



ASOCIACION PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO, I.A.P.
HOSPITAL DR. LUIS SANCHEZ BULNES

Vale
[Signature]
11234
71

JEFATURA DE ENSEÑANZA

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Posgrado

Asociación Para Evitar la Ceguera en México, IAP

Hospital "Dr. Luis Sánchez Bulnes"

Tesis de Posgrado

*Uso de Hialuronidasa Intravítrea en la Prevención de
Vítreorretinopatía Proliferativa y Desprendimiento de Retina
asociado en un Modelo Experimental de Lesión Ocular
Penetrante Posterior*

Para obtener el Título

Especialista en Oftalmología

Presenta

Dr. Fernando Joel **Moreno López**



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.

Tutores

Dr. Hugo Quiroz Mercado

Jefe del Departamento de Retina

Dr. José Luis Enrique Guerrero Naranjo

Médico adjunto al Servicio de Retina

México, D.F. octubre de 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Contenido

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Dedicatoria | 3 |
| Introducción..... | 4 |
| Justificación..... | 7 |
| Hipótesis | 8 |
| Objetivos | 8 |
| General | 8 |
| Específicos | 8 |
| Material y Métodos | 9 |
| Resultados | 10 |
| Discusión | 11 |
| Conclusiones | 13 |
| Bibliografía..... | 14 |

Dedicatoria

La presente tesis puede parecer por fuera un mero trabajo profesional, pero su verdadero valor se encuentra precisamente en lo que no se observa a simple vista, como sucede en la mayoría de las cosas y de las personas.

Esta tesis representa la culminación de toda una vida de estudios y de esfuerzos tanto personales como compartidos. En ella vuelvo la vista para observar gran parte de mi vida: el primer día del pábulos, las difíciles matemáticas de la primaria, los intentos por independencia en la secundaria, el logro de amistades con el título de “para siempre” en la preparatoria, el ensayo a ser adulto en la carrera, y ahora, finalmente, el enfoque de mi vida hacia lo específico en la residencia, al haber encontrado la razón por la cual estoy de visita en este mundo... Caray! Me llevó 28 años para descubrirlo.

Y esta etapa me tocó VIVIRLA en “La Ceguera”. Fueron la incondicional paciencia y confianza con la que cada paciente me honró, y la diaria enseñanza por encima de lo académico que logré arrebatarse a mis maestros, los que me hacen dedicar de todo corazón este triunfo en mi vida a todos ellos y a la casa que “La Ceguera” representó estos años para mí.

Especialmente dedico esta culminación de esfuerzos a 8 personas que representan mi propia existencia en esta vida: ellas son mi familia. Son ustedes, Apá, Amá, Mona, Raúl, Carlos, Merci, Ceci y Fabis, la única y especial razón y motor por los cuales estoy aquí, ahora, en este preciso momento, disfrutando plenamente de lo que soy y de lo que puedo compartir con los demás.

Uso de Hialuronidasa Intravítrea en la Prevención de Vítreorretinopatía Proliferativa (VRP) y Desprendimiento de Retina (DR) asociado en un Modelo Experimental de Lesión Ocular Penetrante Posterior

Introducción

A. La vítreorretinopatía proliferativa (VRP) es una entidad clínica caracterizada por crecimiento y contracción de membranas celulares sobre la superficie interna de la retina y sobre la superficie vítrea posterior (1,2).

Factores de riesgo asociados al desarrollo de VRP incluyen desgarros retinianos, desprendimientos de retina regmatógenos de larga evolución, hemorragia vítrea, desprendimiento coroideo, y afaquia. Estas entidades están asociadas a la dispersión de células del epitelio pigmentado de retina (EPR) hacia la cavidad vítrea, o con disrupción de la barrera hemato-ocular, como prerequisites para el desarrollo de VRP (3), donde las células del EPR finalmente entran en contacto con el gel vítreo.

Los mecanismos involucrados en la formación de VRP son los siguientes:

- 1) Desgarro retiniano
- 2) Liberación de células del EPR hacia la cavidad vítrea
- 3) Migración de éstas células, células gliales y fibrocitos hacia la superficie vítrea y retiniana
- 4) Formación de membranas contráctiles que conllevan a desprendimientos de retina y a nuevos desgarros retinianos
- 5) Fijación de membranas con depósitos de colágeno recién formados (3,4).

