles TBARS. Esto concuerda con lo obtenido por Menon et al y sugiere que el nivel TBARS es independiente de la trigliceridemia (Menon et al. 2004).

A pesar de que ni en nuestro trabajo ni en el de Turk (Turk et al. 2002) se ha podido detectar una correlación positiva entre la HbA1C ni ninguno de los parámetros pro o antioxidantes, los trabajos de Griesmacher et al encontraron que los pacientes diabéticos con buen control metabólico (HbA1C<6,5%) tenían un nivel más bajo de TBARS que aquellos con peor control de la enfermedad (Griesmacher et al. 1995). Además Altomare et al. encontraron una relación positiva entre los niveles de TBARS y los de glucosa y HbA1c en sangre (Altomare et al. 1992).

Cabe también destacar la correlación positiva entre el TBARS y el colesterol total de forma muy significativa en 1999 ($p>0,0001$) y casi alcanzando la significación en 2004 ($p=0,09$). Siendo el colesterol total un factor de riesgo importante en la enfermedad vascular es significativa su asociación a niveles altos de lipoperoxidación. Además en un trabajo reciente (Fernandez-Robredo et al. 2005) se ha descrito un aumento del estrés oxidativo retiniano en un modelo de hipercolesterolemia porcina y se ha demostrado que la administración de vitaminas C y E previenen los cambios morfológicos derivados de la hipercolesterolemia. Se han de realizar más estudios en este sentido.

En cuanto a los parámetros antioxidantes, no muestran ninguna asociación consistente y repetida en las determinaciones iniciales y finales con la glucemia, HbA1c ni los parámetros analíticos del perfil lipídico.

Por todo lo expuesto, podemos considerar que existen indicios suficientes para relacionar la glucemia y el colesterol total con los niveles de parámetros plasmáticos pro-oxidantes, pero no con los parámetros antioxidantes.

2. Efectos de la administración de un suplemento micronutricional con propiedades antioxidantes en las retinopatías vasculares.

Hemos encontrado en la literatura varios estudios que evalúan el efecto de la suplementación con micronutrientes a más o menos largo plazo en la retinopatía diabética en ratas (Yatoh et al. 2005; Dene et al 2005; Kowluru et al. 2004; Moustafa et al. 2004; Berryman et al. 2004; Miranda et al. 2004) y por hipercolesterolemia en cerdos (Fernandez-Robredo et al. 2005). Los resultados de dichos trabajos sugieren que la suplementación con antioxidantes en animales regula el equilibrio redox alterado patológicamente y previenen los cambios estructurales retinianos.

Sin embargo no conocemos ningún estudio planteado en humanos para valorar el efecto de los suplementos micronutricionales a largo plazo en retinopatía diabética o hipertensiva, uno de los objetivos principales de este trabajo.

El producto que se ha utilizado en el estudio ha sido el Vitalux forte ® comercializado por laboratorios Novartis. Este producto se eligió debido a la composición del mismo y por ajustarse a las cantidades diarias recomendadas para edad y sexo, con todas las garantías para los sujetos del estudio, a los que se administró dos comprimidos por día, con las comidas, realizando descansos periódicos, según consta en el apartado pacientes, material y métodos.

Durante el metabolismo aeróbico normal se producen especies reactivas del oxígeno que pueden iniciar la cadena de peroxidación y dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La influencia, hipotética o no, de los procesos oxidativos en el desarrollo de las enfermedades (Fridovich 1978; Halliwell y Gutteridge 1984; Mc Cord 1985) ha promovido el interés general sobre los antioxidantes y su utilización en la prevención o tratamiento de muchos procesos patológicos, incluidos los oculares. Se acepta de forma general que los vegetales y la fruta son esenciales para el bienestar de la población y por ello el *Department of Health* de los Estados Unidos y la OMS recomiendan la consumición de cinco raciones diarias, con el fin de disminuir el riesgo de enfermedades crónicas, complicaciones cardiovasculares y el cáncer. Para poder determinar la ingesta de vitaminas y minerales se realizaron una serie de cuestionarios en voluntarios de ambos sexos acerca de la frecuencia y cantidad de ciertos micronutrientes en la dieta y

estos datos confirman la variabilidad de ingesta entre países, continentes y culturas a lo largo del mundo.

En relación a la oftalmología, en los últimos 10 años se ha considerado seriamente la base nutricional de diversas patologías, entre ellas el glaucoma, las cataratas y la DMAE. Sin embargo, aunque se conoce que los factores nutricionales implicados en la patogenia de la DMAE incluyen antioxidantes o cofactores, no se ha podido consensuar cual de esos micronutrientes tiene el mayor poder protector. De hecho, datos clínicos y epidemiológicos apoyan la idea de cumplimentar la dieta con suplementos con propiedades antioxidantes en patologías como el glaucoma, las cataratas y la DMAE (Richer et al. 2004; Barlett y Eperjesi 2004; AREDS 2001a,b; O'Neill 2001; Beatty et al. 2000; Desmettre et al. 2004; Stahl et al. 2005; Falsini et al. 2003; Granado et al. 2004; Delcourt et al. 1999; Goldberg et al. 1988; Seddon et al. 1994). Pese a todo esto, ¿Qué evidencia hay de que los suplementos micronutrientes con propiedades antioxidantes puedan modular factores implicados en la retinopatía diabética, retinopatía hipertensiva y otras retinopatías vasculares en humanos?

Consideraremos los resultados de los parámetros oxidativos y antioxidantes en los subgrupos sometidos a administración durante 5 años del suplemento comparándolos con los resultados los subgrupos sin suplementación que marcan la evolución de la historia natural de los controles, diabéticos e hipertensos.

En los individuos sin suplementación la tendencia general que se encontró fue hacia una disminución a los 5 años tanto de los niveles prooxidantes como de los antioxidantes. La disminución de los niveles de sustancias antioxidantes en plasma con la edad es un hecho bien documentado en la población sana (Bolzan et al. 1997; Adachi et al. 2000; Inal et al. 2001). Sin embargo hemos encontrado un inesperado descenso del nivel de pro-oxidante en 5 años. Este hecho contrasta especialmente con los trabajos al respecto consultados, en los que se encuentra un incremento del MDA-TBARS con la edad (Gil et al. 2002; Inal et al. 2001). Pero hemos de considerar que el envejecimiento durante 5 años, que es el tiempo de seguimiento del presente trabajo, no se encontraron diferencias en dichos estudios en rangos de edades medias.

Nuestros resultados podrían estar justificados por una posible respuesta adaptativa en la producción antioxidante modulada por la cantidad de pro-oxidantes. El descenso de pro-oxidantes podría quedar explicado por un aumento compensatorio de los antioxidantes a nivel general.

Por otro lado nuestros datos indican que la administración de un suplemento con propiedades antioxidantes ha favorecido el mantenimiento de los niveles de AOXT en controles y en diabéticos con retinopatía, que descendieron en los subgrupos apareados no suplementados. Asimismo se ha observado en general en los subgrupos suplementados un mayor descenso de MDA y menor de AOXT y SOD en los pacientes suplementados. Paralelamente se ha evitado la progresión de la retinopatía en individuos diabéticos e hipertensos sometidos a la administración del complejo micronutricional.

En el transcurso de los 5 años del estudio se ha visto en los grupos de diabéticos e hipertensos una tendencia a neutralizar el estrés oxidativo en los participantes que tomaron el suplemento frente a los que no lo tomaron. Los factores nutricionales implicados en la patogenia de la diabetes y de la hipertensión abogan por la administración de los suplementos de micronutrientes con características antioxidantes, lo que queda demostrado a lo largo de nuestro estudio.

Frente a todos los beneficios que pueden derivarse de la actuación sobre uno o varios de los factores etiopatogénicos de la retinopatía diabética o retinopatía hipertensiva, la administración precoz de suplementos micronutrientes antioxidantes para el mantenimiento de la salud o retardo de la enfermedad no esta exenta de controversia.

En el reciente estudio SU.VI.MAX se ha demostrado que la suplementación con antioxidantes a dosis moderadas ha disminuido en un 31 % el riesgo de padecer cánceres en un 37 % el riesgo de fallecimiento en los hombres que habían recibido antioxidantes (Herberg et al. 2004). Sin embargo hay indicios de que los suplementos en ciertas circunstancias y a ciertas dosis podrían resultar perjudiciales. Por ejemplo, en fumadores se ha detectado que la administración de betacarotenoides pueden incrementar el riesgo de cáncer de pulmón (Paolini et al. 2003; Omenn et al. 1996a; Omen et al. 1996b; Albanes et al. 1996). Además aunque bajas dosis de vitamina E se han demostrado beneficiosas (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza

nell'Infarto miocardico 1999; Yusuf et al. 2000; Boaz et al. 2000; Salonen et al. 2000), un reciente metaanálisis que concluye que existe un riesgo aumentado de mortalidad cuando se consumen altas dosis de vitamina E (Miller et al. 2005).

La posibilidad de que dichos suplementos puedan tener efectos adversos tanto como beneficiosos es un hecho real a tener en cuenta. Quizás la solución estaría en disminuir convenientemente las concentración de de ciertos componentes o eliminarlos de su composición si van a ser consumidos por fumadores. El problema radica en la estimación de las concentraciones que no produzcan efectos adversos. Otros estudios se han de realizar en este sentido para esclarecer todos estos puntos de controversia.

III. APLICABILIDAD BIOMÉDICA.

La retinopatía diabética, retinopatía hipertensiva y otras retinopatías vasculares siguen siendo una de las principales causas de ceguera en el mundo. Hasta el momento no existe un tratamiento plenamente satisfactorio y en muchos casos avanzados la terapia láser, la cirugía vitreoretiniana y la medicación paliativa no ayudan a la recuperación funcional aceptable.

Pensamos que la actuación ideal de las serias complicaciones de la retinopatía diabética debería ser el prevenirlas totalmente. Se han ensayado y siguen ensayándose múltiples terapias que intentan disminuir la frecuencia de tales complicaciones. Muchos de estos fármacos se han probado en modelos experimentales y solo unos pocos se han utilizado en humanos (Comer y Ciulla 2005). Hasta el momento ninguna de estas terapias forma parte del tratamiento rutinario o protocolizado de los pacientes con retinopatía diabética o hipertensiva.