Una interacción entre fibroblastos, células del EPR, y células gliales retinianas ha sido demostrada en la producción de VRP. El epitelio pigmentado de retina es el principal sustrato celular en las membranas vítreas y retinianas formadas en la VRP, pero las células gliales están presentes en alrededor del 50% de los casos. La proliferación de otras células, como las células de Müller, astrocitos, pericitos, células endoteliales de las vasculatura retiniana, y macrófagos invasores ha sido documentada y sugerida como el inicio de la VRP y de la fibrosis subretiniana.

Un número de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el factor de crecimiento beta transformador, el factor de crecimiento epitelial, el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de maduración y crecimiento glial, la interleucina 1, los péptidos promotores del crecimiento glial y la trombina, han sido sugeridos como mediadores de la respuesta proliferativa celular de la vitreorretinopatía proliferativa (5,6,7,8,9,10).

Una vez que ocurre la proliferación celular y el subsecuente desarrollo de membranas sobre las superficies retiniana y vítrea, se ejerce entonces tracción trasvítrea sobre la retina. Esta tracción puede crear nuevas rupturas y pliegues en la retina. Las fuerzas traccionales relacionadas a estas membranas están ya presentes más no totalmente manifiestas hasta que ocurren las rupturas retinianas. La tracción focal de las membranas formadas puede producir un desgarro en la retina y el desarrollo rápido de un desprendimiento de retina completo en los casos de VRP.

Una vez dada la pérdida de continuidad en la retina, el vítreo y líquido fluyen fácilmente hacia el espacio subretiniano, sobrepasando la habilidad del EPR para remover líquido de este espacio, lo que permite que las fuerzas epirretinianas tanenciales se contraigan con menor oposición, y así causano elevación y distorsión máxima de la retina. Esto a su vez permite que las membranas prerretinianas se contraigan aún más y produzca un DR extenso.

Machemer y colaboradores desarrollaron una clasificación actualizada de la VRP que incluye la localización y tipo de tracción, el tipo de desplazamiento retiniano, y la extensión del proceso detallado por horas del reloj involucradas más que por cuadrantes (11).

B. La hialuronidasa es una preparación enzimática a partir de proteína testicular bovina, altamente purificada. Ha sido usada extensamente en oftalmología por más de 40 años como un agente difusor, más comúnmente empleada para facilitar la difusión de anestésicos locales. La hialuronidasa modifica la permeabilidad del tejido conectivo a través de la hidrólisis del ácido hialurónico, un polisacárido encontrado en la matriz intercelular del tejido conectivo, y de algunos tejidos especializados como el cordón umbilical y el humor vítreo.

La hialuronidasa hidroliza el ácido hialurónico al separar los enlaces glucosaminídicos entre C1 de la porción glucosamina y C4 del ácido glucurónico, lo que disminuye temporalmente la viscosidad del cemento celular y promueve la difusión de los fluidos inyectados. Esto a su vez facilita su absorción.

Justificación

La vítreorretinopatía proliferativa es una complicación del desprendimiento de retina regmatógeno y de una lesión ocular penetrante posterior. Constituye la causa más común de fallo en la reparación quirúrgica de estas entidades, y ocurre en el 7 al 10% de los casos en operaciones primeras, y en un porcentaje mayor luego de reoperaciones. Es una causa de ceguera en alrededor del 7% de estos pacientes tratados quirúrgicamente (12,13,14).

Se han sugerido una variedad de tratamientos farmacológicos para reducir la proliferación de tejido en el ojo. Estudios experimentales que utilizan sustancias antioxidantes como el extracto de Gingkgo biloba (Egb761) y la superóxido dismutasa, han demostrado una relación entre la producción de radicales libres y el desarrollo de VRP (15).

Se ha empleado una combinación de 5-fluorouridina, triamcinolona y activador tisular recombinante del plasminógeno en forma de implante intraocular en el tratamiento de la VRP. Esta combinación ha mostrado una inhibición efectiva de la progresión de ésta entidad en modelos experimentales (16). La mitomicina C al igual que el alfa-tocoferol y su succinato sódico intravítreos han retrasado la producción de VRP en modelos experimentales (17,18).

Expuesto lo anterior, en el presente estudio se pretende usar la hialuronidasa como otra alternativa en el tratamiento farmacológico de la VRP inducida en un modelo experimental.

Hipótesis

La inyección de hialuronidasa intravítrea previene o disminuye el proceso de formación de membranas contráctiles y desprendimiento de retina asociados a la vítreorretinopatía proliferativa. Lo anterior se logra a través de una reducción en cantidad de la masa vítrea y con esto se evita la migración de células del epitelio pigmentado de retina hacia la cavidad vítrea.