Proponemos la utilización de suplementos con micronutrientes monitorizando su acción mediante marcadores bioquímicos de estrés oxidativo como las determinaciones en plasma del estado oxidativo (MDA/TBARS) y estado antioxidante total (AOXT) así como la determinación de actividad SOD eritrocitaria como tratamiento coadyuvante en la prevención de las complicaciones oftalmológicas (y posiblemente a otros niveles) en la diabetes mellitus y de la hipertensión arterial y otros procesos vasculares. Pensamos que se debería hacer un estudio multicéntrico a gran

escala y con un seguimiento adecuadamente prolongado para confirmar los prometedores resultados del presente trabajo.

Sugerimos que un control estricto del estado oxidativo y antioxidante podría a largo plazo disminuir la incidencia de complicaciones vasculares (no sólo oculares) en pacientes con retinopatías como la diabética como ocurre con control estricto del estado bioquímico clásico (Hemoglobina A1C).

IV. COMENTARIOS FINALES.

Las manifestaciones de la DM y de la HTA difieren en la presentación de las mismas, aunque ambas tienen muchos puntos en común. La aparición de la retinopatía es una de las principales complicaciones de la DM, HTA, cardiopatías y vasculopatías periféricas, que puede conducir a la pérdida de la visión. Siguen sin conocerse los mecanismos intrínsecos que conducen a la afectación de tejidos y órganos diana en el curso de estas enfermedades y por lo tanto tampoco existe un tratamiento eficaz que pueda frenar su evolución. Los estudios encaminados a estandarizar los factores de riesgo y analizar nuevas posibilidades terapéuticas son esenciales para enfrentarnos a este tipo de enfermedades.

El diseño del presente estudio, los métodos empleados, las características de los participantes, la realización de parámetros bioquímicos innovadores y el análisis minucioso de los hábitos de vida de los pacientes han sido realizados a lo largo de cinco años con el fin de llegar a establecer pautas de actuación en los sujetos de riesgo.

Ante todos estos hechos, debemos asumir la recomendación de que los gobiernos autonómicos y estatales promovieran investigaciones que contribuyeran a identificar y sugirieran pautas de actuación que ayudasen controlar los factores de riesgo, y con esta información asumieran programas de educación y mejora de la nutrición, recomendando el ejercicio y favoreciendo la mejoría de la calidad de vida y la salud de la población. Hay que tener en cuenta, que ningún médico o programa social de salud va a obligar a un paciente a medicarse o a hacer ejercicio y controlar su bioquímica sanguínea si este no quiere. A pesar de ello, es esencial que los propios individuos sean capaces de elegir adecuadamente los alimentos en función de su edad, actividad, características personales y susceptibilidad a enfermedades vasculares (legislación acerca del

etiquetado de alimentos y obligatoriedad de especificar el tipo de nutrientes, el contenido en grasas, sus tipos y proporciones) y prevenir la enfermedad diabética, la hipertensión arterial y los accidentes vasculares subsecuentes, teniendo en cuenta todos los parámetros analizados en el presente estudio en relación a la conciencia que cada uno haya adquirido de su enfermedad y la actitud que presente frente a la misma.

CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones del presente estudio son las siguientes:

- 1) El balance entre las actividades oxidativa y antioxidante se altera en el curso de la diabetes mellitus y la hipertensión arterial esencial, inclinándose a favor del estrés oxidativo.**
- 2) El aumento de la actividad oxidativa y la disminución de la actividad antioxidante en plasma, se relacionan con la presencia de complicaciones retinianas en la diabetes mellitus y en la hipertensión arterial esencial.**
- 3) El aumento de la actividad oxidativa y la disminución de la actividad antioxidante en plasma, se relacionan con el avance de la retinopatía diabética y de la retinopatía hipertensiva, aunque los niveles de los marcadores bioquímicos de estrés oxidativo no se asocian con el grado de severidad de la afectación ocular.**
- 4) La intervención terapéutica mediante administración oral precoz y mantenida de un suplemento vitamínico-mineral con propiedades antioxidantes se refleja en el mantenimiento y mejora del estado antioxidante plasmático y descenso paralelo de la actividad oxidativa en plasma.**
- 5) La intervención terapéutica mediante administración oral precoz y mantenida de un suplemento vitamínico-mineral con propiedades antioxidantes, disminuye la progresión clínica de la retinopatía en diabéticos e hipertensos.**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abbott NJ, Revest PA, Romero IA. Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1992; 18:24-433.

Adachi T, Wang J, Wang XL. Age-related change of plasma extracellular-superoxide dismutase. *Clin Chim Acta* 2000; 290:169-78.

Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118:445-450.

Adler AI, Stratton IM, Neil HA, Yudkin JS, Matthews DR, Cull CA, Wright AD, Turner RC, Holman RR. Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321:412-419.

Aguilar E, Friedlander M, Gariano RF. Endothelial Proliferation in Diabetic Retinal Microaneurysms. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:740-741.

Alcasena MS, Martínez J, Romero J. Hipertensión arterial sistémica: Fisiopatología. *ANALES Sis San Navarra* 1998; 21:7-18.

Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxia regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:1538-1544.

Aiello LP. Vascular endothelial growth factor: 20th century mechanisms, 21st century therapies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997a; 38:1647-1652.

Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, Mori F, Ciulla TA, Ways K., Jirousek M, Smith LE, King GL. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 1997b; 46:1473-1480.

Aiello LP. Molecular mechanisms of growth factor action in diabetic retinopathy. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 1999; 6:146-156.

Aiello LP. The Potential Role of PKC in Diabetic Retinopathy and Macular Edema. *Surv Ophthalmol* 2002; 47:S263-S269.

Aiello LP. Perspectives on Diabetic Retinopathy *Am J Ophthalmol* 2003; 136:122-135.

Aiello LP, Cahill MT, Wong JS. Systemic considerations in the management of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2001; 132:760-776.

Akkus I, Kalak S, Vural H, Caglayan O, Menekse E, Can G, Durmus B. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1996; 244:221-227.

Al-Abrash AS, Al-Quobaili FA, and Al-Akhras GN. Catalase evaluation in different human diseases associated with oxidative stress. *Saudi Med J* 2000; 21:826-830.

Albanes DA, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New England J Med* 1994; 330:1029-1035.

Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J, Barrett MJ, Pietinen P, Malila N, Tala E, Liippo K, Salomaa ER, Tangrea JA, Teppo L, Askin FB, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen JK.. Alpha tocopherol and beta carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: Effects of base-line characteristics and study compliance. *J Nat Cancer Inst* 1996; 88:560-570.

- Alder VA, Su EN, Yu DY, Cringle S, Yu PY. Overview of studies on metabolic and vascular regulatory changes in early diabetic retinopathy. *Aust NZJ Ophthalmol* 1998; 26:141–148.
- Altomare E, Vendemiale G, Chicco D, Procacci V, Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabetes Metab* 1992; 18:2649-2771.
- American Diabetes Association: Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Position Statement. *Diabetes Care* 2003; 26:S33–S50.
- Ames BN. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 1986; 206:3–32.
- Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997; 14: S1–S85.
- Anonymous. Catecholamines in essential hypertension. *Lancet* 1977; 1:1088–1099.
- Ansari NH, Zhang W, Fulep E, Mansour A. Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 54:467-475.
- Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes* 1998; 47:1953–1959.
- Antonetti DA, Lieth E, Barber AJ, Gardner TW. Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol* 1999; 14:240–248.
- Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med* 1997; 336:1117–1124.
- Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N. Glycation and inactivation of human Cu, Zn-SOD. Identification of the in vitro glycate sites. *J Biol Chem* 1987; 262:16979-16972.
- Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N. Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924:292-296.
- Arend O, Wolf S, Harris A, Reim M. The relationship of macular microcirculation to visual acuity in diabetic patients. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:610–614.
- Armstrong D, Abdella N, Salman A, Miller N, Rahman EA, Bojanczyk M: Relationship of lipid peroxides to diabetic complications: comparison with conventional laboratory tests. *J Diabetes Complications* 1992; 6:116–122.
- Arthur JR, Boyne R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci* 1985;36:1569-1575.
- Ashton IK, Dornan TL, Pocock AE, Turner RC, Bron AJ. Plasma somatomedin activity and diabetic retinopathy. *Clin Endocrinology* 1983; 19:105-110.
- Asnagli V, Gerhardinger C, Hoehn T, Adeboje A and Lorenzi M. A Role for the Polyol Pathway in the Early Neuroretinal Apoptosis and Glial Changes Induced by Diabetes in the Rat. *Diabetes* 2003; 52:506-511.
- Aso Y, Inukai T, Tayama K, Takemura Y. Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2000; 37:87-92.

Attawia MA and Nayak RC Circulating antipericyte autoantibodies in diabetic retinopathy. *Retina* 1999; 19:390-400.

Augustin AJ, Spitznas M, Koch F, Grus F, Bocker T. Indicators of oxidative tissue damage and inflammatory activity in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. *Ger J Ophthalmol* 1995; 4:47-51.

Augustin AJ, Dick HB, Koch F, Schmidt-Erfurth U. Correlation of blood-glucose control with oxidative metabolites in plasma and vitreous body of diabetic patients. *Eur J Ophthalmol* 2002; 12:94-101.

Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, and Isimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34:65-70.

Baldwin JS, Lee L, Leung TK, Muruganandam A, Mutus B. Identification of the site of non-enzymatic glycation of glutathione peroxidase: rationalization of the glycation-related catalytic alterations on the basis of three-dimensional protein structure. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1247: 60-64.

Ball MJ Dietary intervention trials. Effect on cardiovascular morbidity and mortality. *Curr Opin Lipidology* 2002; 4:7-12.

Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, de la Cruz Troca JJ, Guallar-Castillon P, del Rey Calero J. Blood pressure in Spain: distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension* 1998; 32:998-1002.

Bakker EN, van Der Meulen ET, Spaan JA, VanBavel E. Organoid culture of cannulated rat resistance arteries: effect of serum factors on vasoactivity and remodeling. *Am J Physiol* 2001; 278:1233-1240.

Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:3561-3568.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998; 102:783-791.

Barja G. Ascorbic acid and aging. In: Harris JR ed. *Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*. New York: Plenum Press. 1996; Vol. 25: 157-188.

Barja G. Radicales libres y antioxidantes. In: *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo*. Madrid: Fundación José Casares Gil: 1997: 21-44.

Barouch FC, Miyamoto K, Allport JR, Fujita K, Bursell SE, Aiello LP, Luscinskas FW, Adamis AP. Integrin-mediated neutrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1153-1158.

Baynes JW. Perspective in diabetes. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. *Diabetes* 1991; 40:405-412.

Beatty S, Kon HH, Henson D, Boulton M. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; 45:115-134.

Bek T. Glial cell involvement in vascular occlusion of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand* 1997 75:239-43.

- Benhamou PY, Carpentier P, Halimi S, Bertrand C, Mouillon M, Franco A. Erythrocyte aggregation in vivo and diabetic microangiopathy. Physiopathologic determinants and clinical correlations. *Diabetes Metab* 1990; 16:192-198.
- Berry C, Brosnan MJ, Fennell J, Hamilton CA, Dominiczak AF. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10:247-255.
- Berryman AM, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Influence of treatment of diabetic rats with combinations of pycnogenol, beta-carotene, and alpha-lipoic acid on parameters of oxidative stress. *J Biochem Mol Toxicol* 2004; 18:345-352.
- Beyer RE. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg Biomembr* 1994; 26:349-358.
- Biaggioni I. Sympathetic control of the circulation in hypertension: lessons from autonomic disorders. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003. 12:175-180.
- Bielski BHJ, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 1985; 258:4759-4761.
- Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems, a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull* 1987; 43: 371-385.
- Blakytyn R, Harding JJ Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem J* 1992; 288:303-307.
- Block G. Ascorbic acid, blood pressure, and the American diet. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 959:180-187.
- Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafer U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, Fainaru M, Green MS. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356:1213-1218.
- Boeri D, Maiello M, Lorenzi M. Increased Prevalence of Microthromboses in Retinal Capillaries of Diabetic Individuals. *Diabetes* 2001; 50:1432-1439.
- Bonafonte S, Garcia CA: Clasificación de la retinopatía diabética. In: *Retinopatía Diabética*. 1st ed. Bonafonte S, Garcia CA, Eds. Madrid, Spain, Harcourt Brace de España 1996 p.63-90.
- Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5:561-568.
- Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes and Metab* 2000; 26:163-176.
- Bolzan AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin Biochem* 1997; 30:449-454.
- Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89:2429-2442.
- Brooks RA, Burrin JM, Kohner EM. Characterization of release of basic fibroblast growth factor from bovine retinal endothelial cells in monolayer cultures. *Biochem J* 1991; 276:113-120.
- Brown JB, Pedula KL, Summers KH. Diabetic Retinopathy Contemporary prevalence in a well-controlled population. *Diabetes Care* 2003; 26:2637-2642.
- Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 12:302-310.

Buettner GR. The pecking order of free radicals & antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol & ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys* 1993; 300:535-543.

Burgos R, Simo R, Audi L, Mateo C, Mesa J, Garcia-Ramirez M, Carrascosa A. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by its serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1997; 40: 1107-1109.

Burgos R, Mateo C, Canton A, Hernandez C, Mesa J, Simó R. Vitreous levels of IGF-I, IGF binding protein 1, and IGF binding protein 3 in proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care* 2000; 23:80-83.

Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA. Retinal blood flow changes in patients with insulin dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37:886-897.

Bursell S-E, Takagi C, Clermont AC, Takag H, Mori F, Ishii H, King GL. Specific retinal DAG and PKC- β isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2711-2720.

Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP, et al. High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type I diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:1245-1252.

Buzney SM, Frank RN, Varma SD, Tanishima T, Gabbay KH. Aldose reductase in retinal mural cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1977; 16:392-396.

Cagliero E, Grant MB, Lorenzi M: Measurement of gene expression human retinal microvessels by solution hybridization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32:1439-1445.

Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* 2002; 16:242-260

Cameron NE, Cotter MA. Impaired contraction and relaxation in aorta from streptozotocin-diabetic rats: role of polyol pathway. *Diabetologia* 1992; 35:1011-1019.

Carmena R, Ros E, Gomez-Gerique JA. Recomendaciones para la prevencion de la arteriosclerosis en España. Documento Oficial de la Soc Esp Arteriosclerosis. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1989; 11-9.

Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 2000; 101:329-335.

Ceriello A., dello RP, Amstad P, and Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 1996; 45:471-477.

Ceriello A, Bortolotti N, Falletti E, Taboga C, Tonutti L, Crescentini A, Motz E, Lizzio S, Russo A, Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20:194-197.

Ciulla TA, Harris A, Latkany P, Piper HC, Arend O, Garzosi H and Martin B. Ocular perfusion abnormalities in Diabetes. *Acta Ophthalmol Scand* 2002; 80:468-477.

Clermont AC, Aiello LP, Mori F, Aiello LM, Bursell SE. Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:433-446.

Comer GM, Ciulla TA. Current and future pharmacological intervention for diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerg Drugs* 2005; 10:441-455.

Comporti M. Lipid and cellular damage in toxic liver injury. *Lab Invest* 1985; 53:599-623.

Comporti M. Lipid peroxidation and biogenic aldehydes: from the identification of 4-hydroxynonenal to further achievements in biopathology. *Free Radic Res* 1998; 28:623-635.

Coudray C, Roussel AM, Mainard F, Arnaud J, Favier A. Lipid peroxidation level and antioxidant micronutrient status in a pre-aging population: Correlation with chronic disease prevalence in a French epidemiological study. *J Am College Nutri* 1997; 16:584-590.

Connor TB Jr, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, de Bustros S, Enger C, Kato H, Lansing M, et al. Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest* 1989; 83:1661-1666.

Conti M, Morand C, Levillain P, Lemmonnier A. Improved fluorometric determination of malondialdehyde. *Clin Chem* 1991; 37:1273-1275.

Cosentino F, Lüscher TF. Effects of blood pressure and glucose on endothelial function. *Curr Hypertens Rep* 2001; 3:79-88.

Chaturvedi P, Sjolie N, Stephenson AK, Abrahamian JM, Keipes H, Castellarin M, Rogulja-Pepeonik A, Fuller J.H. Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* 1998; 351:28-31.

Chen X, Touyz RM, Park JB. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*. 2001; 38:606-611.

Chew EY, Klein ML, Murphy RP, et al. Effects of aspirin on vitreous/preretinal hemorrhage in patients with diabetes mellitus. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study report no. 20. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:52-55.

Chew EY, Klein ML, Ferris FL 3rd, Remaley NA, Murphy RP, Chantry K, Hoogwerf BJ, Miller D. Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:1079-1084.

Chibber R, Molinatti PA, Rosatto N, Lambourne B, and Kohner EM. Toxic action of advanced glycation end products on cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells: relevance to diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1997; 40:156-164.

Chibber R, Molinatti PA, Kohner EM. Intracellular protein glycation in cultured retinal capillary pericytes and endothelial cells exposed to high-glucose concentration. *Cell Mol Biol* 1999; 45:47-57.

Chibber R, Ben Mahmud BM, Coppini D, Christ E, Kohner EM. Activity of the glycosylating enzyme, core 2 GlcNAc (beta1,6) transferase, is higher in polymorphonuclear leukocytes from diabetic patients compared with age-matched control subjects: relevance to capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2000; 49:1724-1730.

Chibber R, Ben-Mahmud BM, Mann GE, Zhang JJ, Kohner EM. Protein kinase C beta2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leukocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2003; 52:1519-1527.

Chuan J, Rouzer CA, Marnett LJ, Pietenpol JA. Induction of cell cycle arrest by the endogenous product of lipid peroxidation, malondialdehyde. *Carcinogenesis* 1998; 19:1275-1283.

Cruickshanks KJ, Moss SE, Klein R, Klein BEK. Physical activity and proliferative retinopathy in persons diagnosed with diabetes before age 30 years. *Diabetes Care* 1992; 15:1267-1272.

Cullen JF, Ireland JT, Oliver MF. A controlled trial of Atromid therapy in exudative diabetic retinopathy. *Trans Ophthalmol Soc UK* 1964; 84:281-295.

Daley ML, Watzke RC, Riddle MC. Early loss of blue-sensitive color vision in patients with type I diabetes. *Diabetes Care* 1987; 10:777-781.

Danser AH, Derkx FH, Admiraal PJ, Deinum J, de Jong PT, Schalekamp MA. Angiotensin levels in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:1008-1018.

Davis MD, Fisher MR, Gangnon RE, Barton F, Aiello LM, Chew EY, Ferris FL 3rd, Knatterud GL. Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report #18. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:233-252.

De La PaZ M, Anderson RE. Region and age-dependent variation in susceptibility of the human retina to lipid peroxidation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:3497-3499.

Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand* 1980; 492: 153-168.

Delcourt C, Cristol JP, Tessier F, Leger CL, Descomps B, Papoz L. Age related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. *Arch Ophthalmol* 1999; 117:1384-1390.

Demopoulos HD, Flamme ES, Pietronigro DD, Seligman ML. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta physiol Scand* 1980; 492:91-119.

Demuth K., Myara I., and Moatti N. Biology of the endothelial cell and atherogenesis. *Ann Biol Clin.*1995; 53:171-191.

Dene BA, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Effects of antioxidant treatment on normal and diabetic rat retinal enzyme activities. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2005; 21:28-35.

Denis U, Lecomte M, Ruggiero D, Wiernsperger N, Lagarde M. Advanced glycation end-products (AGE) induce apoptosis of cultured bovine retinal pericytes: implication of caspases and DAG/ceramide production. *Diabetes* 2001; 50:A192.

Desmettre T, Lecerf JM, Souied EJ. Nutrition et degenerescence maculaire liee a l'age. *J Fr Ophthalmol* 2004; 27:3538-3556.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000; 18:655-673.

Diabetic Retinopathy Study Research Group: Indications for photocoagulation treatment of diabetic retinopathy, DRS Report No 14. *Int Ophthalmol Clin* 1987; 27:239-253.

DiBona GF. Sympathetic nervous system and the kidney in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11:197-200.

Dodson PM, Kritzinger EE. Medical cardiovascular treatment trials: relevant to medical ophthalmology in 1997? *Eye* 1997; 11:3-11.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12222-12226.