Objetivos

General

Demostrar que la inyección intravítrea de hialuronidasa puede prevenir el desarrollo de VRP y DR asociado en un modelo experimental de lesión ocular penetrante posterior.

Específicos

- 1) Demostrar que la hialuronidasa reduce significativamente la cantidad de matriz vítrea luego de inyectarse en la cavidad vítrea.
- 2) Demostrar que la inyección de hialuronidasa a la cavidad vítrea disminuye importantemente la migración celular del epitelio pigmentado de retina hacia el humor vítreo.

Hipótesis

La inyección de hialuronidasa intravítrea previene o disminuye el proceso de formación de membranas contráctiles y desprendimiento de retina asociados a la vítreorretinopatía proliferativa. Lo anterior se logra a través de una reducción en cantidad de la masa vítrea y con esto se evita la migración de células del epitelio pigmentado de retina hacia la cavidad vítrea.

Objetivos

General

Demostrar que la inyección intravítrea de hialuronidasa puede prevenir el desarrollo de VRP y DR asociado en un modelo experimental de lesión ocular penetrante posterior.

Específicos

- 1) Demostrar que la hialuronidasa reduce significativamente la cantidad de matriz vítrea luego de inyectarse en la cavidad vítrea.
- 2) Demostrar que la inyección de hialuronidasa a la cavidad vítrea disminuye importantemente la migración celular del epitelio pigmentado de retina hacia el humor vítreo.

Material y Métodos

El estudio se realizó bajo un diseño experimental y comparativo.

En base al modelo experimental de lesión ocular penetrante posterior en conejos por Cleary y Ryan (1), se indujo VRP en 10 conejos pigmentados de más de 2.5 kg de peso. Una aguja calibre 25 fue guiada oftalmoscópicamente hacia la cavidad vítrea vía par plana, respetando la retina. Hubo prolapso de vítreo por herida, mismo que se removió. Entonces se inyectaron 0.4 ml de sangre autóloga a la cavidad vítrea y la herida se suturó.

Luego de 24 horas se inyectaron 75 UI de hialuronidasa (Advanced Corneal Systems) en el vítreo de 5 de los ojos, designados como grupo estudio, y los restantes fueron inyectados con solución salina en la cavidad vítrea, como grupo control.

En los días 14 y 28 luego del procedimiento se realizó un ultrasonido ocular en todos los ojos, así como una evaluación oftalmoscópica en los días 15 y 22, para evaluar los cambios asociados a VRP y la presencia de DR inducido.

En el día 28 luego del procedimiento se enuclearon todos los ojos para realizar el estudio histopatológico de los mismos, con enfoque a la cantidad de masa vítrea presente, así como a la cantidad de células pigmentadas en la cavidad vítrea. Los tejidos fueron procesados con parafina, y las tinciones de hematoxilina y eosina, ácido peryódico de Schiff, y hierro coloidal para resaltar estos hallazgos.

El patólogo que analizó los ojos estuvo enmascarado al tipo de sustancia inyectada en los mismos. La cantidad de vítreo se estimó en base a su presencia en cruces, y la cantidad de células pigmentadas se evaluó en base a su presencia en campo de alto poder, igualmente en cruces.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con la prueba de p de Wilcoxon de probabilidades.

Resultados

4 de los ojos inyectados con hialuronidasa no desarrollaron datos de VRP ni desprendimiento de retina en el estudio oftalmoscópico, y se observó DR en el ojo restante del grupo estudio.

Los ojos inyectados con solución salina desarrollaron una diferencia estadísticamente significativa en el grado de inflamación vítrea, medida en cruces (+ inflamación que permite ver detalles del polo posterior, ++ inflamación que permite ver polo posterior pero sin detalles, +++ inflamación que no permite observar el polo posterior), con una $p=0.02$ en el día 14, y $p=0.03$ en el día 28. Esta inflamación no permitió visualizar detalles del segmento posterior.

Se observó DR por ultrasonido en dos de los ojos del grupo control, comparado con DR en 1 ojo del grupo estudio.

El estudio histopatológico mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0267$) en la reducción de masa vítrea en los ojos inyectados con hialuronidasa, en comparación a aquellos ojos inyectados con solución salina. En relación a la presencia de células pigmentadas en la cavidad vítrea, los ojos en el grupo control mostraron una cantidad considerablemente mayor de éstas células en la cavidad vítrea, a la observada en los ojos del grupo estudio, con una $p=0.0595$, interpretada como una tendencia en los resultados del grupo control hacia la presencia de estas células.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con la prueba de p de Wilcoxon de probabilidades.