- Duffy SJ, Gokce N, Holbrook M, Hunter LM, Biegelsen ES, Huang A, Keaney JF Jr, Vita JA. Effect of ascorbic acid treatment on conduit vessel endothelial dysfunction in patients with hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H528–H534.
- Duncan LJ, Cullen JF, Ireland JT, Nolan J, Clarke BF, Oliver MF. A three year trial of atromid therapy in exudative diabetic retinopathy. *Diabetes* 1968; 17:458–467.
- Duncan BB, Wong TY, Tyroler HA, Davis CE, Fuchs FD. Hypertensive retinopathy and incident coronary heart disease in high risk men. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:1002-1006.
- Dunn PJ, Cole RA, Soeldner JS. Further development and automation of a high pressure liquid chromatography method for the determination of glycosylated hemoglobins. *Metabolism* 1979; 28:777-779.
- El Midaoui A, de Champlain J. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 2002; 39:303–307.
- El Midaoui A, Wu R, de Champlain J. Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *J Hypertens* 2002; 20:1407–1412.
- El Midaoui A, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, de Champlain J. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 2003; 16:173–179.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Photocoagulation for diabetic macular edema ETDRS Report No 1. *Arch Ophthalmol* 1985; 103:1796-1806.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Effects of aspirin treatment on diabetic retinopathy. ETDRS report number 8. *Ophthalmology* 1991; 98:757–765.
- Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group: Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs- An extension of the modified Airlie House Classification. ETDRS Report No. 10. *Ophthalmology* 1991; 98:768-806.
- Ellis EA, Grant MB, Murray FT, Wachowski MB, Guberski DL, Kubilis PS, Luttj GA. Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:111-120.
- Engler CB, Parving HH, Mathiesen ER, Larsen M, Lund-Andersen H. Blood-retina barrier permeability diabetes during ACE inhibition. *Acta Ophthalmol* 1991; 69:581–585.
- Estacio RO, Jeffers BW, Gifford N, Schrier RW: Effect of blood pressure control on diabetic microvascular complications in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23:B54–B64.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods enzymol* 1990; 186:407-421.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:81-128.
- EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* 2000; 355:873–876.
- Falsini B, Piccardi M, Iarossi G, Fadda A, Merendino E, Valentini P Influence of short-term antioxidant supplementation on macular function in age-related maculopathy. *Ophthalmology* 2003; 110:51-61.

Fernandez-Robredo P, Moya D, Rodriguez JA, Garcia-Layana A. Vitamins C and e reduce retinal oxidative stress and nitric oxide metabolites and prevent ultrastructural alterations in porcine hypercholesterolemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46:1140-1146.

Flack JM, Peters R, Shafi T, Alrefai H, Nasser SA, Crook E. Prevention of hypertension and its complications: theoretical basis and guidelines for treatment. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 92-98.

Foster DW. Diabetes Mellitus. In: Fauci AS, Brawnwald E, Isselbacher KJ. *Harrison Principios de Medicina Interna*. Madrid. McGraw-Hill-Interamericana. 1998: 2341-2364

Fraga CG, Shinegaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Nail Acad Sei USA* 1990; 87:4533- 4537

Fridovich L. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201:875-880.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifugate. *Clin Chem* 1972; 18:499.

Florence TM. The role of free radicals in disease. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* 1995; 23:3-7.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-426

Fujiwara Y, Nishihara H, Nakakoshi T, Hasegawa T, Tagami S, Kawakami Y. Elevation of plasma lipid peroxides in non-insulin dependent diabetics with multiple lacunar infarcts. *J Atheroscler Thromb* 1997; 4: 90–95.

Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2003; 348:1925-1927.

Gallou G, Ruelland A, Legras B, Maugendre D, Allannic H, Cloarec L. Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 1993; 214:227–234.

Gardiner TA, Anderson HR, Degenhardt T, Thorpe SR, Baynes JW, Archer DB and Stitt AW. Prevention of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic dogs by a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Diabetologia.* 2003; 46:1269-1275.

Gardner TW, Lieth E, Khin SA, Barber AJ, Bonsall DJ, Leshner T, Rice K, Brennan WA Jr. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:2423–2427.

Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, Lieth E, Tarbell JA. The molecular structure and function of the inner blood–retinal barrier. Penn State Retina Research Group. *Doc Ophthalmol* 1999; 97:229–37.

Gardner TW, Aiello LP: Pathogenesis of diabetic retinopathy, In: Flynn HF, Smiddy W (eds): *Diabetes and Ocular Disease: Past, Present, and Future Therapies*. San Francisco, American Academy of Ophthalmology, 2000, pp 1–17.

Gardner TW, Antonetti DA, Barber AJ, LaNoue KF, Levison SW and The Penn State Retina Research Group. Diabetic Retinopathy: More Than Meets the Eye. *Surv Ophthalmol* 2002; 47:S253–S262.

Gerhardinger C, Brown LF, Roy S, Mizutani M, Zucker CL, Locenzi NI. Expression of vascular endothelial growth factor in the human retina and in nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 1998; 152:1453-1462.

- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273:13313–13316.
- Ghahary A, Luo JM, Gong YW, Chakrabarti S, Sima AA, Murphy LJ. Increased renal aldose reductase activity, immunoreactivity, and mRNA in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1989; 38:1067-1071.
- Gil P, Farinas F, Casado A, Lopez-Fernandez E. Malondialdehyde: a possible marker of ageing. *Gerontology* 2002; 48:209-14.
- Gilbert RE, Kelly DJ, Cox, AJ, Wilkinson-Berka JL, Rumble JR, Osicka T, Panagiotopoulos S, Lee V, Hendrich EC, Jerums G, Cooper ME. Angiotensin converting enzyme inhibition reduces retinal overexpression of vascular endothelial growth factor and hyperpermeability in experimental diabetes. *Diabetologia* 2000; 43:1360–1367.
- Girouard H, Chulak C, Le Jossec M, Lamontagne D, de Champlain J. Chronic antioxidant treatment improves sympathetic function and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2003; 21:179–188.
- Goebel W, Kretzchmar-Gross T. Retinal thickness in diabetic retinopathy: a study using optical coherence tomography (OCT). *Retina* 2002; 22:759-767.
- Goldberg J, Flowerdew G, Smith E, Brody JA, Tso MO. Factors associated with age-related macular degeneration: an analysis of data from the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 1988; 128:700-710.
- Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, and Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; 368:225-229.
- Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand* 1986; 548:47–63.
- Granado F, Olmedilla B, Gil M, Barlett H, Eperjesi F. ¿Un suplemento nutricional ocular ideal? *Ophthal Physiol Opt* 2004; 24:339-349.
- Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Schernthaner G, et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98:469-475.
- Gruber CA, Koets MD, Gruber CA, Koets MD. Quantitation of hemoglobin A1a+b and hemoglobin A1c by automated "high-performance" liquid chromatography. *Clin Chem* 1979; 25:1970-1971.
- Grundy SM, Denke MA. Dietary influences on serum lipids and lipoproteins. *J Lipid Res* 1990; 31:1149-1171.
- Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 1999; 354:447-455.
- Guidelines Subcommittee WHO. World Health Organization-International Society of Hypertension. Hypertension Guidelines for the management of Hypertension. *Hypertension* 1999; 17:151-183.
- Gurler B, Vural H, Yilmaz N, Oguz H, Satıcı A, Aksoy N. The role of oxidative stress in diabetic retinopathy. *Eye* 2000; 14:730-735.

- Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41:1819-1828.
- Guyton AC. Kidneys and fluids in pressure regulation. *Hypertension* 1992; 19:12-18.
- Haffner SM, Agil A, Mykkanen L, Stern MP, Jialal I. Plasma oxidizability in subjects with normal glucose tolerance, impaired glucose tolerance, and NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18:646-653.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1:1396-1397.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. 1999. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Hammes HP, Strodtter D, Weiss A, Bretzel RG, Federlin K, Brownlee M. Secondary intervention with aminoguanidine retards the progression of diabetic retinopathy in the rat model. *Diabetologia* 1995; 38:656-660.
- Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, Schleicher ED. Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia* 1999a; 42:728-736.
- Hammes HP, Brownlee M, Lin J, Schleicher E, Bretzel RG. Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycoxidation product Nepsilon-(carboxymethyl) lysine independently of glycohaemoglobin concentrations. *Diabetologia* 1999b; 42:603-607.
- Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B, Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood pressure lowering on low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. *Lancet* 1998; 351:1755-1762.
- Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2000; 23(2):234-240.
- Hasegawa G, Obayashi H, Kitamura A, Hashimoto M, Shigeta H, Nakamura N, Kondo M, Nishimura CY. Increased levels of aldose reductase in peripheral mononuclear cells from type 2 diabetic patients with microangiopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 45:9-14.
- Hayreh SS. Role of nocturnal arterial hypotension in the development of ocular manifestations of systemic arterial hypertension. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10:474-482.
- Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension: dual processes of remodelling and growth. *Hypertension* 1993; 21:391-397.
- Hebert MJ, Gullans SR, Mackenzie HS, Brady HR. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1b-dependent paracrine loop. *Am J Pathol* 1998; 152:523-532.
- Hendriks T, Assniann RFTA. On the fluorometric assay of circulating lipoperoxides. *Clin Chim Acta* 1988; 174:263-270.
- Hercberg S, Galan P, Preziosi P, Bertrais S, Mennen L, Malvy D, Roussel AM, Favier A, Briancon S. The SU.VI.MAX Study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch Intern Med* 2004; 164:2335-2342.
- Hernández C, Burgos R, Canton A, Garcia-Arumi J, Segura RNI, Sirno R. Vitreous levels of vascular cell adhesion molecule and vascular endothelial growth factor in patients with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study. *Diabetes Care* 2001; 24:516-521.