Resultados

4 de los ojos inyectados con hialuronidasa no desarrollaron datos de VRP ni desprendimiento de retina en el estudio oftalmoscópico, y se observó DR en el ojo restante del grupo estudio.

Los ojos inyectados con solución salina desarrollaron una diferencia estadísticamente significativa en el grado de inflamación vítrea, medida en cruces (+ inflamación que permite ver detalles del polo posterior, ++ inflamación que permite ver polo posterior pero sin detalles, +++ inflamación que no permite observar el polo posterior), con una $p=0.02$ en el día 14, y $p=0.03$ en el día 28. Esta inflamación no permitió visualizar detalles del segmento posterior.

Se observó DR por ultrasonido en dos de los ojos del grupo control, comparado con DR en 1 ojo del grupo estudio.

El estudio histopatológico mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0267$) en la reducción de masa vítrea en los ojos inyectados con hialuronidasa, en comparación a aquellos ojos inyectados con solución salina. En relación a la presencia de células pigmentadas en la cavidad vítrea, los ojos en el grupo control mostraron una cantidad considerablemente mayor de éstas células en la cavidad vítrea, a la observada en los ojos del grupo estudio, con una $p=0.0595$, interpretada como una tendencia en los resultados del grupo control hacia la presencia de estas células.

Discusión

La inyección de hialuronidasa en la cavidad vítrea resulta en la licuefacción (sínquis) del humor vítreo luego de varios días (19,20). Ocurrido lo anterior a través de la digestión del ácido hialurónico y del condroitín sulfato, es posible que este agente induzca un desprendimiento de vítreo posterior sin dañar la superficie interna de la retina.

Aunque en el presente estudio no pudo demostrarse por ultrasonido o por histopatología un real desprendimiento de vítreo posterior (DVP) o sinéresis, el hecho de encontrar la licuefacción del vítreo con la consecuente disminución en su cantidad, podría pensarse como el punto inicial de un verdadero DVP y que sólo es cuestión de tiempo para poder observarlo.

Es precisamente una conjunción de la sínquis con la sinéresis del vítreo lo que reduce las complicaciones de varias patologías del segmento posterior en las que el vítreo juega un papel de suma importancia en su fisiopatogenia. Entonces el éxito de toda acción farmacológica orientada a disminuir dichas complicaciones depende de la inducción de estos dos eventos, sínquis y sinéresis, en forma simultánea.

El hecho de sólo inducir la licuefacción, sin lograr el desprendimiento del vítreo posterior, puede inclusive agravar varias condiciones propensas al desprendimiento de retina, como son la miopía y varias artro-oftalmopatías, y en el caso de la VRP, la sólo licuefacción del vítreo no es suficiente para detener la cascada de eventos que finalmente culminarán en desprendimientos de retina traccionales.

Son varios los estudios que han incluido el uso de enzimas para digerir el gel vítreo, como son la plasmina (21), dispasa (22), y la condroitinasa (23), pero ninguno de ellos ha logrado suficiente éxito para estimular su uso sistemático.

Es la hialuronidasa la que ha mostrado mejores efectos (19,20) en provocar desprendimiento de vítreo posterior. Es por esto que en el caso de la VRP, el hecho de que la hialuronidasa permita el alejamiento del cuerpo vítreo de la retina, representa un punto de bloqueo en la migración de células del EPR, y en la formación y posterior contracción de membranas que ocurre en la vítreorretinopatía proliferativa.

Conclusiones

Basados en los estudios histopatológicos concluimos que el desarrollo de la vítreorretinopatía proliferativa puede disminuirse cuando el andamiaje constituido por el humor vítreo es eliminado. Luego de los hallazgos observados concluimos que cuando la hialuronidasa digiere enzimáticamente el gel vítreo, las células del epitelio pigmentado de retina carecen del andamiaje a través del cual migrarán hacia la cavidad vítrea, lo cual representa un bloqueo en el punto de inicio de la fisiopatogenia de la VRP luego de una lesión ocular penetrante posterior o de un desprendimiento de retina regmatógeno como se explicó anteriormente en este estudio.

Por otra parte el hecho de la presencia de menor inflamación en el grupo estudio, sugiere que la hialuronidasa previene de alguna manera la cascada inflamatoria que estimulará la proliferación de células pigmentarias en el vítreo, y así la consecuente formación de membranas traccionales.