- Hofman P, Van Blijswijk BC, Gaillard PJ, Vrensen GF, Schlingemann RO. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:861–866.
- Hohman TC, Nishimura C, Robison WG Jr. Aldose reductase and polyol in cultured pericytes of human retinal capillaries. *Exp Eye Res* 1989; 48:55-60.
- Holmes RS, van Oorschot RAH y Vanderberg JL. Aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoenzymes in the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*): tissue and subcellular distribution and biochemical genetics of ALDH3. *Biochem Genet* 1991; 29:163-170.
- Hotta N, Kakuta H, Ando F, Sakamoto N. Current progress in clinical trials of aldose reductase inhibitors in Japan. *Exp Eye Res* 1990; 50:625-628.
- Hubbard LD, Brothers RJ, King WN, Clegg LX, Klein R, Cooper LS, Sharrett AR, Davis MD, Cai J. Methods for evaluation of retinal microvascular abnormalities associated with hypertension/sclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Ophthalmology* 1999; 106:2269-2280.
- Ibrahim YW, Bots ML, Mulder PG, Grobbee DE, Hofman A, de Jong PT. Number of perifoveal vessels in aging, hypertension and atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:1049–1053.
- Igal RA, Caviglia JM, de Gomez Dumm IN, Coleman RA. Diacylglycerol generated in CHO cell plasma membrane by phospholipase C is used for triacylglycerol synthesis. *J Lipid Res* 2001; 42:88–95.
- Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta.* 2001; 305:75-80.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49:1939-1945.
- Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF., Stramm LE, Feener EP, King GL. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 1996; 272:728-731.
- Iwase E, Tawata M, Aida K, Ozaki Y, Kume S, Satoh K, Qi R, Onaya T. A cross-sectional evaluation of spontaneous platelet aggregation in relation to complications in patients with type II diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47:699-705.
- Jaffé M. Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, *Z Physio Chem* 1886; 10:391–400.
- Jennings PE, Jones AF, Florkowski CM, Lunec J, Barnett AH. Increased diene conjugates in diabetic subjects with microangiopathy. *Diabet Med* 1987; 4:452-456.
- Jennings PE, Barnett AH. New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. *Diabet Med* 1988; 5:111-117.
- John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Arkay HA 8140 hemoglobin A1c analyzer. *Clin Chem* 1997; 43:968-75.
- John JH, Ziebland S, Yudkin P, Roe LS, Neil HA; Oxford Fruit and Vegetable Study Group. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. *The Lancet* 2002; 359:1969–1974.

- Kadish AH, Hall DA. A New Method for the Continuous Monitoring of Blood Glucose by Measurement of Dissolved Oxygen. *Clin Chem* 1965; 11:869.
- Kalfa TA, Gerritsen ME, Carlson EC, Binstock AJ, Tsilibary EC. Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:2358-2367.
- Keegan A, Walbank H, Cotter MA, Cameron NE. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Diabetologia* 1995; 38:1475-1478.
- Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu, Zn, Superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7381- 7385.
- Kern TS, Engerman RL. Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy. Aminoguanidine and aspirin. *Diabetes* 2001; 50:1636-1642.
- Kerr S, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension : role of the endothelium. *Hypertension* 1999; 33:1353-1358.
- Keith NM, Wagener HP, Barker NW: Some different types of essential hypertension: their course and prognosis. *Am J Med Sci* 1939; 197:332-43.
- Klein R and Klein BEK. Vision Disorders in Diabetes In: Harris MI, Cowie CC, Stern MP, Boyko EJ, Reiber GE, Bennett PH, eds. *Diabetes in America*. 2nd ed. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1995; DHHS publication no. (NIH)95-1468, p. 293-338.
- Klein R, Klein BEK, Moss SE. Visual Impairment in Diabetes. *Ophthalmology* 1984; 91:1-9.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984a; 102:520-526.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984b; 102:527-532.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, et al. The Wisconsin Epidemiology Study of Diabetic Retinopathy: V. Proteinuria and retinopathy in a population of diabetic persons diagnosed prior to 30 years of age. In: Friedman EA, L'Esperance Jr FA, eds. *Diabetic Renal-Retinal Syndrome 3*. Orlando, FL: Grune & Stratton, 1986.
- Klein BE, Moss SE, Klein R, Surawicz TS. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XIII. Relationship of serum cholesterol to retinopathy and hard exudate. *Ophthalmology* 1991; 98:1261-1265.
- Klein R, Moss SE, Klein BE. Is gross proteinuria a risk factor for the incidence of proliferative diabetic retinopathy? *Ophthalmology* 1993; 100:1140-1146.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994a; 112:1217-1228.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. Relationship of hyperglycemia to the long-term incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Intern Med* 1994b; 154:2169-2178.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Wang Q. Hypertension and retinopathy, arteriolar narrowing, and arteriovenous nicking in a population. *Arch Ophthalmol* 1994c; 112:92-98.

Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14- year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1998; 105:1801–1815.

Klein BE, Klein R, Moss SE. Is serum cholesterol associated with progression of diabetic retinopathy or macular edema in persons with younger-onset diabetes of long duration? *Am J Ophthalmol* 1999; 128:652-654.

Klein R, Sharrett AR, Klein BE, Moss SE for the ARIC group. The association of atherosclerosis, vascular risk factors, and retinopathy in adults with diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Ophthalmology* 2002;109:1225-1234.

Klein R, Marino EK, cardiovascular disease to retinopathy in Kuller LH, Polak JF, Tracy RP, Gottdiener JS, Burke GL, Hubbard LD, Boineau R. The relation of atherosclerotic people with diabetes in the Cardiovascular Health Study. *Br J Ophthalmol* 2002; 86:3-4.

Kocak G, Aktan F, Canbolat O, Ozogul C, Elbeg S, Yildizoglu-Ari N, Karasu C, and The ADIC Study group. Antioxidants in Diabetes-Induced Complications Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. *Diabetes Nutr Metab* 2000; 13:308-318.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30:620-650.

Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucoseinduced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998; 101:160-169.

Koller A. Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension. *Microcirculation* 2002; 9:277– 294.

Koskela TK, Reiss GR, Brubaker RF. Is the high concentration of ascorbic acid in the eye an adaptation to intense solar radiation? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:2265-2267.

Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL, Armstrong D. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. III. Effects of antioxidants. *Diabetes* 1996; 45:233-1237.

Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med* 1997; 22:587-592.

Kowluru RA. Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetol* 2001a; 38:179–185.

Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001b; 50:1938-1942.

Kowluru RA, Odenbach S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes* 2004; 53:3233-3238.

Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47:859–866.

Krinsky NL. Actions of carotenoids in biological systems. *Anon Rev Nutr* 1993;13:561-587.

Kristinsson JK, Gottfredsdottir MS, Stefansson E. Retinal vessel dilatation and elongation precedes diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol* 1997; 81:274–278.

Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59:612-619.

Kumar KV, Das UN. Are free radicals involved in the pathobiology of human essential hypertension? *Free Rad Res Commun* 1993; 19:59-66.

Kumar CA, Das UN. Lipid peroxides, anti-oxidants and nitric oxide in patients with pre-eclampsia and essential hypertension. *Med Sci Monit* 2000; 6:901-907.

Kunisaki M, Bursell S-E, Clermont AC, Ishii H, Ballas LM, Jirousek MR, Umeda F, Nawata H, King GL. Vitamin E treatment prevents diabetes-induced abnormality in retinal blood flow via the diacylglycerol - protein kinase C pathway. *Am J Physiol* 1995; 269:239-246.

Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:291-303.

Lagarde M, Burtin M, Berciaud P, Blanc M, Velardo B, Dechavanne M. Increase of platelet thromboxane A2 formation and of its plasmatic half-life in diabetes mellitus. *Thromb Res* 1980; 19:823-830.

Lalouel JM, Rohrwasser A. Development of genetic hypotheses in essential hypertension. *J Hum Genet* 2001; 46:299-306.

Lee PP, Feldman ZW, Ostermann J, Brown DS, Sloan FA. Longitudinal prevalence of major eye diseases. *Arch Ophthalmol* 2003; 121:1303-1310.

Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Strijker-Boudier HAJ. Microcirculation in hypertension. A new target for treatment. *Circulation* 2001; 104:735-740.

Li W, Liu X, Yanoff M, Cohen S, Ye X. Cultured retinal capillary pericytes die by apoptosis after an abrupt fluctuation from high to low glucose levels: a comparative study with retinal capillary endothelial cells. *Diabetologia* 1996; 39:537-547.

Li W, Yanoff M, Liu X, and Ye X. Retinal capillary pericyte apoptosis in early human diabetic retinopathy. *Chin Med J* 1997; 110:659-663.

Lieth E, LaNoue KF, Antonetti DA, Ratz M. Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group. *Exp Eye Res* 2000; 70:723-730.

Lifton RP. Genetic determinants of human hypertension. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:8545-8551.

Liles M, Newsome D, Oliver P. Antioxidant Enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 1991; 103:1285-1288.

Lind L, Lithell H, Skarfors E, Wide L, Ljunghall S. Reduction of blood pressure by treatment with alphacalcidol. A double-blind, placebo-controlled study in patients with impaired glucose tolerance. *Acta Med Scand* 1988; 223:211-217.

Lind L, Wengle B, Ljunghall S. Reduction of blood pressure during long-term treatment with active vitamin D (alphacalcidol) is dependent on plasma renin activity and calcium status: A double-blind, placebo-controlled study. *Am J Hypertens* 1989; 2:20-25.

Lombera F, Barrios V, Soria F, Placer L, Cruz JM, Tomás L, Rodríguez L, González JR. Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol* 2000; 53:66-90.

Losada M, Alio JL. Malondialdehyde serum concentration in type 1 diabetics with and without retinopathy. *Doc Ophthalmol* 1996; 93:223-229.

- Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1362–1369.
- Lu M, Perez VL, MaN, Miyamoto K, Peng HB, Liao JK, Adamis AP VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:1808–1812.
- Lu M, Kuroki M, Amano S, Tolentino M, Keough K, Kim I, Bucala R, Adamis AP. Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *Clin. Invest* 1998; 101: 1219–1224.
- Ludvigson MA, Sorenson RL. Immunohistochemical localization of aldose reductase. II. Rat eye and kidney. *Diabetes* 1980; 29:450-459.
- Lund-Andersen. Mechanisms for Monitoring Changes in Retinal Status Following Therapeutic Intervention in Diabetic Retinopathy. *Surv Ophthalmol* 2002; 47: S270–S277.
- Lupu C, Rizescu M, Calb M. Altered distribution of some surface glycosaminoglycans and lycoconjugates on human blood platelets in diabetes mellitus. *Platelets* 1994; 5:201-208.
- Lutty GA, McLeod DS, Merges C. Localization of vascular endothelial growth factor in human retina and choroid. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 971.
- Makino M, Taniko K, Ichikawa K, Okuyama M, Furuta Y, Kato N, Nakayama Y, Jomori T. Effects of aldose reductase inhibition on the retinal vascular permeability of streptozotocin-diabetic rats and VEGF production in cultured human retinal cells. *Diabetes* 2001; 50:193.
- Mares-Davis EJ, Bell R A, Reboussin BA, Rushin J, Marshall JA, Hamman RF. Antioxidant nutrient intake and diabetic retinopathy. The San Luis Valley Diabetes Study. *Ophthalmol* 1998; 105:2264-2270.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17:24–38.
- Márquez R, Desco MC, Asensi M, Viña J. *Nutrición y Obesidad* 2000; 3: 245 – 250.
- Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002; 181-182:219- /222.
- Mandarino LJ, Sundarraj N, Finlayson J, Hassell HR. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res* 1993; 57:609-621.
- Mansour SZ, Hatchell DL, Chandler D, Saloupis P, Hatchell MC. Reduction of basement membrane thickening in diabetic cat retina by sulindac. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:457–463.
- Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 1997; 27:484-490.
- McCord JM. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J med* 1985; 312:159-163.
- Menon V, Ram M, Dorn J, Armstrong D, Muti P, Freudenheim JL, Browne R, Schunemann H, Trevisan M. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. *Diabet Med* 2004; 21:1346-1352.
- Merimee TJ, Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med* 1983; 309:527-530.

- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72:835–846.
- Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Apple LJ, Guallar E. Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. *Ann Intern Med*, 2005; 142:60520-60553.
- Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998; 82:1298-1305.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993; 84:407-12.
- Minuz P, Patrignani P, Gaino S, Seta F, Capone ML, Tacconelli S, Degan M, Faccini G, Fornasiero A, Talamini G, Tommasoli R, Arosio E, Santonastaso CL, Lechi A, Patrono C. Determinants of platelet activation in human essential hypertension. *Hypertension*. 2004; 43:64-70.
- Miranda M, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Araiz J, Roma J, Romero FJ. Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy: treatment with antioxidants. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004; 79:289-94.
- Mittac T. Role of oxygen radicals in ocular inflammation and cellular damage. *Exp Eye Res* 1984; 39:7559-7769.
- Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Clermont AC, Aiello LP, Ogura Y, Adamis AP. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:10836-10841.
- Miyata T, Sugiyama S, Suzuki D, Inagi R, Kurokawa K. Increased carbonyl modification by lipids and carbohydrates in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 1999a; 71:S54-S56.
- Miyata T, Van Ypersele DS, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in longterm uremic complications. *Kidney Int* 1999b; 55:389-399.
- Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of retinal microvascular cells in human and experimental diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 1996; 97:2883–2890.
- Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Muller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 1988; 47:445–449.
- Miwa K, Nakamura J, Hamada Y, Naruse N, Nakashima E, Kato K, Kasuya Y, Yasuda Y, Kamiya H, Hotta N. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2003; 60:1-9.
- Montoliu C, Pinazo-Duran MD, Guerri C. Mecanismos de protección frente a los radicales libres en las estructuras del globo ocular de la rata. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1996; 70:139-148.
- Mooradian AD. Increased serum conjugated dienes in elderly diabetic patients. *J Am Geriatr Soc* 1991; 39: 571–574.
- Mori K, Duh E, Gehlbach P, Ando A, Takahashi K, Pearlman J, Mori K, Yang HS, Zack DJ, Eddyreddy D, Brough DE, Wei LL, Campochiaro PA. Pigment epithelium-derived factor inhibits retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2001; 188:253–263.

- Morrison, B. Use of the Beckman Glucose Analyzer for Low and High Glucose Values. *Clin Chem Acta* 1972; 42:192.
- Moss SE, Klein R, Klein BEK: Alcohol consumption and the prevalence of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 1992; 99:926-32.
- Moss SE, Klein R, Klein BEK Factors associated with having eye examinations in persons with diabetes. *Arch Fam Med* 1995; 4:529-534.
- Moustafa SA. Zinc might protect oxidative changes in the retina and pancreas at the early stage of diabetic rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004 ;201:149-55.
- Muhlhauser I. Cigarette smoking and diabetes: an update. *Diabet Med* 1994; 11:336–343.
- Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodelling. *Hypertension* 1996;28:505–506.
- Mulvany MJ. Small Artery Remodeling in Hypertension. *Current Hypertension Reports* 2002; 4:49–55.
- Naruse K, Nakamura J, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Komori T, Kato K, Kasuya Y, Miwa K, Hotta N. Aldose reductase inhibition prevents glucose-induced apoptosis in cultured bovine retinal microvascular pericytes. *Exp Eye Res* 2000; 71:309-315.
- Nayak RC, Agardh CD, Kwok MG, Stjernquist H, Farthing-Nayak PJ, Agardh E. Circulating anti-pericyte autoantibodies are present in Type 2 diabetic patients and are associated with non-proliferative retinopathy. *Diabetologia*. 2003; 46:511-513.
- Nerlich AG, Sauer U, Kolm-Litty V, Wagner E, Koch M, Schleicher ED. Expression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in human tissues: evidence for high variability and distinct regulation in diabetes. *Diabetes* 1998; 47:170-178.
- Nishigaki I, Hagihara M, Tsunekawa H, Maseki M, Yagi K: Lipid peroxide levels of s e rum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem Med* 1981; 25:373–378.
- Nishimura C, Hotta Y, Gui T, Seko A, Fujimaki T, Ishikawa T, Hayakawa M, Kanai A, Saito T. The level of erythrocyte aldose reductase is associated with the severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 37:173-177.
- Niskanen LK, Salonen JT, Nyyssonen K, Uusitupa MI. Plasma lipid peroxidation and hyperglycaemia: a connection through hyperinsulinaemia? *Diabet Med* 1995; 12:802–808.
- Noguchi T, Ikeda K, Sasaki Y, Yamamoto J, Seki J, Yamagata K, Nara Y, Hara H, Kakuta H, Yamori Y. Effects of vitamin E and sesamin on hypertension and cerebral thrombogenesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2001; 24:735–742.
- Nordoy A, Goudnight SH. Dietary lipids and thrombosis. *Arteriosclerosis* 1990; 10:149-163
- Oberly LW. Free radicals and diabetes. *Free Rad Biol Med* 1988; 5:113-124.
- Obrosova IG, Gathallah L, Green DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: Effect of DL- α -lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 2000; 398:139-146.
- Obrosova IG, Minchenko AG, Marinescu V, Fathallah L, Kennedy A, Stockert CM, Frank RN, Stevens MJ. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 2001; 44:1102-1110.

- Obrosova IG, Minchenko AG, Vasupuram R, White L, Abatan OI, Kumagai AK, Frank RN, Stevens MJ. Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes*. 2003; 52:864-871.
- Olczyk K, Koscielniak-Kocurek E, Sonecki P, Zdenkowski W. The lipid peroxidation products and the enzymes of antioxidant system in patients with diabetes mellitus. *Rocz Akad Med Bialymst* 1994; 39:93-99.
- O'Neill M E, Carroll Y, Corridan B, Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Van de Berg H, Hinnering I, Rousell AM, Chopra M, Southon S, Thurnmhan DI A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study *British J Nutr* 2001; 85:499-507.
- Qi JH, Claesson-Welsh L. VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. *Exp Cell Res* 2001; 263:173-182.
- Okamoto T, Tanaka S, Stan AC, Koike T, Kase M, Makita Z. Advanced glycation end products induce angiogenesis in vivo. *Microvasc Res* 2002; 63:186-195.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL Jr, Valanis B, Williams JH Jr, Barnhart S, Cherniack MG, Brodtkin CA, Hammar S. Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J Natl Cancer Inst* 1996a; 88:1550-1559.
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 1996b; 334:1150-1155.
- On YK, Kim CH, Sohn DW, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS. Improvement of endothelial function and vitamin C in essential hypertension. *Korean J Intern Med* 2002; 17:131-137.
- O'Neill M E, Carroll Y, Corridan B, Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Van de Berg H, Hinnering I, Rousell AM, Chopra M, Southon S, Thurnmhan DI A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study *British J Nutr* 2001; 85:499-507.
- Ostermann H, van de LJ. Factors of the hemostatic system in diabetic patients. A survey of controlled studies. *Haemostasis* 1986 ; 16 :386-416.
- Paget C. Effets du glucose et des produits avancés de glycation sur le métabolisme oxygéné des acides gras, la peroxydation lipidique et les antioxydants des cellules microvasculaires rétiniennees. Tesis Bioquímica. Lyon: INSA de Lyon, 1998, 201 p.
- Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. En: Packer L y Glazer AN. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press Inc: 1990; Vol 186:209-220
- Paolini M, Abdel-Rahman SZ, Sapone A, Pedulli GF, Perocco P, Cantelli-Forti G, Legator MS. Beta-carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? *Mutat Res* 2003; 543:195-200.
- Palumbo G, Avanzini F, Alli C, Roncaglioni MC, Ronchi E, Cristofari M, Capra A, Rossi S, Nosotti L, Costantini C, Cavalera C. Effects of vitamin E on clinic and ambulatory blood pressure in treated hypertensive patients. Collaborative Group of the primary Prevention Project (PPP)—Hypertension study. *Am J Hypertens*. 2000; 13:564-567.
- Park JY, Takahara N, Gabriele A, Chou E, Naruse K, Suzuma K, Yamauchi T, Ha SW, Meier M, Rhodes CJ, King GL. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes* 2000; 49:1239-1248.

- Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1:255-284.
- Pfeiffer A, Middelberg-Bisping K, Drewes C, Schatz H. Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 in NIDDM. *Diabetes Care* 1996; 19:1113-1117.
- Pinazo-Duran MD, Iborra FJ, Guerri C, Renau-Piqueras. Estudio comparativo de los mecanismos de producción de radicales libres en el globo ocular: peroxidación lipídica via citocromo P450. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1995; 68:111-116
- Pinazo-Duran MD, Verdejo C, Montoliu C, Guerri C. Formación de radicales libres en el globo ocular durante la intoxicación alcohólica crónica. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1999; 74:251-260.
- Pinazo-Duran MD, Verdejo C, Azorin C, Renal-Piqueras J, Iborra FJ. Colocalization of Aldehyde Dehydrogenases and Fe/NADPH-Induced Lipid Peroxidation in Tissue Sections of Rat Retina. *Ophthalmic Res* 2000; 32:61-68.
- Pinazo-Durán MD, Sevilla-Romero E, Calvet-Henry J, Verdejo C, por el grupo multicéntrico de estudio sobre retinopatías vasculares. Estudio del estado oxidativo y antioxidante en la diabetes mellitus y la hipertensión arterial esencial, en una población oftalmológica. *Bol Soc Oftalmol Madrid*. 2001; 41:55-64.
- Pinazo-Durán MD, Marco P, Verdejo C, por el grupo multicéntrico de estudio sobre retinopatías vasculares. Role of free radicals in diabetic and hypertension retinopathies. Proceedings of the 14th congress of the European Society of Ophthalmology, Madrid 2003. ISBN 88-323-3132-2 pp 31-36.
- Piñero Bustamante A. Aparato ocular: Anatomía Fisiología. Patología. Barcelona. Pharma Consult. 1992:39.
- Peuchant E, Delmas-Beauvieux MC, Couchouron A, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, Clerc M, Gin H: Short - term insulin therapy and normoglycemia: effects on erythrocyte lipid peroxidation in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20:202-207.
- Pezeshk A, Derick Dalhouse A. Vitamin E, membrane fluidity, and blood pressure in hypertensive and normotensive rats. *Life Sci*. 2000; 67:1881-1889.
- Pou S, Keaton L, Surichamorn W, Rosen GM. Mechanism of superoxide generation by neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274:9573-80.
- Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Design principles of vascular beds. *Circ Res* 1995; 77:1017-1023.
- Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of retinal Muller cells. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2002; 100:339-52.
- Raghuveer G, Sinkey CA, Chenard C, Stumbo P, Haynes WG. Effect of vitamin E on resistance vessel endothelial dysfunction induced by methionine. *Am J Cardiol*. 2001; 88:285-290.
- Qiao Q, Keinänen-Kiukkaanniemi S, Laara E. The relationship between hemoglobin levels and diabetic retinopathy. *J Clin Epidemiol* 1997; 50:153-158.
- Rahn KH, Barenbrock M, Hausberg M. The sympathetic nervous system in the pathogenesis of hypertension. *J Hypertens* 1999; 17:S11-S14.
- Raz I, Havivi Y, Yarom R. Reduced negative surface charge on arterial endothelium of diabetic rats. *Diabetologia* 1988; 31:618-620.
- Rea RF. Cardiopulmonary baroreflexes and central blood volume. In: Izzo JL, Black HR, Taubert TA, eds. *Hypertension primer*. Dallas: American Heart Association, 1993:71-72.

- Redón J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, Saez GT. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension*. 2003; 41:1096-1101.
- Redón Más J, Giner Galván V. Genética de la hipertensión arterial. *Rev Lat Cardiol* 2002; 23:136-143.
- Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21:S5-S19.
- Rellier N, Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. *Life Sci* 1999; 64:1571-1583.
- Rema M, Mohan V, Bhaskar A, Shanmugasundaram KR. Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy? *Indian J Ophthalmol* 1995; 43:17-21.
- Richard MJ, Portal B, MooJ, Coudray C, Hadjian A, FavierA. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 1992; 38:704-709.
- Richer S, Stiles W, Statkute L, Pulido J, Frankowski J, Rudy D, Pei K, Tsipursky M, Nyland J. Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial). *Optometry* 2004; 75:216-230.
- Ritz E, Keller C, Bergis K, Strojek K. Pathogenesis and course of renal disease in IDDM/NIDDM: differences and similarities. *Am J Hypertens* 1997; 10:202S-207S.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362:801-809.
- Ruggiero D, Lecomte M, Michoud E, Lagarde M, Wiernsperger N. Involvement of cell-cell interactions in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Metab* 1997; 23: 30-42.
- Ruggiero-Lopez D, Rellier N, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. Growth modulation of retinal microvascular cells by early and advanced glycation products. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 34:135-142.
- Rungger-Brandle E, Dosso AA, Leuenberger PM: Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1971-1980.
- Russo C, Olivieri O, Girelli D, Faccini G, Zenari ML, Lombarda S and Corrocher R. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *Journal of Hypertension* 1998; 16:1267-1271.
- Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* 1992; 111:103-108.
- Salonen JT, Nyyssonen K, Salonen R, Lakka HM, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Lakka TA, Rissanen T, Leskinen L, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Poulsen HE. Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 2000; 248:377-386.
- Sander B, Larsen M, Moldow B, Lund-Andersen H. Diabetic macular edema: passive and active transport of fluorescein through the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:433-438.
- Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997; 46:1853-1858.

Sato S, Secchi EF, Lizak MJ, Fukase S, Ohta N, Murata M, Tsai JY, Kador P.F. Polyol formation and NADPH-dependent reductases in dog retinal capillary pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:697-704.

Sato E, Mori F, Igarashi S, Abiko T, Takeda M, Ishiko S, Yoshida A. Corneal advanced glycation end products increase in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2001; 24:479-482.

Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yai K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 1979; 21:104-107.

Sayeski PP, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- α gene transcription. *J Biol Chem* 1996; 271:15237-15243.

Schorck NJ. Genetically complex cardiovascular traits. Origins, problems, and potential solutions. *Hypertension* 1997; 29:145-149.

Scott AR, Dhindsa P, Forsyth J, Mansell P Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular risk factors in postmenopausal women with diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2004; 6:16-22.

Scheie HG. Evaluation of ophthalmoscopic changes of hypertension and arteriolar sclerosis. *Arch Ophthalmol* 1953; 49:117-138.

Schouten EG, Vandenbroucke JP, van der Heide-Wessel C, van der Heide RM. Retinopathy as an independent indicator of all-causes mortality. *Int J Epidemiol* 1986; 15:234-236.

Sebag J, McMeel JW. Diabetic retinopathy: pathogenesis and the role of retina-derived growth factor in angiogenesis. *Surv Ophthalmol* 1986; 30:377-384.

Sechi LA., Ceriello A., Griffin CA, Catena C, Amstad P, Schambelan M, Bartoli E. Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997; 40:23-29.

Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, Farber MD, Gragoudas ES, Haller J, Miller DT, et al. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age related macular degeneration. *JAMA* 1994; 272:1413-1420.

Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Rivière J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J and Revol A. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clinica Chimica Acta* 2002; 321:89-96

Sen K, Misra A, Kumar A, Pandey RM. Simvastatin retards progression of retinopathy in diabetic patients with hypercholesterolemia. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 56:1-11.

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity. Upstream mediators. *Circ Res* 2002; 91:406-413.

Sharrett AR, Hubbard LD, Cooper LS, Sorlie PD, Brothers RJ, Nieto FJ, Pinsky JL, Klein R. Retinal arteriolar diameters and elevated blood pressure: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Am J Epidemiol* 1999; 150:263-270.

Shimizu H, Ohtani KI, Tsuchiya T, Sato N, Tanaka Y, Takahashi H, Uehara Y, Inukai T, Mori M. Aldose reductase mRNA expression is associated with rapid development of diabetic microangiopathy in Japanese Type 2 diabetic (T2DM) patients. *Diabetes Nutr Metab* 2000; 13:75-79.

- Simonsen SE. The value of the oscillatory potential in selecting juvenile diabetics at risk of developing proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol* 1980; 58:865– 878.
- Simpson DA, Murphy GM, Bhaduri T, Gardiner TA, Archer DB, Stitt AW. Expression of the VEGF genefamily during retinal vaso-obliteration and hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262:333–340.
- Sivalingam A, Kenney JK, Brown GC. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:869-872.
- Sjolie Ak, Stephenson J, Aldington S for the multicenter study group. Retinopathy and vision loss in insulin dependent diabetes in Europe. The EURODIAB IDDM Complications Study. *Ophthalmology* 1997; 104:252-260.
- Smardo FL Jr, Burg MB, Garcia-Perez A. Kidney aldose reductase gene transcription is osmotically regulated. *Am J Physiol* 1992; 262:C776-C782.
- Spalton DJ, Marshall J. Signos físicos de patología retiniana. En: Atlas de Oftalmología Clínica. Mosby Doyma Ed. Madrid. 1995 cap. 13 pp 12-30
- Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; 43:550-557.
- Smith G, McLeod D, Foreman D, Boulton M. Immunolocalisation of the VEGF receptors FLT-1, KDR, and FLT-4 in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:486–494.
- Sjolie Ak, Stephenson J, Aldington S for the multicenter study group. Retinopathy and vision loss in insulin dependent diabetes in Europe. The EURODIAB IDDM Complications Study. *Ophthalmology* 1997; 104:252-260.
- Sorbinil Retinopathy Trial Research Group A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:1234-1244.
- Speicher MA, Danis RP, Criswell M and Pratt L. Pharmacologic therapy for diabetic retinopathy. *Expert Opin Emerging Drugs* 2003; 8::239-250.
- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science* 1992; 257:1220-1224.
- Stahl W Macular carotenoids: Lutein and Zeaxanthin. *Dev Ophthalmol* 2005; 38:70-88.
- Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol* 1997; 150:523-531.
- Stitt AW, Bhaduri T, McMullen CB, Gardiner TA, Archer DB. Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3:380-388.
- Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR. The novel advanced glycation endproduct (AGE) inhibitor pyridoxamine prevents retinal vascular death during diabetic retinopathy. *Diabetes* 2002; 51:2826–2832.
- Stitt AW. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Experimental and Molecular Pathology* 2003; 75:95–108.
- Strandness DE, Priest R, Gibbons GE. Combined clinical and pathological study of diabetic and non-diabetic peripheral arterial disease. *Diabetes* 1964; 13:366-372.

Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 2001; 276:14533-14536.

Suematsu T, Matsumura T, Sato N, Miyamoto T, Ooka T, Kamada T, Abe H. Lipid peroxidation in alcoholic liver disease in humans. *Alcoholism Clin Exp Res* 1981; 5:427-430.

Suganuma T, Ohta T, Tsuyama S, Kamada T, Otsuji S, Murata F. Qualitative and quantitative analysis of erythrocyte surface membrane sialyl residues using affinity cytochemistry with special reference to diabetic patients. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1985; 49:1-11.

Sullivan JL. Iron, plasma antioxidants and the oxygen radical disease of prematurity *Am J Dis Child* 1988; 142:1341-1344.

Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996; 90: 255–260.

Suzuma K, Naruse K, Suzuma I, Takahara N, Ueki K, Aiello LP, King GL. Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via KDR, Flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-akt-dependent pathways in retinal vascular cells. *J Biol Chem* 2000; 275:40725–40731.

Svardsudd K, Wedel H, Aurell E, Tibblin G. Hypertensive eye ground changes. Prevalence, relation to blood pressure and prognostic importance. The study of men born in 1913. *Acta Med Scand* 1978; 204:159–167.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLCgamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 2001; 20:2768–2778.

Talke H, Schubert GE. Enzymatic urea determination in the blood and serum in the warburg optical test. *Klin Wochenschr.* 1965; 43:174-175.

The AREDS Research Group (Age-Related Eye Disease Study Research Group). The age-related eye disease study (AREDS): design implications AREDS report No 1. *Control Clin Trials* 1999; 20:573-600.

The AREDS Research Group (Age-Related Eye Disease Study Research Group). A randomized placebo-controlled clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E beta carotene and zinc for age-related macular degeneration and vision loss- AREDS report No 9. *Arch Ophthalmol* 2001a; 119:1417-1436.

The AREDS Research Group (Age-Related Eye Disease Study Research Group). A randomized placebo-controlled clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E beta carotene for age-related cataract and vision loss- AREDS report No 9. *Arch Ophthalmol* 2001b; 119b:1439-1452.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. DCCTRG report. *N Engl J Med* 1993; 329:977-986.

The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group: Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med* 2000; 342:381-389.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care* 2000; 23:1084–1091.

The fifth report on the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC V). Arch Intern Med 1993; 153:154.

The Framingham Heart Study .Franklin SS, Larson MG, Khan SA, Wong ND, Leip EP, Kannel WB, Levy D. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease change with aging? Circulation 2001; 103:1245–1249.

The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. Prev Med 1976; 5:207-215.

Thiele GM, Worrall S, Tuma DJ, Klassen LW, Wyatt TA y Nagata N. The Chemistry and Biological Effects of Malondialdehyde-Acetaldehyde Adducts. Alcohol Clin Exp Res 2001; 25:281S-2245S.

Tiffany TO, Jansen JM, Burtis CA, Overton JB, Scott CD. Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of GeMSAEC fast analyzer. Clin Chem 1972;18:829-840.

Timimi FK, Ting HH, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. J Am Coll Cardiol 1998; 31:552–557.

Tomlinson DR, Stevens EJ, Diemel LT. Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. Trends Pharmacol Sci 1994; 15:293-297.

Tooke JE, Brash PD. Microvascular aspects of diabetic foot disease. Diabet Med 1996; 13:S26-S29.

Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure: implications in the pathogenesis of hypertension. Can J Cardiol 2000; 16:1137–1146.

Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. Current Opinion in Nephrology and Hypertension 2003, 12:165–174.

Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1999; 264:781–788.

Tschoepe D, Driesch E, Schwippert B, Nieuwenhuis HK, Gries FA. Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia. Diabetes 1995; 44:890-894.

Tso MO, Jampol LM: Pathophysiology of hypertensive retinopathy. Ophthalmology 1982; 89:1132–1145.

Tso MOM, Abrams GW, Jampol LM: Hypertensive retinopathy, choroidopathy, and optic neuropathy: a clinical and pathophysiological approach to classification, In: Singerman LJ, Jampol LM (eds): Retinal and Choroidal Manifestations of Systemic Disease. Baltimore, Williams and Wilkins, 1991, pp 79–127

Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, Bayraktar N. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. Acta Diabetol. 2002; 39:117-122.

Uemura K, Pisa Z. Trends in cardiovascular disease mortality in industrialised countries since 1950. World Health Stat Q 1998; 41:155-168.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998a; 352:837-853.

UK Prospective Diabetes Study Group .Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. BMJ 1998; 317:703–713.

- Ulker S, McKeown PP, Bayraktutan U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. *Hypertension* 2003; 41:534–539.
- Van Der Hagen, A, Yolton DP, Kaminski MS, Yolton RL: Free radical and antioxidant supplementation: a review of their roles in age related macular degeneration *J Am Optom Assoc* 2003; 64:871-878.
- Van Leiden HA, Dekker JM, Moll AC, Nijpels G, Heine RJ, Outer LM, Stehouwer CD, Polak BC. Blood pressure, lipids, and obesity are associated with retinopathy: The hoorn study. *Diabetes Care* 2002; 25:1320-1325.
- Van Leiden HA, Kedder JM, Moll AC, Nijpels G, Heine RJ, Outer LM, Stehouwer CD, Polak BC. Risk factors for incident retinopathy in a diabetic and non diabetic population: The hoorn study. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 245-251.
- van Gerven JM, Boot JP, Lemkes HH, van Best JA. Effects of aldose reductase inhibition with tolrestat on diabetic retinopathy in a six months double blind trial. *Doc Ophthalmol* 1994; 87:355-365.
- Verdejo C, Marco P Pinazo-Duiran MD Portoles M Gonzalez Tomas J Peroxidacion lipidica en la vitreoretinopatía proliferante y en las retinopatías vasculares. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1997; 72:393-400.
- Verdejo C, Marco P, Pinazo-Duran MD. Análisis cuantitativo del ADN en el vítreo y consideraciones sobre el daño oxidativo en las vitreo-retinopatías. *St Ophtham.* 1998; 17:273-244.
- Verdejo C Marco P, Renau-Piqueras J, Gonzalez Tomas J, Pinazo Duran MD Formacion de radicales libres y actividad antioxidante en la retinopatía diabética proliferativa. *Arch Soc Esp Oftalmol* 1999; 74:243-250
- Verdejo C, Marco P, Renau-Piqueras J, Pinazo-Duran MD. Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies. *Eye* 1999; 13:183-188.
- Vinores SA, Campochiaro PA, Williams EH, May EE, Green WR, Sorenson RL. Aldose reductase expression in human diabetic retina and retinal pigment epithelium. *Diabetes* 1988; 37:1658-1664.
- Visscher TI, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 2001; 22:355-375.
- Vitale S. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: What can we learn at 14 years? *Ophthalmology* 1998; 105:1799-1800
- Voziyan PA, Metz TO, Baynes JW, Hudson BG. A post- Amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J Biol Chem* 2002; 277:3397–3403.
- Vucić M, Gavella M, Bozиков V, Ashcroft SJ, Rocic B. Superoxide dismutase activity in lymphocytes and polymorphonuclear cells of diabetic patients. *European J Clin Chem Biochem* 1997; 35:517–521.
- Wagner J, Jan Danser AH, Derkx FH, de Jong TV, Paul M, Mullins JJ, Schalekamp MA, Ganten D. Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol* 1996; 80:159–163.
- Walter RM, Uriu-Hare JY, Olin KL, Oster MH, Anawalt BD, Critchfield JW, Keen CL. Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991; 14:1050–1056.

Wang HD, Hope S, Du Y, Quinn MT, Cayatte A, Pagano PJ, Cohen RA. Paracrine role of adventitial superoxide anion in spontaneous tone in the isolated rat aorta in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 1999; 33:1225-1232.

Watson BD. Evaluation of the concomitance of lipid peroxidation in experimental models of cerebral ischemia and stroke. *Progress in Brain Res.* 1993; 96:69-95.

Weitzel F, Ursini F, Wendel A. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in various mouse organs during selenium deficiency and repletion. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1036:89-94.

Wells-Knecht MC, Lyons TJ, McCance DR, Thorpe SR, Baynes JW. Agedependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 100:839-846.

Winocour PD. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes* 1992; 41:S26-S31.

Witmer AN, Vrensen GFJM, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retina Eye Res* 2003; 22:1-29.

Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, Giampaoli S, Hense HW, Joffres M, Kastarinen M, Poulter N, Primatesta P, Rodriguez-Artalejo F, Stegmayr B, Thamm M, Tuomilehto J, Vanuzzo D, Vescio F. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada and the United States. *JAMA* 2003; 289:2353-2369.

Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987; 245:243-250.

Wong TY, Klein R, Klein BE, Tielsch JM, Hubbard L, Nieto FJ. Retinal Microvascular Abnormalities and their Relationship with Hypertension, Cardiovascular Disease, and Mortality. *Surv Ophthalmol* 2001a; 46:59-80.

Wong TY, Klein R, Couper DJ, Cooper LS, Shahar E, Hubbard LD, Wofford MR, Sharrett AR. Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet.* 2001b; 358:1134-1140.

Wong TY, Klein R, Sharrett AR, Duncan BB, Couper DJ, Tielsch JM, Klein BE, Hubbard LD. Retinal arteriolar narrowing and risk of coronary heart disease in men and women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *JAMA.* 2002; 287:1153-9.

Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-256.

Wu G, Haynes TE, Yan W, Meininger CJ. Presence of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase for glucosamine-6-phosphate synthesis in endothelial cells: effects of hyperglycaemia and glutamine. *Diabetologia* 2001; 44:196-202.

Wu R, Lamontagne D, de Champlain J. Antioxidative properties of acetylsalicylic acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2002; 105:387-392.

Wu R, Laplante MA, de Champlain J. Prevention of angiotensin II-induced hypertension, cardiovascular hypertrophy and oxidative stress by acetylsalicylic acid in rats. *J Hypertens* 2004; 22:793-801.

Xia P, Kramer RM, King GL. Identification of the mechanism for the inhibition of Na⁺,K⁽⁺⁾-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 1995; 96:733-740.

Yamagishi S, Kobayashi K, Yamamoto H. Vascular pericytes not only regulate growth, but also preserve prostacyclin-producing ability and protect against lipid peroxide-induced injury of co-cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190:418-425.

Yamagishi S, Yamamoto Y, Harada S, Hsu CC, Yamamoto H. Advanced glycosylation end products stimulate the growth but inhibit the prostacyclin-producing ability of endothelial cells through interactions with their receptors. *FEBS Lett* 1996; 384:103-106.

Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J* 1997; 328:599-605.

Yang G, Qiu H, Wang S, Deng H.,Zhang S, Li L. Fluidity and fatty acid components of erythrocyte membranes in diabetic retinopathy. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 2000; 63:407-412.

Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Res* 1976; 15:212-216.

Yatoh S, Mizutani M, Yokoo T, Kozawa T, Sone H, Toyoshima H, Suzuki S, Shimano H, Kawakami Y, Okuda Y, Yamada N. Antioxidants and an inhibitor of advanced glycation ameliorate death of retinal microvascular cells in diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 May 12; [Epub ahead of print]

Yu T, Mitchell P, Berry G, Li W, Wang JJ. Retinopathy in older persons without diabetes and its relationship to hypertension. *Arch Ophthalmol* 1998; 116:83-89.

Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 2000; 342:154-160.

Zarkovic N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* 2003; 24:281-291.