Todos los hallazgos anteriores nos hacen pensar en un posible papel benéfico de la hialuronidasa en la prevención de VRP en ojos con desprendimiento de retina o con lesión ocular penetrante posterior.

Es necesario entonces desarrollar otros estudios que incluyan seguimientos cortos y largos, con especial cuidado a los efectos sobre la función retiniana en los ojos estudiados, de tal forma que los resultados siempre sean reproducibles. Sólo entonces la hialuronidasa probará consistentemente el efecto promisorio que ha mostrado en los estudios hasta ahora conducidos.

Bibliografía

1. Cleary PE, Ryan SJ. Experimental posterior penetrating eye injury in the rabbit. I and II. *British Journal of Ophthalmology* 1979, 63: 306-321
2. Veloso AA, Kardmas EF, et al. 13-cis-retinoic acid in fluorosilicone copolymer oil in a rabbit model of proliferative vitreoretinopathy. *Experimental Eye Research* 1997, 65(3):424-434
3. Nagasaki H, Shinagawa K, et al. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retina Eye Research* 1998, 17(1):77-98
4. Guyer, Yanuzzi, Chang. *Retina, Vitreous and Macula*. W. B. Saunders Company, 1999 Vol 2, Chapter 116: 1350-1369
5. Alfaro, Liggett. *Vitreoretinal surgery of the injured eye*. Lippincott Raven Publishers. Chapter 21, pp 241-256
6. Cassidy L, Barry P, Shaw C, et al. Platelet derived growth factor and fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with vitreoretinal disorders. *British Journal of Ophthalmology* 1998, 82(2):181-185.
7. Khaler CM, Herold M, Kauffmann G, et al. Induction of arachidonic acid metabolite release by human fibroblasts in proliferative vitreoretinopathy. *European Journal of Pharmacology* 1998, 341(1):111-117.
8. Lashkari K, Rahimi N, Kaslauskas A. Hepatocyte growth factor receptor in human RPE cells; implications in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Vision Sciences* 1999, 40(1):149-156
9. Toger J, Kremser B, et al. Substance P in proliferative vitreoretinopathy: the significance of aqueous humor levels for evolution of the disease. *Graefes Archives of Clinical and Experimental Ophthalmology* 1998, 236(12):900-903
10. Kon CH, Occeleston NL, Charteris D. A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology and Vision Sciences* 1998, 39(8):1524-1529.
11. Machemer R, Aaberg TM, et al. An update of retinal detachment in proliferative vitreoretinopathy. *American Journal of Ophthalmology* 1991, 112:159-165.

12. Quiroz Mercado Hugo. Retina. Diagnóstico y Tratamiento. McGraw Hill Interamericana, 1996. pp 178-185.
13. Glaser B, Cardin A, et al. Proliferative vitreoretinopathy. The mechanism and development of vitreoretinal traction. *Ophthalmology*, 1987, 94(4): 327-332.
14. Cardillo JA, Stout JT, et al. Post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. The epidemiologic profile, onset, risk factors and visual outcome. *Ophthalmology*, 1997, 104(7):1166-1173.
15. Baudocin C, Pisella PJ, Ettaiche M, et al. Effects of Egb761 and superoxide dismutase in an experimental model of retinopathy generated by intravitreal production of superoxide anion radical. *Graefes Archives of Experimental Ophthalmology*, 1999, 237(1):58-66.
16. Chang, Khawly et al. An intravitreal sustained release triamcinolone and 5-fluorouracil codrug in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Archives of Ophthalmology*, 1998, 116(1):69-77
17. Yu GH, Chung H. Antiproliferative effect of mitomycin C on experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits. *Korean Journal of Ophthalmology*, 1997, 11(2):98-105.
18. Larrosa JM, Veloso AA, et al. Antiproliferative effect of intravitreal alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl-acid-succinate in a rabbit model of PVR. *Current Eye Research*, 1997, 16(10):1030-1035.
19. Harooni M, McMillan T, Refojo M. Efficacy ad safety of enzymatic posterior vitreous detachment by intravitreal injection of hyaluronidase. *Retina*. 1998;18:16-22
20. Karagozian HL, Karagozian VK. Hyaluronidase for intravitreal use in an animal model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:S662
21. Verstraeten T, Chapman C, Hartzler M, et al. Pharmacologic induction of PVD in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 1993;111:849
22. Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Posterior vitreous detachment with dispase. *Retina* 1998;18:7-15
23. Hageman GS, Russel SR. Chondroitinase-mediated disinsertion of the primate vitreous body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:1260